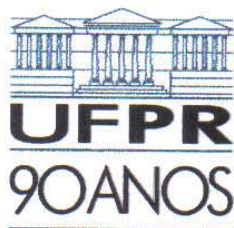


RICARDO ANTONIO TANHOFFER

**EFEITO DA LESÃO MEDULAR EM RATOS SOBRE A
CONCENTRAÇÃO PLASMÁTICA E TECIDUAL DE
GLUTAMINA E SOBRE A RESPOSTA IMUNITÁRIA DE
MACRÓFAGOS E LINFÓCITOS**

Dissertação de Mestrado defendida como pré-requisito para a obtenção do título de Mestre em Educação Física, no Departamento de Educação Física, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Cláudio Fernandes



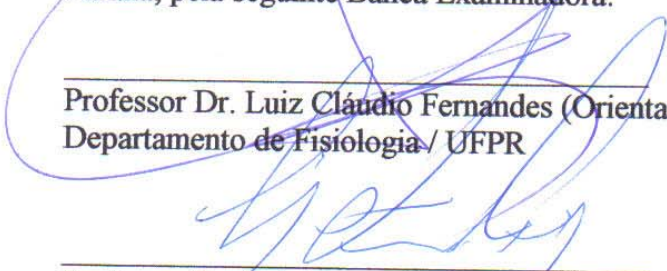
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE EDUCAÇÃO FÍSICA
COORDENAÇÃO DE PÓS GRADUAÇÃO
MESTRADO EM EDUCAÇÃO FÍSICA

TERMO DE APROVAÇÃO

RICARDO ANTONIO TANHOFFER

EFEITOS DA LESÃO MEDULAR EM RATOS SOBRE A
CONCENTRAÇÃO PLASMÁTICA E TECIDUAL DE GLUTAMINA E
SOBRE A RESPOSTA IMUNITÁRIA DE MACRÓFAGOS E LINFÓCITOS

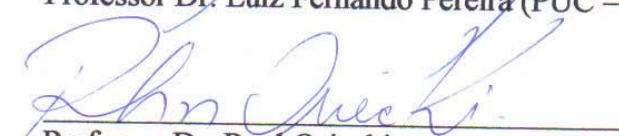
Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Educação Física – Área de Concentração Exercício e Esporte, Linha de Pesquisa Fisiologia da Performance, do Departamento de Educação Física do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, pela seguinte Banca Examinadora:



Professor Dr. Luiz Cláudio Fernandes (Orientador)
Departamento de Fisiologia / UFPR



Professor Dr. Luiz Fernando Pereira (PUC – Pr)



Professor Dr. Raul Osiecki
Departamento de Educação Física / UFPR

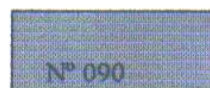
Curitiba, 23 de Novembro de 2004



Ministério da Educação
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
Setor de Ciências Biológicas
Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA)



CERTIFICADO



A Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, instituída pela PORTARIA Nº 787/03-BL, de 11 de junho de 2003, com base nas normas para a constituição e funcionamento da CEEA, estabelecidas pela RESOLUÇÃO Nº 01/03-BL, de 09 de maio de 2003, **CERTIFICA** que os procedimentos utilizando animais no projeto de pesquisa abaixo especificado, estão de acordo com os princípios éticos estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e exigências estabelecidas no "Guide for the Care and Use of Experimental Animals (Canadian Council on Animal Care).

Processo nº: 27692/04-71 Data de Aprovação: 07/06/04 13ª RO

Projeto Pesquisa Título : DETERMINAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES PLASMÁTICA E TECIDUAL DE GLUTAMINA, EM RATOS SUBMETIDOS À LESÃO MEDULAR EXPERIMENTAL."

Autores: Luiz Cláudio Fernandes - responsável; Ricardo Antonio Tanhoffer - Acadêmico; Everson Araujo Nunes, Ricardo Key lamazak, Maurício Darlei Lissa - colaboradores.

Departamento : Fisiologia

Curitiba, 07 de junho de 2004.

Prof. Dr. SILVIO MARQUES ZANATA
Secretário

Profa. Dra. ANETE CURTE FERRAZ
Presidente

Dedicatória

Dedico este trabalho à:

minha mãe, Genila Tanhoffer, que sabe que a grande herança que uma pessoa pode dar é o estudo e que não mediu esforços para sempre me proporcionar o melhor possível, e ao meu pai Rudolpho Tanhoffer (*in memoriam*), que também sempre se empenhou em dar-me o melhor.

minha querida Aldre Izabel Pchevozniki, pelo constante apoio (estive em todos meus experimentos e cirurgias e me ajudou a tratar dos ratos, além de cuidar da nossa casa sozinha), paciência (nunca reclamou da minha constante ausência), e pelo seu amor incondicional.

E ao meu orientador e amigo Luiz Cláudio Fernandes, pela presteza, dedicação, competência, e principalmente pelo voto de confiança.

AGRADECIMENTOS

À **Alana Maria Pchevozniki**, que inúmeras vezes prestou sua valiosa colaboração, durante a execução do treinamento, tratamento e dos experimentos.

Ao pessoal do lab, **Dalva, Eve, Loli, Lú, Nathália, Rogéria, Sandrinho, Vanessa**, que sempre estiveram dispostos a compensar as limitações físicas, ao **Maurício**, companheiro de “saga” e um amigo muito especial, onde caminhamos juntos desde o dia do teste de seleção que fizemos na mesma sala e passamos por várias alegrias e “desafios”, **Claudinha e Júlia**, sempre foram companheiras nas cirurgias e excelentes amigas, **Gleisson e Helô**, principalmente pelo sábado e domingo dos “180 músculos”, **Cyber** pela contínua ajuda com caixas, gavagens, escadas, contas, cálculos e chutes matemáticos, para utilizar a enzimas (além da infundável espera pela glutaminase) e tudo mais, e **Ricardo Key Yamazaki**, que, do jeito “ice-man” de ser, foi o cara que mais esteve ao meu lado, uma pessoa muito especial, e que tenho enorme carinho e amizade. Sou muito grato a todos vocês pela ajuda, compreensão e amizade.

Ao **Candido e Luiz**, do biotério, assim como à todos os funcionários.

Aos **Ratos Wistar...**

Ao **Prof. Dr. Massahiko Ohi**, da Farmacologia, UFPR, pela preciosa ajuda com os anestésicos.

Ao **Prof. Dr. Raul Osiecki**, pelo apoio no início deste trabalho.

Ao **Prof. Dr. Luiz Fernando Pereira**, pelo gentil aceite de participação na banca, assim como suas valiosas colaborações para com este trabalho.

Ao **Luizão e Sebastião**, sempre dispostos à ajudar, debaixo de sol ou chuva.

Ao meu irmão **Edson** e a **Cláudia**, pela motivação para a pesquisa.

Aos meus grandes amigos – **Beto, Cícero da feijuca, Elisandro do barreado, Fábio Gusso, Guto, Jr, Leitão, Renaldin, Rodrigo Gusso e Texi** pelos momentos de “lazer” e “descontração”. Todos sabemos que um grande avanço da ciência está por ser descoberto por esta equipe, é apenas questão de tempo.

Ao **Marco Rolo**, primeiro por ser um dos caras mais engraçados que já conheci, e agora por demonstrar ser um dos mais corajosos também.

Ao **Dr. Luiz Roberto Aguiar, Dr. Bruno Brambilla e Dr. Carlos Arteaga Rodrigues**, que cuidaram e cuidam de mim. Devo muito à eles.

Aos meus colegas da época do Judô, onde cultivei grandes amizades, **Antunes, Jeferson** (inclusive com a ajuda com o computador, que insistia em dar “pau”), **Lemanczuk, sensei Marafigo e Tatu**, amizades para toda a vida.

À alguns amigos antigos e especiais: **Ana Luiza, Cotonete, Orlando e Sanson**.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE ABREVIATURAS	ix
RESUMO	xi
ABSTRACT	xii
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Sistema Nervoso.....	1
1.2 Lesão Medular.....	9
1.3 Glutamina.....	23
2.OBJETIVOS	36
3. MATERIAL E MÉTODOS	37
3.1 Condições experimentais.....	37
3.2 Determinações plasmáticas e séricas.....	39
3.3 Determinações teciduais.....	39
3.4 Estudos realizados com linfócitos.....	40
3.5 Estudos realizados com macrófagos.....	41
3.6 Determinações de parâmetros de resposta imunitária.....	42
3.7 Análise estatística.....	44
3.8 Desenho experimental.....	44
4. RESULTADOS	45
5. DISCUSSÃO	58
6. CONCLUSÃO	66
7. REFERÊNCIAS	67

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 01 - componentes do SNC.....	03
FIGURA 02 – gânglios periféricos.....	04
FIGURA 03 – inervação pré-ganglionar simpática e parassimpática.....	06
FIGURA 04 – direção dos comandos (motor e sensitivo).....	06
FIGURA 05 – medula espinhal e sua estrutura geral.....	07
FIGURA 06 – nível neurológico da lesão medular.....	13
FIGURA 07 – produção e utilização de glutamina por diversos tecidos e órgãos.....	26
FIGURA 08 – síntese de glutamina catalizada pela enzima glutamina sintetase.....	27
FIGURA 09 – hidrólise de glutamina pela enzima glutaminase.....	27
FIGURA 10 – características das imunidades inata e específica.....	33
FIGURA 11 – variação do peso corpóreo dos animais.....	46
FIGURA 12 – concentração plasmática de glutamina.....	47
FIGURA 13 – concentração de glutamina no músculo epitroclearis.....	48
FIGURA 14 - concentração de glutamina no músculo gastrocnêmio.....	49
FIGURA 15 - concentração de glutamina no músculo sóleo.....	50
FIGURA 16 – concentração de glutamina nos diferentes músculos estudados.....	51
FIGURA 17 – índice de Fagocitose.....	52
FIGURA 18 – índice de retenção de Lisossomos.....	53
FIGURA 19 – produção de peróxido de hidrogênio (H ₂ O ₂).....	54
FIGURA 20 – produção de ânion superóxido (O ₂ ⁻).....	55
FIGURA 21 – expressão de linfócitos CD4.....	56
FIGURA 22 – expressão de linfócitos CD8.....	57
FIGURA 23 - comparação entre populações de CD4 e CD8.....	58

LISTA DE ABREVIATURAS

AACD	– Associação de Assistência a Criança com Deficiência
ACR	– Aminoácidos de cadeia ramificada
ANOVA	- Análise de variância
ASIA	– American Spinal Injury Association
AVC	– Acidente vascular cerebral
BHE	– Barreira hemato-encefálica
C7	– Referente à vértebra cervical (ex. C7 - sétima vértebra cervical)
CEEA	- Comissão de Ética em Experimentação Animal
CD	- Conjunto de diferenciação
Con A	- Concanavalina A
CTL	- Controle
DMSO	- Dimetil sulfóxido
GABA	– Ácido gama aminobutírico
HTT	– Hipersensibilidade do tipo tardia
IBGE	– Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IgA	– Imunoglobulina A (cadeia pesada α)
IgG	– Imunoglobulina G (cadeia pesada γ)
IL-2	– Interleucina tipo 2
IL-6	– Interleucina tipo 6
INF	- Interferon
KHCO₃	- Ácido perclórico
L1	– Referente à vértebra lombar (ex. L1 – primeira vértebra lombar)
LCR	– Líquido céfalo-raquidiano
LM	– Lesão medular
LPS	- Lipopolissacarídeo
MASCIS	- Multicenter Animal Spinal Cord injury Study
ME	– Músculo esquelético
MHC	- Complexo de histocompatibilidade principal
NBT	- Nitroblue tetrazolium
NK	- Células matadoras naturais (<i>natural killer</i>)
NSCIA	– National Spinal Cord Injury Association

PBS	- Solução tampão fosfato
PEP	- Fosfoenolpiruvato
PLM	– Portador de lesão medular
PMA	- Forbol miristato acetato
PMN	- Polimorfonucleares
PVP- I	- Polivinil Pirrolidona Iodo
Rpm	- Rotações por minuto
S	– Falso operado (sham-operated)
Sc1	- Referente à vértebra sacral (ex. Sc1 – primeira vértebra sacral)
SN	– Sistema nervoso
SOD	- Superóxido dismutase
T5	– Referente à vértebra torácica (ex. T5 – quinta vértebra torácica)
Th	- Células T-auxiliadoras (<i>T-helper</i>)
TNF	- Fator de necrose tumoral

RESUMO

A lesão medular (LM) é uma patologia altamente incapacitante e constitui verdadeiro desafio à reabilitação, devido aos problemas sensitivos, motores e alterações viscerais importantes. As principais conseqüências da LM são a disfunção do sistema nervoso autonômico e a paralisia dos músculos e perda da sensibilidade inervadas pelo segmento lesado e imediatamente abaixo deste nível. Em adição, o lesado medular convive com uma série de fisiopatologias secundárias, entre elas, a incidência de infecções, estas sendo a principais causas de morbidade e mortalidade nessa população. A glutamina é o aminoácido mais abundante no plasma e tecidos, sendo o principal sítio de síntese a musculatura esquelética (ME) ativa. Glutamina tem estreita relação com a manutenção da imunocompetência, por ser amplamente utilizada pelas células de divisão rápida, ex. linfócitos. O objetivo deste trabalho foi verificar se a perda do controle motor da musculatura dos membros inferiores alterariam as concentrações do aminoácido glutamina no plasma e nos músculos de animais lesados medular, nas fases aguda (48 horas pós lesão) e secundária, ou semi-aguda (cinco dias pós lesão), bem como seus efeitos sobre parâmetros imunitários, em ratos. Para causar a LM, os ratos foram submetidos à laminectomia entre a 3^a a 4^a vértebras e em seguida efetuada a transecção da medula espinhal. A LM promoveu redução da massa corpórea (13%) quando comparada ao controle ao final de 5 dias. A concentração de glutamina no plasma no 2^o dia e 5^o dia foi significativamente menor quando comparado ao controle ($p < 0,01$). Músculo vermelho tem perda significativa de glutamina ($p < 0,01$) assim como a porção branca do gastrocnêmio ($p < 0,001$), possivelmente por tratarem-se de membros que foram desnervados, já que o epitroclearis não sofreu o mesmo fenômeno. Os macrófagos tiveram sua capacidade fagocítica e volume lisossomal significativamente reduzidos no 2^o. dia, mas elevou-se acima do controle no 5^o dia ($p < 0,001$), caracterizando um efeito rebote em sua resposta. A Produção de O_2^- elevou-se no 2^o dia ($p < 0,001$) mas foi similar à do controle no 5^o dia. Interessantemente a produção de H_2O_2 não se alterou no 2^o e 5^o dia. A população de linfócitos CD4 teve redução discreta, porém não significativa ($p > 0,05$), mas a de CD8 estava reduzida significativamente quando comparada aos controles, sugerindo que a LM altera as populações Th-1/Th-2. Conclui-se a LM agudamente reduz a glutaminemia e a concentração de glutamina nos membros desnervados, e isto foi acompanhado por modificação importante da resposta imunitária.

PALAVRAS CHAVES: lesão medular, glutamina, sistema imunitário, músculo esquelético.

ABSTRACT

Spinal cord injury (SCI) is a great challenge to rehabilitation. Skeletal muscle paralysis and autonomic dysfunction are two major features due SCI. Indeed, individuals with SCI develop other diseases such autonomic disreflexia, osteoporosis, and sepsis. In addition, this population present high incidence of infections. Glutamine is the most abundant amino acid on plasma and tissues and the main site of synthesis is the skeletal muscle. Glutamine is very important to immune cells for immunoconpetence. This study aimed to investigate whether skeletal muscle paralysis changes glutamine concentration in the plasma and also in skeletal muscle in rats subjected to SCI in acute (48 hours after trauma) and secondary (5 days after surgery) phases, as well as the effect on immune response. The glutamine plasma concentration in SCI was decreased at second and fifth days ($p < 0,01$) when compared to control. Type I and II skeletal muscle fibers showed glutamine levels reduction in comparison with control and sham operated groups. Phagocytosis and lysosome volume were reduced at second day, but at fifth day they increased dramatically beyond control values ($p < 0,001$). The O_2^- production was increased at second day but returned to control values at the 5th. day. There was no change in the H_2O_2 production between the groups. The CD4 T-lymphocytes population did not change in numbers ($p > 0,05$) but the CD8 was significantly decreased ($p < 0,001$) in SCI as compared to intact animals. Our results suggest that SCI causes limb denervation which could be responsible for the glutamine reduction in plasma and skeletal muscle. Furthermore, the immune response was reduced in CD8 lymphocytes population and dual response in some macrophages immune parameters.

KEY WORDS: spinal cord injury, glutamine, immune system, skeletal muscle.

1. INTRODUÇÃO

A lesão medular (LM) é uma patologia altamente incapacitante e constitui verdadeiro desafio a reabilitação, pois provoca problemas sensitivos, motores e alterações viscerais importantes (FURUSAWA et al., 2003; CHEN; COHEN; HALLETT, 2002; FAHEY, 2002; LEE et al., 2002; FOUAD, 2000; ASCÂNIO LAURO, 1997; LEVI et al., 1995; JANSSEN, 1994; UMPHRED, 1994; SCHMITZ, 1993; KANDEL; SCHWARTZ; JESSELL, 1991).

Felizmente, o desenvolvimento científico e tecnológico vem progressivamente aumentando a expectativa de vida e gerando novos recursos para melhoria da qualidade de vida dessa população. Entre estes, o exercício vem gradativamente conquistando espaço como importante agente no âmbito da reabilitação física, da reintegração social, terapêutico, preventivo e também da performance esportiva. O uso da atividade física orientada, visando reabilitação, manutenção ou resultados, necessita da aplicação de conhecimentos de fisiologia, para que estas atividades sejam realizadas de forma precisa, segura e eficiente. Entretanto, existem muitas questões, não bem definidas, quanto aos distúrbios metabólicos presentes em lesados medulares.

1.1 Sistema nervoso

O sistema nervoso (SN) tem a capacidade de receber, transmitir, elaborar e armazenar informações. Recebe informações sobre mudanças que ocorrem no meio externo, ou seja, relaciona o indivíduo com seu ambiente e inicia e regula as respostas adequadas. Mas ele não somente é apenas afetado pelo meio externo, como também pelo meio interno, isto é, tudo que ocorre nas diversas regiões do corpo. As mudanças no meio externo são apreciadas de forma consciente, enquanto as mudanças no meio interno não tendem a ser percebidas conscientemente. Quando ocorrem mudanças no meio, e estas afetam o SN, são chamadas de estímulos. O SN, junto com o endócrino desempenha a maioria das funções da regulação do organismo, sendo que o sistema endócrino regula principalmente as funções metabólicas (AIRES, 1999; KANDEL; SCHWARTZ; JESSELL, 1991).

O SN divide-se em sistema nervoso periférico (SNP) e sistema nervoso central (SNC). O SNP tem duas divisões: o somático e o autonômico. A divisão somática inclui os neurônios sensoriais do feixe dorsal (posterior) que inervam pele, músculo esquelético, articulações, são responsáveis pela condução de informações do SNC para a musculatura, bem como informam a respeito do ambiente externo (fora do corpo). Já a divisão autonômica do SNP é responsável pela musculatura lisa, glândulas e vísceras. O sistema autonômico pode ainda ser sub-dividido em sistema simpático, parassimpático e entérico. O sistema simpático participa nas respostas do corpo ao estresse, prepara o organismo para uma emergência (fuga e luta) enquanto o parassimpático atua no processo de recuperação, para a manutenção da homeostase (digestão e repouso). Já o sistema entérico controla a função da musculatura lisa do intestino (AIRES, 1999; DIMITRIJEVIC, 1992; KANDEL; SCHWARTZ; JESSELL, 1991).

O SNC pode ser dividido em 6 principais regiões anatômicas que são: a) cérebro (hemisférios, hipotálamo, tálamo); b) cerebelo; c) tronco encefálico (mesencéfalo, ponte, bulbo); d) medula espinhal (Figura 01).

1.1.1 Medula espinhal

É a parte mais caudal do SNC. Ela se estende desde a base cranial até a primeira vértebra lombar (L1), não estando, entretanto, na totalidade do comprimento da coluna vertebral, geralmente terminando na borda caudal da vértebra L1, porém os feixes dorsal e ventral dos nervos lombar e sacral percorrem alguma distância antes de deixarem a coluna vertebral. Este grupo de feixes denomina-se *cauda eqüina*. A medula espinhal recebe informações sensoriais da pele, articulações e ME do tronco e dos membros superiores e inferiores e retorna com a resposta motora voluntária e reflexa adequadas. Ela também recebe informações sensoriais dos órgãos internos e tem pontos específicos de neurônios fora da coluna vertebral - os gânglios periféricos (Figura 02) , que controlam várias funções viscerais (AIRES, 1999; DIMITRIJEVIC, 1992; KANDEL; SCHWARTZ; JESSELL, 1991).

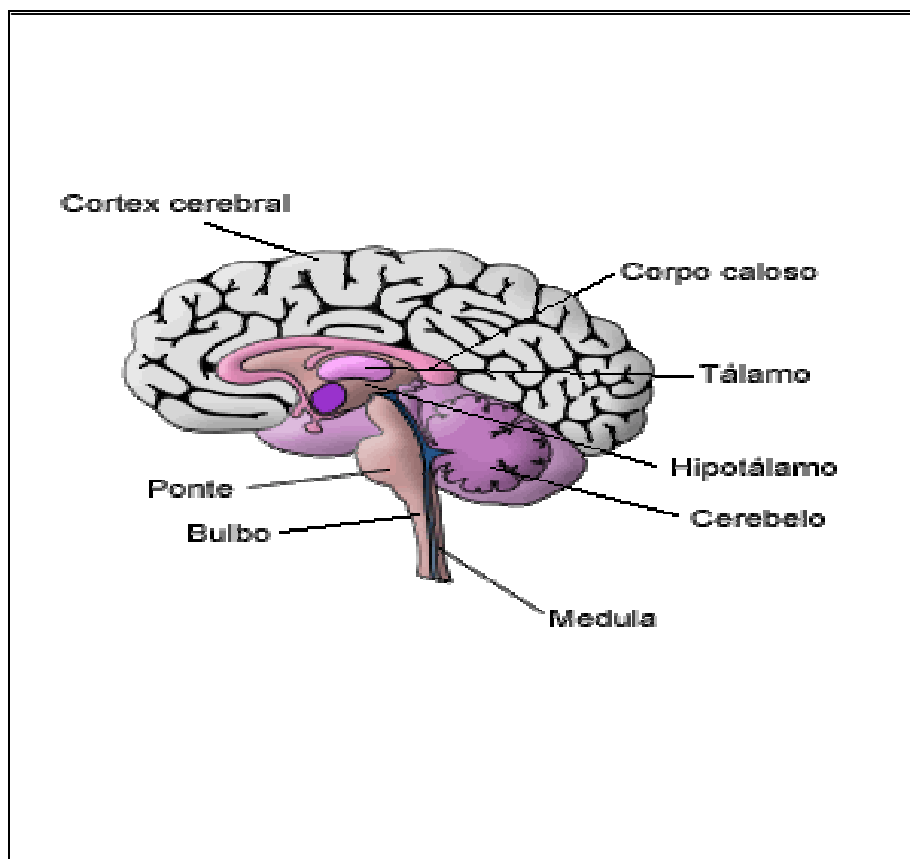


Figura 01 – Componentes do SNC

A medula espinhal tem segmentos externos bem evidenciados, os nervos medulares, e em humanos adultos encontram-se 31 pares. Os nervos são nomeadas de acordo com os forames intervertebrais através do qual elas entram e saem da coluna vertebral. Cada nervo está relacionado com a sensibilidade de uma área da pele, constituindo um dermatomo. Da mesma forma, o grupo de músculos inervado por um nervo constitui um miótomo. Enquanto um dermatomo geralmente representa uma área definida e contígua da pele, a maioria das raízes inervam mais que um músculo, e a maioria dos músculos são inervados por mais que uma raiz (DIMITRIJEVIC, 1992; KANDEL; SCHWARTZ; JESSELL, 1991; PRIESTLEY, 1987).

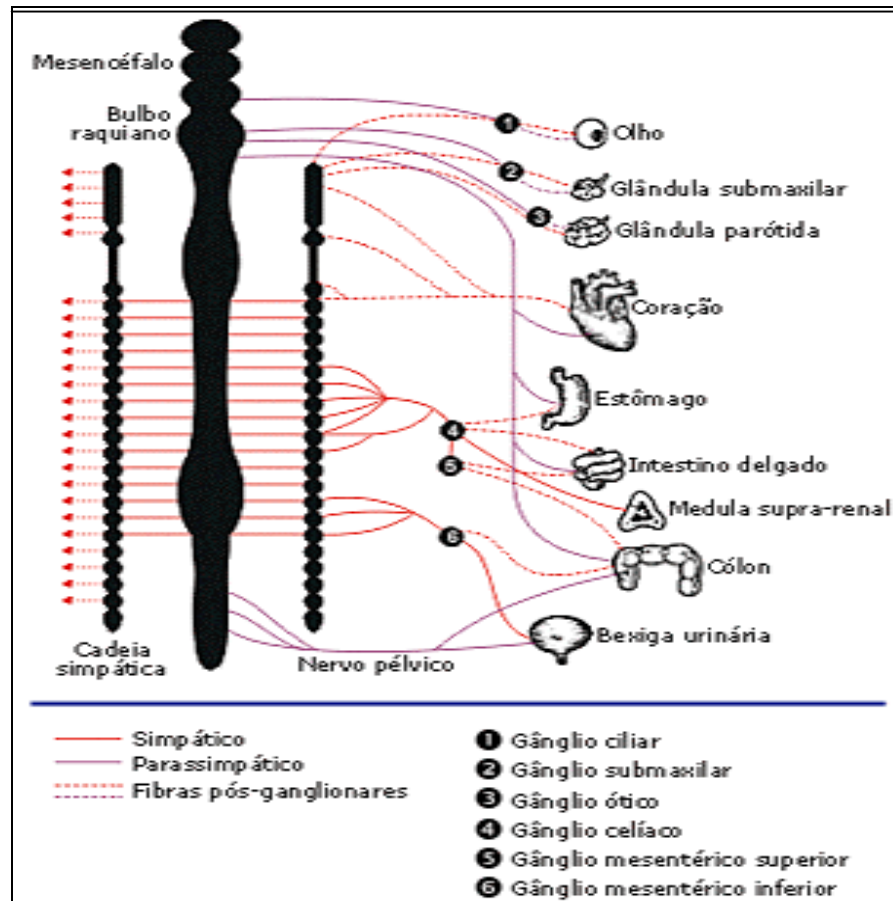


Figura 02 - Gânglios periféricos

Os nervos medulares são nervos periféricos formados pela junção de feixes dorsais (posteriores) e feixes ventrais (anteriores). Por meio dessa rede de nervos é que a medula se conecta com as várias partes do corpo, servindo de canal condutor, entre o cérebro e todo o corpo. Pelos feixes dorsais, são enviadas informações da medula espinhal provenientes da ME, pele e vísceras. Os feixes ventrais enviam informações através de axônios motores para a inervação muscular e inervação pré-ganglionar simpática e parassimpática (Figura 03). Dentro da medula espinhal encontra-se um conjunto altamente organizado de grupos celulares sensoriais que recebem informações vindas da periferia e grupos celulares motores que controlam grupos musculares específicos. Em adição a estes grupos celulares, a medula espinhal contém vias ascendentes ou aferentes através das quais informações

sensoriais alcançam o cérebro e também as vias descendentes ou eferentes, que enviam os sinais do cérebro para a musculatura esquelética (Figura 04), onde esses impulsos elétrico-químicos serão interpretados e traduzidos na forma de trabalho mecânico (AIRES, 1999; DIMITRIJEVIC, 1992; KANDEL; SCHWARTZ; JESSELL, 1991).

Histologicamente, a estrutura interna da medula espinhal varia nos diferentes níveis, e é dividida dentro de quatro principais regiões, e cada qual contém numerosos segmentos, que são oito segmentos cervicais (mesmo havendo apenas sete vértebras cervicais, isso porque o primeiro nervo cervical deixa o canal medular na posição mais cranial que a primeira vértebra cervical), doze segmentos torácicos, cinco segmentos lombares e cinco segmentos sacrais (nos demais segmentos, cada nervo espinhal segue a ordem numérica após cada vértebra, de maneira mais caudal à vértebra). Na medula espinhal pode-se observar duas colorações principais, as substâncias branca e cinzenta.

A primeira é formada por fibras mielínicas, oligodendrócitos, astrócitos fibrosos e células da micróglia. Na substância cinzenta encontramos corpos de neurônios, fibras amielínicas em grande quantidade e algumas fibras mielínicas, astrócitos protoplasmáticos, oligodendrócitos e células da micróglia. A cor característica da substância branca é consequência de sua riqueza em fibras contendo mielina, que é um complexo lipoprotéico esbranquiçado (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1979; KANDEL; SCHWARTZ; JESSELL, 1991).

Em cortes transversais da medula espinhal, a substância branca se localiza externamente e a cinzenta internamente, com a forma da letra “H”. O traço horizontal do “H” apresenta um orifício, corte do canal central da medula, revestido pelas células ependimárias. Este canal representa a luz do tubo neural embrionário. A substância cinzenta dos traços laterais do “H” forma os cornos anteriores que contém neurônios motores e cujos axônios dão origem às raízes ventrais do nervo raquidiano. Forma também os cornos posteriores, que recebem as fibras dos neurônios situados nos gânglios das raízes dorsais dos nervos espinhais (fibras sensitivas). Os neurônios da medula são multipolares e volumosos, principalmente os neurônios motores dos cornos anteriores, que atingem grandes dimensões (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1979; KANDEL; SCHWARTZ; JESSELL, 1991).

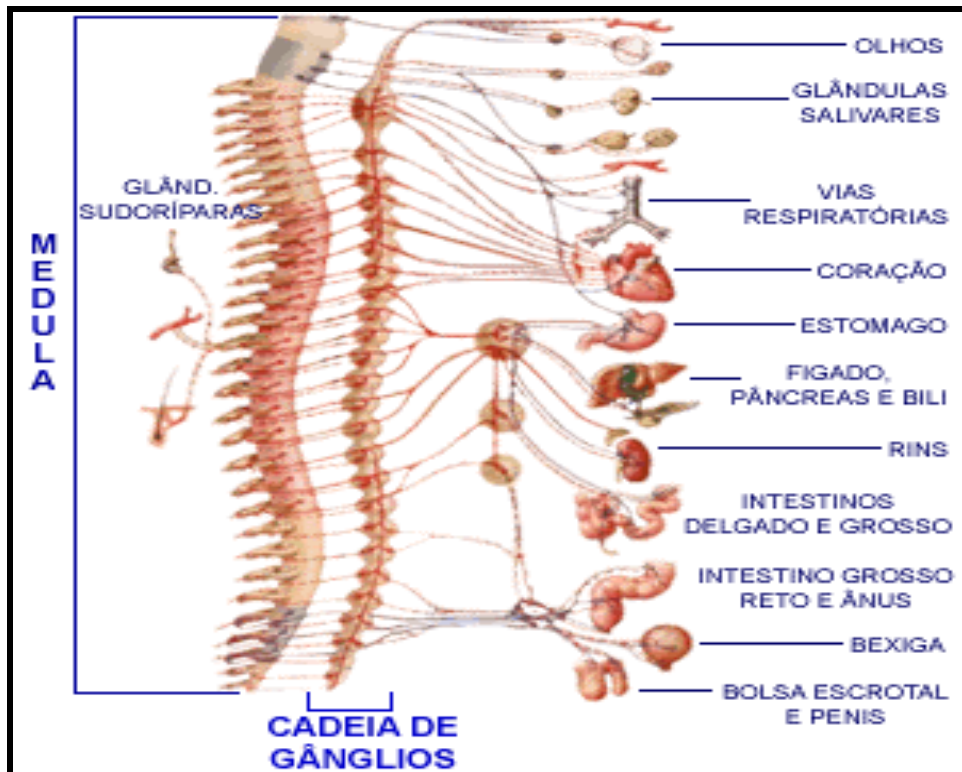


Figura 03 – Inervação pré ganglionar simpática e parassimpática

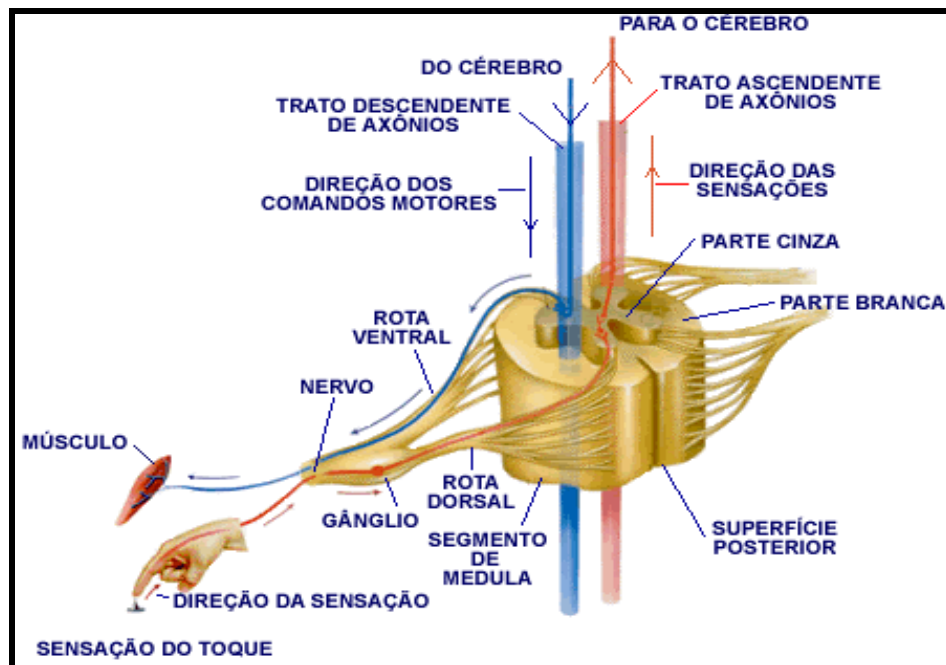


Figura 04 – direção dos comandos (motor e sensitivo)

A medula espinhal está contida e protegida no canal vertebral, sendo envolvida por membranas de tecido conjuntivo chamadas de meninges. As meninges são formadas por três camadas, que, de fora para dentro, são as seguintes: dura-máter, aracnóide e pia-máter (Figura 05).

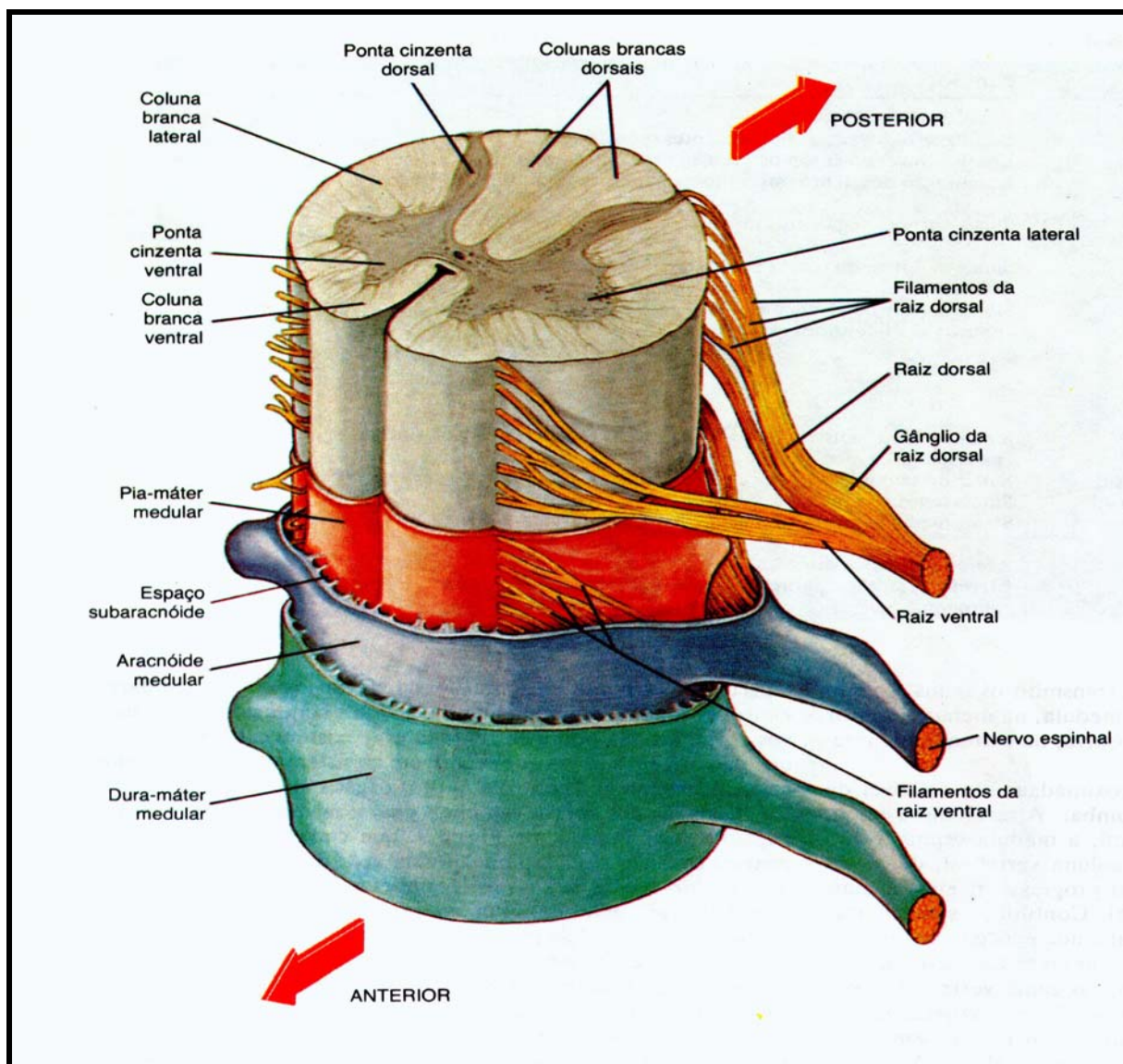


Figura 05 – A medula espinhal e sua estrutura geral

A dura-máter é a meninge mais externa, constituída por tecido conjuntivo denso, separada do perióstio das vértebras, formando-se entre os dois o espaço epidural. Este espaço contém veias de parede muito delgada, tecido conjuntivo frouxo e tecido adiposo. Em toda sua extensão, a dura-máter é separada da aracnóide, formando-se entre as duas o espaço sub-dural. A superfície interna da dura-máter e, na dura-máter do canal raquidiano, também a superfície externa são revestidas por um epitélio simples pavimentoso de origem mesenquimatosa (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1979; KANDEL; SCHWARTZ; JESSELL, 1991).

A membrana aracnóide apresenta duas partes, uma em contato com a dura-máter e sob forma de membrana, e outra constituída por traves que, partindo da aracnóide, ligam esta com a pia-máter. As cavidades entre as traves conjuntivas formam o espaço subaracnóideo, que contém líquido cefalorraquidiano e não tem comunicação com o espaço subdural. A aracnóide é formada por tecido conjuntivo sem vasos sangüíneos e suas superfícies são todas revestidas pelo mesmo tipo de epitélio simples pavimentoso, de origem mesenquimatosa, que reveste a dura-máter. A aracnóide da medula espinhal contém menor número de pilares de ligação com a pia-máter, de modo que as duas membranas se destacam melhor do que no encéfalo (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1979; KANDEL; SCHWARTZ; JESSELL, 1991). A pia-máter é muito vascularizada e aderente ao tecido nervoso, embora não fique em contato direto com células ou fibras nervosas. Entre a pia-máter e os elementos nervosos situam-se prolongamentos das células da neuroglia, que, formando uma camada muito delgada, se unem firmemente à face interna da pia-máter. A pia-máter segue todas as irregularidades da superfície do sistema nervoso central e penetra no tecido nervoso por certa extensão, juntamente com vasos sangüíneos. Sua superfície externa é revestida por células achatadas, originadas do mesênquima. Os vasos sangüíneos penetram no tecido nervoso por meio de túneis revestidos por pia-máter, os espaços perivasculares. A pia-máter que segue os vasos sangüíneos desaparece antes que estes se transformem em capilares. Os capilares do tecido nervoso são totalmente envolvidos por expansões dos prolongamentos das células da neuroglia, não havendo contato direto entre os neurônios e os capilares (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1979; KANDEL; SCHWARTZ; JESSELL, 1991).

1.2 Lesão medular

1.2.1 Definição

Lesão medular (LM) é a redução ou perda da função motora e/ou sensitiva devido a danos do tecido nervoso e seus elementos, na medula espinhal, em determinado segmento vertebral (FIGONI, 1993).

Como descrito anteriormente, a medula espinhal é parte integrante do sistema nervoso central (SNC) e providencia a comunicação sensório-motora entre o cérebro e a periferia. Em adição, também auxilia na regulação de funções como a respiração, a circulação, o controle térmico, a micção, a digestão, atividade sexual (ASCÂNIO LAURO, 1997; DIMITRIJEVIC, 1992; KANDEL; SCHWARTZ; JESSELL, 1991; PRIESTLEY, 1987), além de participação fundamental controle endócrino, regulação do metabolismo e da imunocompetência (CASTELLANI et al, 2001; CAMPAGNOLO; BARTLETT; KELLER, 2000; CAMPAGNOLO et al.; 1994).

No momento que, por algum motivo, essa comunicação é interrompida afetando a condução dos sinais sensitivos e/ou motores, total ou parcialmente, caracteriza-se como disfunção da medula espinhal, ou lesão medular (FIGONI, 1993; SCHMITZ, 1993).

As duas principais conseqüências da LM são a disfunção do sistema nervoso autonômico e a paralisia dos músculos e perda da sensibilidade inervadas pelo segmento lesado e imediatamente abaixo deste nível. Em adição, o lesado medular convive com uma série de fisiopatologias secundárias, tais como, disreflexia autonômica, perda do controle esfinteriano, hipotensão postural, disfunção da termoregulação, osteoporose, hipotrofia da musculatura esquelética, assim como disfunção dos sistemas neuro-endócrino-metabólico-imunitário, decorrentes da interrupção do fluxo neural e que podem direcionar à obesidade, problemas cardíacos, circulatórios, diabetes, baixa tolerância ao exercício devido à fadiga acentuada do ME e imunodepressão (BAO; LIU, 2003; BICKEL et al., 2003; JEON et al., 2003; PRICE; CAMPBELL, 2003; WECHT et al, 2003; WINSLOW; JACOBS; TEPAVAC, 2003; HULSEBOSCH, 2002; JACOBS et al., 2002a; JEON et al., 2002; LEE et al., 2002; LEMAN; SEQUEIRA, 2002; ZOICO; ROUBENOFF, 2002; KELLER; HUANG; MARKESBERY, 2000; BAUMAN; SPUNGEN, 2001; DURÁN et al., 2001; JACOB et al., 2001; KUZEYLI et al., 2001; SAFARINEJAD, 2001; DUROZARD;

GABRIELLE; BAVEREL, 2000; LEMAN; BERNET; SEQUEIRA, 2000; BAUMAN et al., 1999; CASTRO et al., 1999; ROBERTS et al., 1998; ASCÂNIO LAURO, 1997, TAOKA et al., 1997; FAROOQUE et al., 1996a, FAROOQUE et al., 1996b; OSBORN; TAYLOR; SCHRAMM, 1990; BAUMAN; SPUNGEN, 1994b).

1.2.2 Etiologia

Etiologicamente a LM pode ser dividida em lesões não-traumáticas e traumáticas, sendo a segunda, de longe a causa mais freqüente de lesões. Dentre as causas da LM não-traumática encontram-se patologias como disfunções vasculares devido à má formação venosa/arterial, subluxação vertebral secundária à artrite reumatóide, infecções como sífilis ou mielite transversa, neoplasias espinhais, abscessos da medula espinhal, herpes, doenças neurológicas como esclerose múltipla e esclerose lateral amiotrófica (SCHMITZ, 1993). Não há estatísticas precisas da incidência de LM por motivos não traumáticos, porém estima-se que respondam de 20% à 30% dos casos (www.spinalcord.org, 2004; www.asia-spinalinjury.org, 2004).

Nas LM causadas por trauma, em torno de 70%, encontra-se acidentes com armas de fogo, acidentes de trânsito, quedas e mergulhos em locais rasos, principalmente. Também relata-se casos com injúrias desportivas e a ferimentos penetrantes que não arma de fogo (SCHMITZ, 1993).

De acordo com o Censo 2000 promovido pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística-IBGE, 24,5 milhões (14,5%) de brasileiros possuem algum tipo de deficiência, não havendo dados oficiais para os portadores de lesão medular. Entidades como a Associação de Assistência à Criança Deficiente (AACD) e a Rede Sarah de Hospitais de Reabilitação, divulgaram relato estimando que 7.000 pessoas por ano são vítimas de lesão medular traumática, subtraídos desse número as pessoas que não resistem ao trauma e vão a óbito (www.aacd.org.br, 2004; www.sarah.br, 2004).

Dados da *National Spinal Cord Injury Association* (NSCIA) e *American Spinal Injury Association* (ASIA) – duas das principais entidades americanas fomentadoras de informações sobre lesão medular – dão idéia mais precisa da etiologia da lesão. Elas afirmam que 11.000 pessoas por ano são acometidas de lesão medular traumática, em que 50% dessas pessoas estão na faixa etária entre 16 e 30 anos e

do total de lesões, 48% resultam em tetraplegia (www.spinalcord.org, 2004; www.asia-spinalinjury.org, 2004).

1.2.3 Classificação

O grau de severidade das complicações imediatas e decorrente da lesão inicial depende do nível de lesão (paraplegia ou tetraplegia) e do grau de extensão (completa ou incompleta) da lesão (CHEN; COHEN; HALLET, 2002; ASCÂNIO LAURO, 1997; UNPHRED, 1994; FIGONI, 1993; SCHMITZ, 1993).

O nível da lesão é definido como sendo o nível mais caudal, cujas funções sensitiva e motora estão normais bilateralmente. Assim uma paraplegia L1 indica que os dermatomos e miótomos abaixo da raiz de L1 estão afetados. Nas lesões completas, pode-se encontrar dermatomos e miótomos parcialmente inervados em até três segmentos caudais abaixo do nível da lesão. Quando há preservação de função motora e/ou sensitiva mais inferior que três níveis abaixo do nível da lesão, esta é considerada incompleta (CHEN; COHEN; HALLET, 2002; ASCÂNIO LAURO, 1997; UNPHRED, 1994; FIGONI, 1993; SCHMITZ, 1993).

Então, como critério de classificação, encontramos os seguintes conceitos e definições:

1.2.3.1 Nível neurológico da lesão

Refere-se ao segmento metamérico mais caudal, com as funções sensitiva e motora intactas bilateralmente do corpo (figura 06). Subdivide-se em tetraplegia e paraplegia:

Tetraplegia

Diz respeito à paralisia parcial ou completa dos quatro membros e do tronco, inclusive os músculos respiratórios e órgãos pélvicos, sendo resultante das lesões da medula cervical (C1 - C7), que por sua vez também pode ser subdividida em:

Tetraplegia alta: se o segmento lesado compreender de C1 até C5

Tetraplegia baixa: se o segmento lesado compreender de C6 até C7

Paraplegia

Refere-se à paralisia parcial ou completa do tronco, ou parte do tronco, e de ambos os membros inferiores, sendo resultante de lesões da medula espinal torácica ou lombar, ou das raízes sacrais (T1 - T12, L1 - L5 e Sc1 - Sc5). Também para fins de classificação subdivide-se em:

Paraplegia alta: se o segmento lesado compreender de T1 até T6

Paraplegia baixa: se o segmento lesado compreender de T7 até S5

1.2.3.2 Extensão da lesão:

O grau de extensão da lesão na medula espinal pode ser completo ou incompleto, dependendo da área afetada do tecido nervoso:

Lesões completas: numa lesão completa, não há funções motoras ou sensitivas abaixo do nível da lesão. Ela é causada por uma transecção completa, compressão grave, ou intensa deterioração vascular à medula.

Lesões incompletas: caracterizam-se pela preservação de alguma função sensitiva ou motora abaixo do nível da lesão. Esta preservação da função indica que algum tecido nervoso viável está cruzando a região lesionada, para segmentos mais distais. Frequentemente as lesões incompletas são decorrentes de contusões produzidas por pressão sobre a medula, exercida por osso e/ou tecidos moles deslocados, ou pelo edema situado no interior do canal vertebral.

Nas lesões completas, quanto mais alto for o local da lesão, maior e mais abrangente serão as perdas das funções motora, sensitiva e autonômica (CHEN; COHEN; HALLET, 2002; ASCÂNIO LAURO, 1997; UNPHRED, 1994; FIGONI, 1993; SCHMITZ, 1993), como veremos a seguir.

Nível da Lesão e Extensão da Paralisia

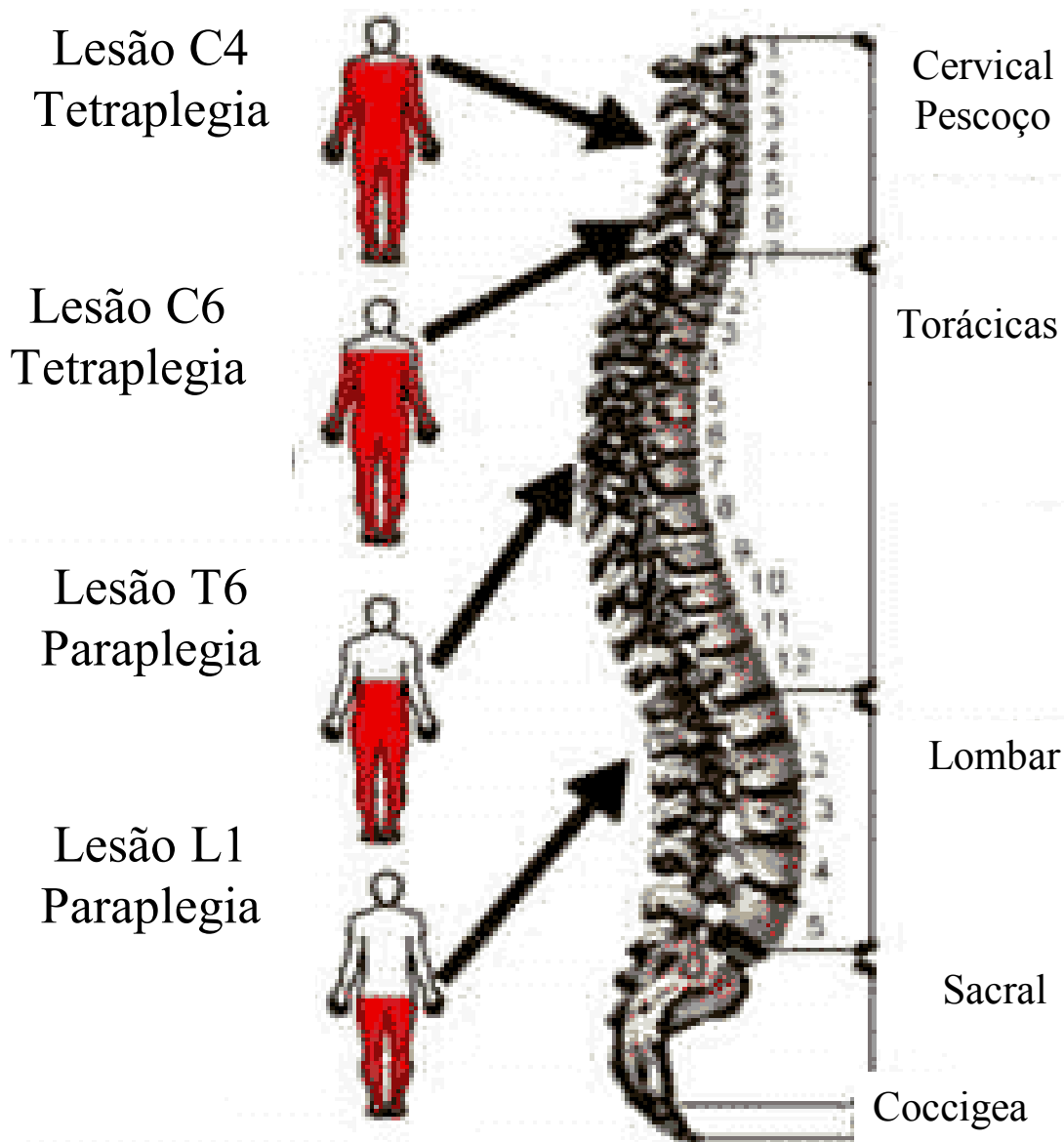


Figura 06 – Nível neurológico da lesão medular

1.2.4 Fisiopatologias

Conforme já descrito, as duas principais conseqüências da LM são a disfunção do sistema nervoso autonômico e a paralisia dos músculos e perda da sensibilidade inervadas pelo segmento lesado e imediatamente abaixo deste nível, porém essas duas características da LM contribuem para o surgimento de uma série de fisiopatologias secundárias, que de acordo com sua maior ou menor gravidade direcionam os indivíduos portadores de lesão medular à uma queda drástica na qualidade de vida, inclusive com altas taxas de óbito.

A perda de controle supra espinal dos sistemas simpático e parassimpático sacral, encontrado, principalmente nas lesões cervicais e torácicas altas força o indivíduo lesado a passar por vários ajustes fisiológicos, entre eles adaptações neurológicas, metabólicas, endócrinas e da função imunitária, que podem durar dias, meses ou até mesmo anos. Com relação à perda de massa ME, autores tem relacionado essa perda devido à desnervação como crítica para o surgimento de patologias como obesidade, cardiopatias, arteriopatas, diabetes, baixa tolerância ao exercício (ou as atividades de vida diária) e comprometimento da manutenção imunitária (BAO; LIU, 2003; BICKEL et al., 2003; FURUSAWA et al., 2003; JEON et al., 2003; PRICE; CAMPBELL, 2003; WECHT et al, 2003; WINSLOW; JACOBS; TEPAVAC, 2003; HULSEBOSCH, 2002; JACOBS et al., 2002; JEON et al., 2002; LEE et al., 2002; LEMAN; SEQUEIRA, 2002; KELLER; HUANG; MARKESBERY, 2000; BAUMAN; SPUNGEN, 2001; DURÁN et al., 2001; JACOB et al., 2001; KUZEYLI et al., 2001; SAFARINEJAD, 2001; WU; WILLIAMS; 2001; DUROZARD; GABRIELLE; BAVEREL, 2000; LEMAN; BERNET; SEQUEIRA, 2000; MACKINNON, 2000; MURAKI et al., 2000; BAUMAN et al, 1999; CASTRO et al., 1999; HJELTNES, 1998; ROBERTS et al., 1998; SCHIMD, 1998; ASCÂNIO LAURO, 1997, TAOKA et al., 1997; FAROOQUE et al., 1996a, FAROOQUE et al., 1996b; BAUMAN; SPUNGEN, 1994b; OSBORN; TAYLOR; SCHRAMM, 1990; LEVIN; MARTIN; NATELSON, 1980).

1.2.4.1 Histofisiopatologia

O tecido nervoso que compõe a medula espinhal, quando exposto à injúria, apresenta mudanças em suas características histológicas, e essas, variam de acordo com as diferentes fases da lesão, e são essas alterações em sua estrutura histológica que dão início a uma variedade de processos fisiopatológicos paralelos, influenciando no quadro geral do lesado medular (GWAK et al., 2003; POPOVICH; JONES, 2003; SUNG et al., 2003; YING et al., 2003; CHEN; COHEN; HALLET, 2002; HULSEBOSCH, 2002; POPOVICH et al., 2002; LIEBL et al., 2001; NASHMI; FEHLINGS, 2001; SCHWAB et al., 2001; SOBLOSKY; SONG; DINH, 2001; OEHLER et al., 2000; PLUNKETT et al., 2000; KIL et al., 1999; MARTIN et al., 1999; SCHIMD, 1998; LLEWELL-SMITH et al., 1997; TAOKA et al., 1997; WEAVER et al., 1997; WANG et al., 1996; BAUMAN et al., 1994a; DAS, 1989).

Histologicamente, existem 3 fases da lesão medular em resposta à injúria no que se refere ao tecido nervoso: a fase aguda, secundária ou semi-aguda e crônica. Essas fases também poderiam ser direcionadas quanto ao quadro geral do PLM

Na fase aguda, que compreende desde o momento do trauma até poucos dias após, uma variedade de processos patofisiológicos paralelos se iniciam. Do impacto inicial ou lesão, há um dano mecânico imediato no tecido nervoso e outros tecidos moles, incluindo células endoteliais dos vasos. Portanto, a necrose ou morte celular que resulta desse trauma mecânico e isquêmico é instantâneo, e, no local lesado, parece estar mais comprometida a substância cinzenta que a branca, medula espinhal, resultando em um anel de substância branca preservada. Em poucos minutos após o trauma, as células nervosas comprometidas respondem com bloqueio dos potenciais de ação, induzido pela agressão. Também verifica-se mudança significativa nas características eletrolíticas, principalmente em cátions mono e divalentes, que contribuem para a falência da função nervosa normal e indução de choque espinhal (concentração intracelular de Na^+ aumentada, concentração extracelular de K^+ aumentada e concentração intracelular de Ca^{2+} aumentado em níveis tóxicos), isso ocorre em até 24 horas pós-lesão e representa a interrupção e disfunção generalizada da comunicação da rede de neurônios no segmento lesado da medula espinhal. Ocorre hemorragia com edema localizado, perda da microcirculação por trombose, espasmo vascular e dano mecânico, e perda da autorregulação vascular, fatos esses que, posteriormente, agravam o quadro do

tecido nervoso lesado. Em adição, a compressão da medula espinhal ocorre devido à deslocamento da vértebra, seguida de edema e posterior respostas celulares.

Na fase secundária ou semi-aguda (que ocorre no decorrer de minutos até semanas), a morte celular por isquemia, mudanças eletrolíticas e edema continuam da fase aguda. Nos primeiros 15 minutos após a lesão, as concentrações extracelulares de glutamato e outros aminoácidos excitatórios alcançam concentrações citotóxicas que vão de 6 à 8 vezes dos valores normais. Isso é resultado da lise celular por causa do trauma mecânico e do transporte sináptico e não-sináptico. Em adição, peroxidação lipídica e produção de radicais livres também podem ocorrer como resultado dos receptores para glutamato estarem ativados e conseqüentemente suas vias mediadoras. Ocorre então a apoptose (uma morte celular programada secundária, diferente da necrose). Dentro de 24 horas, neutrófilos invadem o parênquima espinhal provenientes do sistema circulatório, seguidos de linfócitos (os quais secretam uma variedade de citocinas e fatores de crescimento) que alcançam seu pico dentro dessas 24 horas. A invasão de células inflamatórias aumentam a concentração local de citocinas e quimiocinas. Em adição, fatores inibitórios à regeneração estão expressos no local da perilesão. A lesão cresce em tamanho à partir do núcleo da injúria, com o risco de aumentar o número de morte celular para a região periférica à lesão, aumentando a extensão da lesão.

Finalmente, na fase crônica, que pode durar dias à anos, a apoptose continua tanto na direção ascendente quanto descendente à injúria, incluindo o próprio cérebro. Uma variedade de receptores e canais de íons estão alterados em seus níveis de expressão e estado de ativação, continuando a aumentar a extensão da lesão. Essa contínua deterioração tecidual tem incidência em aproximadamente 25% dos casos em humanos com lesão medular (GWAK et al., 2003; POPOVICH; JONES, 2003; CHEN; COHEN; HALLET, 2002; HULSEBOSCH, 2002; SCHWAB et al., 2001; NASHMI; FEHLINGS, 2001; SOBLOSKY; SONG; DINH, 2001; OEHLER et al., 2000; PLUNKETT et al., 2001; KIL et al., 1999; MARTIN et al., 1999; LLEWELL-SMITH et al., 1997; TAOKA et al., 1997; WEAVER et al., 1997; BAUMAN et al., 1994; DAS, 1989).

1.2.4.2 Infecções

Infecção é principal causa de mortalidade e morbidade em indivíduos portadores de lesão medular (PLM) (CAMPAGNOLO; BARTLETT; KELLER, 2000; CAMPAGNOLO et al., 1994; CRUSE et al., 1992; LYONS, 1987). Entre elas podemos ressaltar às do trato urinário, respiratório e úlceras de pressão, e devido à esta alta taxa de infecções, a morte por septicemia é comum nesta população (SOMOGYI et al, 2003; MORTON, 2002; JACKSON; GROOMES, 1994; DeVIVO, 1989).

A incidência de infecções está relacionada com a re-hospitalização e interrupção na reabilitação e em praticantes de exercícios com LM, seja qual for seu objetivo, a interrupção da prática de sua atividade tem como consequência interferência direta e queda no desempenho e rendimento desportivo de sua modalidade (CAMPAGNOLO; BARTLETT; KELLER, 2000; LEVI, 1995; CAMPAGNOLO et al., 1994; CRUSE et al., 1992; LYONS, 1987).

Após 20 anos de investigação sobre a função imunitária em PLM, evidências tem se acumulado neste período, possibilitando desmistificar a origem da incidência de infecções em PLM, primariamente atribuída como mecânica, isto é, causadas meramente pela perda dos movimentos da massa muscular inervada pelo segmento lesado, e imediatamente abaixo, da coluna vertebral. De fato, ela é devida à complexa interação entre os sistemas nervoso central, imunitário e endócrino. O sistema imunitário em PLM, surpreendentemente, tem sido foco de pouquíssimas investigações (PAN et al., 2003; POPOVICH; JONES, 2003; SAFARINEJAD, 2001; CAMPAGNOLO; BARTLETT; KELLER, 2000, CAMPAGNOLO et al., 1994; CRUSE et al., 1992; LYONS, 1987).

Existem algumas linhas de pesquisa que evidenciam o SNC como modulador da função imunitária. Pesquisa feita com roedores, ADER e COHEN (1982) mostraram que a resposta imunitária foi afetada em animais expostos à condicionamento de estresse, quando comparados à outros animais que não tiveram estímulo.

Outra linha mostra que, lesões cerebrais produzidas eletrolíticamente por tumor cerebral, tanto em animais quanto em humanos, causaram imunossupressão. Estas pesquisas mostraram que lesões na região hipotalâmica deprimiram a resposta linfocitária a mitógenos *in vitro* (ROSZMAN et al., 1982; KELLER et al.,

1980). O mecanismo desta interação é complexo e não totalmente entendido. O hipotálamo pode comunicar-se periféricamente via eixo-hipotálamo-pituitária ou diretamente pelo sistema nervoso autonômico. Este último é um importante sistema efetuator, tendo sido demonstrado que situações de estresse podem influenciar na resposta imunitária em animais adrenalectomizados ou hipófisectomizados (CAMPAGNOLO; BARTLETT; KELLER, 2000; CAMPAGNOLO et al., 1994; CRUSE et al., 1992; LYONS, 1987).

Também especula-se que existe uma “inervação direta” dos órgãos linfóides primário e secundário pelos terminais nervosos simpáticos. No baço, terminais nervosos noradrenérgicos fazem contato direto com os linfócitos pela circulação (vasos) linfática. Tem-se demonstrado que os linfócitos possuem em sua superfície, receptores β -adrenérgicos, e esses respondem à estímulos das catecolaminas (CUNNICK et al, 1990; WHALEN; BANKHURST, 1990).

Indiferente às hipóteses descritas acima, os resultados relacionados à imunidade encontrados em populações com LM, quando comparados com sujeitos sem qualquer tipo de lesão no SNC, tendem à inibição da atividade linfocitária, redução na função das células matadoras naturais (*natural killer cells*), redução nas células T-auxiliadoras (*T-helper*) e redução da atividade macrofágica (NASH, 1994; CRUSE et al., 1992; NASH; FLETCHER, 1992; LYONS, 1987).

Mesmo com fortes indicadores da interação dos sistemas neuro-endócrino-imunitário, até o momento, não existem evidências experimentais conclusivas a respeito do papel do SNC nas respostas imunitárias em PLM, necessitando de mais pesquisas neste campo.

1.2.4.3 Disreflexia autonômica

A disreflexia autonômica é uma síndrome aguda de homeostase autonômica desordenada encontrada em aproximadamente 80% dos casos de tetraplegia e paraplegia, principalmente com lesão acima de T6, ocasionando uma resposta simpática maciça e generalizada dos hormônios secretados por essa inervação. Elas ocorrem como resultado de simpatectomia traumática secundária a uma lesão nesse nível e acima e se manifestam primariamente por reflexos autonômicos em massa sem inibição. Em geral, são desencadeados por estímulos proprioceptivos e nociceptivos aferentes da pele e vísceras abaixo do nível da lesão. Esses estímulos,

devido á perda de mecanismos de controle dos níveis superiores, resultam em ampla variedade de respostas simpáticas e parassimpáticas. A causa mais comum deste reflexo é a distensão da bexiga. Outros estímulos precipitantes são: distensão retal, cálculos urinários, infecções da bexiga, estímulos cutâneos nocivos, disfunção renal, irritação uretral ou da bexiga, e a alteração da temperatura ambiente. Já os sintomas da disreflexia autônoma são hipertensão, bradicardia, dores de cabeça (freqüentemente intensas e latejantes), sudorese profusa, aumento da espasticidade, irrequietude, vasoconstrição abaixo do nível da lesão, contração pupilar, congestão nasal, piloereção e visão embaçada, acidente vascular cerebral (AVC), derrame e morte (COLLINS; DICARLO, 2001; LEMAN; SEQUEIRA, 2002; SAFARINEJAD, 2001; LEMAN; BERNET; SEQUEIRA, 2000; JACOB et al., 2001; KARLSSON et al.; 1998; KRENZ; WEAVER, 1998; JANSEN, 1994, OSBORN; TAYLOR; SCHRAMM, 1990).

1.2.4.4 Úlceras de Pressão

Úlceras de pressão são ulcerações do tecido mole (pele ou tecido subcutâneo) causados por pressão não aliviada e por forças de atrito. Estas úlceras estão sujeitas à infecção e podem migrar até o osso. As úlceras de pressão são complicações clínicas, causadoras de retardo na reabilitação e podem levar até a morte. A função sensorial prejudicada e a incapacidade de fazer alterações apropriadas na posição são os dois fatores mais influentes no surgimento de úlceras de pressão. As úlceras de pressão surgirão sobre qualquer proeminência óssea sujeita à pressão excessiva. Entre os locais mais comuns de envolvimento estão o sacro, calcanhares, trocanteres e ísquio (JONES et al., 2003; UMPHRED, 1994)

1.2.4.5 Hipotensão postural

É queda na pressão sangüínea, ocorrente quando um paciente é deslocado da posição horizontal para a posição vertical. É provocada pela perda do controle simpático de vasoconstrição. O problema é complicado pela ausência de tônus muscular, causando a acumulação sangüínea no leito esplâncnico e venoso periférico. Também podem ocorrer redução do fluxo sangüíneo cerebral e a diminuição do retorno venoso ao coração (WECHT et al., 2003; JACOBS et al., 2002a; UMPHRED, 1994).

1.2.4.6 Contraturas

Os tecidos conectivos e musculares mostram a propriedade de encurtamento progressivo quando não são alongados regularmente por uma força de oposição. Essas forças ocorrem em todas as articulações com movimentos cotidianos normais. Com paralisia flácida ou com hipertonicidade resultante da lesão medular, a oportunidade para manter a amplitude de movimento normal é ameaçada. Os efeitos da gravidade sobre as articulações flácidas e a falta de forças opositoras sobre uma articulação, por exemplo, quando há espasticidade flexora, podem progredir rapidamente àquela estrutura articular para o desenvolvimento de uma contratura. As contraturas ocorrem mais freqüentemente nos grupos musculares flexores e geralmente combinam-se com adução e rotação interna nas articulações do ombro e do quadril. Elas podem levar a complicações secundárias; por exemplo, contraturas em flexão da articulação do quadril podem levar a postura assimétrica ao sentar, com um potencial secundário para escoliose e formação de úlceras de pressão no ísquio (JACOBS et al., 2002c; ROBERTS et al., 1998; SCHMITZ, 1993).

1.2.4.7 Osteoporose e Cálculos Renais

Alterações no metabolismo do cálcio após uma LM levam à osteoporose abaixo do nível da lesão, e ao desenvolvimento de cálculos renais. Normalmente há equilíbrio dinâmico entre a atividade de reabsorção óssea dos osteoclastos e o papel dos osteoblastos de "construir" osso novo. Após uma LM, há perda líquida de massa óssea, à medida que ocorre reabsorção maior, relativamente à velocidade de neoformação óssea. Conseqüentemente há suscetibilidade maior à fratura. Em decorrência desta reabsorção, há grandes concentrações de cálcio presentes no sistema urinário (hipercalciúria), criando predisposição para a formação de cálculos (CHEN et al., 2002; CHEN; DeVIVO; LLOYD, 2001).

A maior incidência de alterações na massa óssea e de hipercalciúria ocorre durante os seis primeiros meses após a LM. Após este período, as alterações gradualmente diminuem e assumem nível mais baixo porém constante após aproximadamente um ano (BAUMAN; GARLAND; SCHWARTZ, 1997; ROBERTS et al., 1998; UNPHRED, 1994; SCHMITZ, 1993).

O mecanismo exato causador das alterações da massa óssea após a paralisia não está claramente entendido. Todavia, a imobilidade e a ausência de tensão aplicadas sobre o sistema esquelético através de atividades de sustentação dinâmica de peso são bem aceitas como fatores contributivos importantes (BAUMAN; GARLAND; SCHWARTZ, 1997; GARLAND et al., 1994; UMPHRED, 1994; SCHMITZ, 1993; BIERING-SORENSEN; BOHR; SCHAADT, 1988; BERGMANN et al., 1977).

1.2.4.8 Comprometimento na Regulação Térmica

PLM com lesões acima de T1, conforme, tem comprometimento da regulação térmica, especialmente durante a fase aguda da recuperação, podendo prolongar-se durante alguns anos. Essa inabilidade para regular a temperatura corporal em resposta a extremos de temperatura ambiental ocorre de duas maneiras. Com lesão nesse nível, a conexão entre os centros reguladores de temperatura no hipotálamo e o fluxo simpático da medula, que provoca vasoconstrição e sudorese, é impedida. Segundo, a lesão dos tratos motores pode impedir a ocorrência de arrepios (UNPHRED (1994; SCHMITZ, 1993). Os mecanismos reguladores de temperatura parecem melhorar com o tempo, embora indivíduos tetraplégicos geralmente retenham a habilidade prejudicada para controlar a temperatura corporal quando confrontada com extremos ambientais (PRICE; CAMPBELL, 2003; REITZ et al., 2002; NAIR et al., 2001).

1.2.4.9 Disfunção Cardiorespiratório

Na publicação de FIGONI (1992), há relatos de que a maioria dos PLM paraplégicos de nível alto e os tetraplégicos têm de lidar com diminuição na função respiratória a partir do momento da lesão que eventualmente leva a função cardiorespiratória, em longo prazo, significativamente diferente de seu estado pré-mórbido. Esse estado alterado corresponde em gravidade ao nível da lesão; PLM de nível alto podem também incorrer em alta incidência de mortalidade devido a causas pulmonares, ou seja, broncopneumonia e embolia pulmonar.

Dependendo do nível da lesão, a ineficiência respiratória do PLM tetraplégicos e paraplégico de nível alto podem ser vista como representante de dois problemas primários. O primeiro é a diminuição na ventilação inspiratória. À medida

que o nível da lesão sobe, os dois grupos musculares primários responsáveis pela inspiração (o diafragma e os intercostais) são progressivamente perdidos, começando com os intercostais no nível de T11. A habilidade do PLM para ventilar os pulmões torna-se descortinada, e os músculos acessórios da respiração progressivamente entram em ação. O segundo é a diminuição na pressão expiratória. Novamente, com lesão ascendente, os dois grupos primários da expiração (os abdominais e intercostais internos) são progressivamente perdidos, começando com os abdominais no nível de T12. Embora a expiração normal em repouso seja processo passivo causado pelas propriedades elásticas dos pulmões e tórax, iniciando com as lesões no nível de T12 e acima, a expiração torna-se processo cada vez mais ativo e eventualmente cansativo. Isso é resultado de dois fatores. Os músculos abdominais são progressivamente perdidos à medida que o nível da lesão sobe, e eles deixam de sustentar as vísceras empurrando o diafragma. O diafragma então assume uma posição anormal baixa durante o repouso ou posição relaxada dentro da cavidade torácica. Como o papel do diafragma é ser passivamente empurrado para cima pelos abdominais em contração para assistir na expiração forçada, esse estado de repouso mais baixo precipita diminuição no volume de reserva expiratória do PLM. O segundo fator é que com a perda dos intercostais internos cujo papel na expiração é a depressão da caixa torácica, a habilidade do PLM para forçar o ar dos pulmões durante a respiração fica comprometida (JACOBS et al., 2003; JACOBS et al., 2002b; JACOBS et al., 2002c; WANG et al., 2002; WHEELER et al., 2002; NOREAU; SHEPARD, 1995).

A má ventilação dos pulmões combinada com o uso aumentado de músculos acessórios da respiração resulta em diversos problemas sistêmicos agudos e crônicos. O resultado imediato é a diminuição da oxigenação do sangue com diminuições gerais subseqüentes na eficiência metabólica e funcional. Isso ainda é mais complicado pelo trabalho envolvido em padrões descoordenados de respiração. O resultado final é a habilidade significativamente diminuída para qualquer prática de exercícios físicos (OLIVE et al., 2004; BICKEL et al., 2003; OLIVE; DUDLEY; MCCULLY, 2003; JACOBS et al., 2002b; WANG et al., 2002; LEGRAMANTE, et al., 2001; JACOBS; NASH; RUSINOWSKI, 2000).

Estudos demonstraram que a capacidade de trabalho em PLM pode ser limitada pela perda de músculos funcionais e pelo controle simpático. A debilidade

de controle de funções pelo sistema nervoso simpático limita o controle do fluxo sanguíneo e o débito cardíaco, afetando a frequência cardíaca máxima após uma LM. Devido à disfunção do sistema nervoso simpático, insuficiência venosa periférica, seqüestro do volume sanguíneo, inabilidade no retorno venoso, redistribuição sanguínea limitada em atividades musculares, habilidade diminuída para sobrecarga do sistema cardiovascular, pico de VO₂ MÁX. limitado por fatores periféricos, decréscimo circulatório no volume sanguíneo, hipotensão ao realizar exercícios e inadequado fluxo sanguíneo muscular em exercícios (MIZUSHIMA et al., 2003; OLIVE; DUDLEY; MCCULLY, 2003; WINSLOW; JACOBS; TEPAVAC, 2003; WANG et al., 2002; NOREAU; SHEPARD, 1995; FIGONI, 1992; HOFFMAN, 1986). Os resultados determinados por DURÁN et al. (2001) indicam que a VO₂ máx. está em proporção inversa ao nível da lesão, isto é, quanto maior o nível da lesão, menor os níveis de VO₂ máx.

1.2.4.9 Sedentarismo e mudança no estilo de vida

Uma característica muito comum em PLM, é a mudança radical de estilo de vida levando ao sedentarismo. Esse típico comportamento vem agravar os estados patológicos já vistos e alguns motivos que o levam é o estado psicopatológico, retardo na iniciação da reabilitação, problemas de ordem física, oferta inadequada de condições de transporte e locomoção em vias públicas e o aspecto social (JACOBS et al., 2003; BOUGENOT et al, 2003; PUTZKE, 2002; DURAN et al., 2001; JACOBS; NASH, 2000; NOREAU; SHEPARD, 1995; FIGONI, 1992).

1.3 Glutamina

A glutamina é um aminoácido de 5 átomos de carbonos, que em pH fisiológico, apresenta o grupo carboxila carregando uma carga negativa, enquanto que o grupo amino está protonado, resultando numa molécula de carga zero, sendo assim, classificado como um aminoácido neutro (NEU et al., 1996).

A glutamina é o mais abundante aminoácido livre no músculo e no plasma humano, sendo também encontrado em concentrações relativamente altas em vários tecidos humanos. No músculo, seu conteúdo intracelular corresponde a 50-60% do total de aminoácidos livres (NIEMAN; PEDERSEN, 1999; KOYAMA et al., 1998;

WALSH et al., 1998a). Aproximadamente 80% da glutamina corporal encontra-se no músculo esquelético, sendo esta concentração 30 vezes superior à do plasma (SCHEPPACH et al., 1994). No plasma, a glutamina constitui aproximadamente 20% do total de aminoácidos livres, sendo que após um jejum noturno, a concentração plasmática encontra-se entre 500 e 750 $\mu\text{mol/L}$, sendo esta dependente do balanço entre a liberação e captação de glutamina pelos vários órgãos e tecidos do corpo. Estudos realizados com músculo esquelético de ratos têm demonstrado que os estoques de glutamina são três vezes mais elevados em fibras musculares do tipo 1 do que em fibras do tipo 2 (ROWBOTTOM; GREEN, 2000; WALSH et al., 1998a).

A glutamina está envolvida na transferência de nitrogênio entre órgãos; detoxificação de amônia; manutenção do balanço ácido-base durante a acidose; possível regulador direto da síntese e degradação protéica; precursora de nitrogênio para a síntese de nucleotídeos; necessária para o crescimento e diferenciação celular; veículo de transporte de cadeia carbônica entre os órgãos; fornece energia para células de rápida proliferação, como enterócitos e células do sistema imunitário; age como precursora da ureogênese e gliconeogênese renal, e de mediadores, como o GABA e glutamato; promove melhora na permeabilidade e integridade intestinal; aumenta a resistência à infecção por aumento da função fagocitária; e fornece energia aos fibroblastos, aumentando a síntese de colágeno (KREIDER, 1999; VASCONCELOS; TIRAPEGUI, 1998).

A diminuição das concentrações plasmáticas de glutamina aliada ao aumento do metabolismo deste aminoácido ocorre, de modo marcante, em muitas doenças catabólicas. Estas características indicam que a classificação da glutamina de um aminoácido não essencial, para um nutriente condicionalmente essencial foi reconsiderada (SMITH, 1990).

Dentre os órgãos envolvidos na síntese de glutamina incluem-se o músculo esquelético, pulmões, fígado, cérebro e possivelmente o tecido adiposo. Os principais consumidores são células do sistema imunitário, rins e intestino. Sob certas condições, tal como reduzido aporte de carboidratos, o fígado pode tornar-se um sítio consumidor de glutamina (figura 07) (WALSH et al., 1998b).

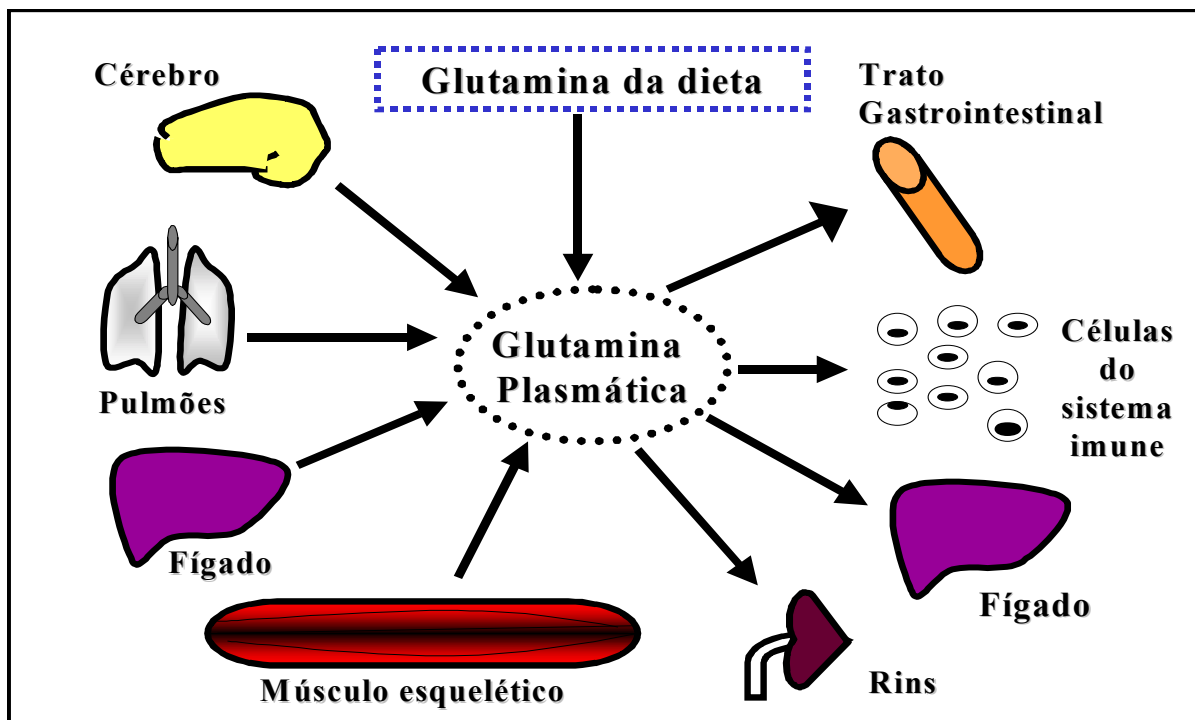


Figura 07 – Produção e utilização de glutamina por diversos tecidos e órgãos do organismo.

As duas principais enzimas intracelulares do metabolismo da glutamina são: as enzimas glutamina sintase e glutaminase. A primeira é responsável pela reação que catalisa a conversão de glutamato mais amônia à glutamina, na presença de ATP, conforme demonstrado na figura 08. A segunda, a enzima glutaminase, é responsável pela hidrólise da glutamina, convertendo-a em glutamato e amônia, conforme observado na figura 09 (DI PASQUALE, 1997). Quanto à localização intracelular verifica-se que a glutamina sintase é encontrada primariamente no citossol, enquanto que a glutaminase, na sua forma ativa, apresenta-se principalmente na mitocôndria. Essas localizações são compatíveis com as funções dessas enzimas: glutaminase catalisando a utilização de glutamina como fonte de energia e glutamina sintetase produzindo glutamina para síntese de proteínas citoplasmáticas e nucleotídeos (NEU et al., 1996).

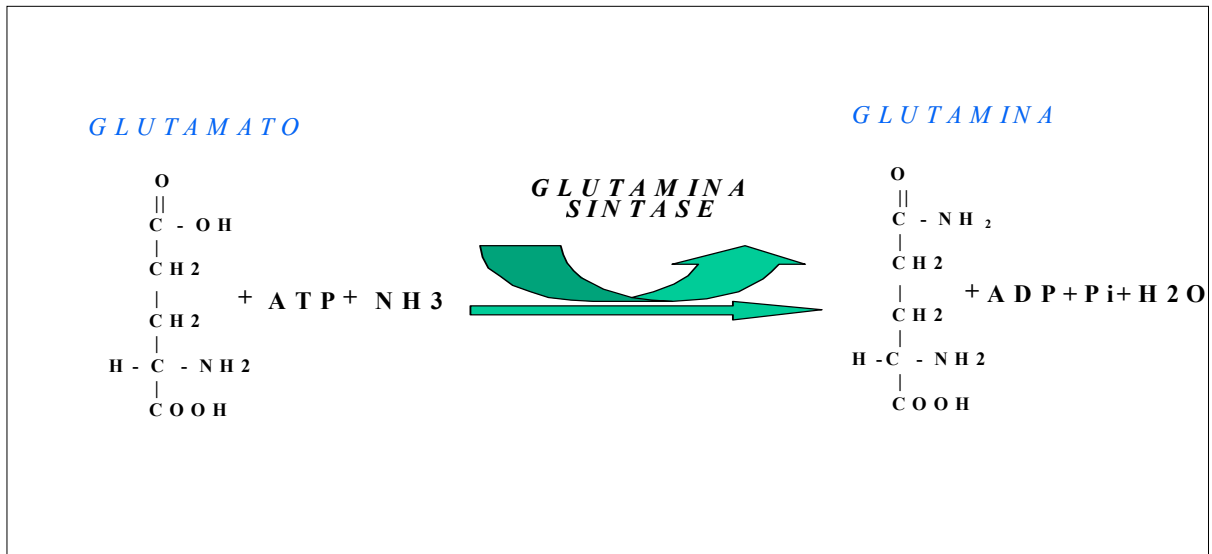


Figura 08 – Síntese de glutamina catalisada pela enzima glutamina sintase

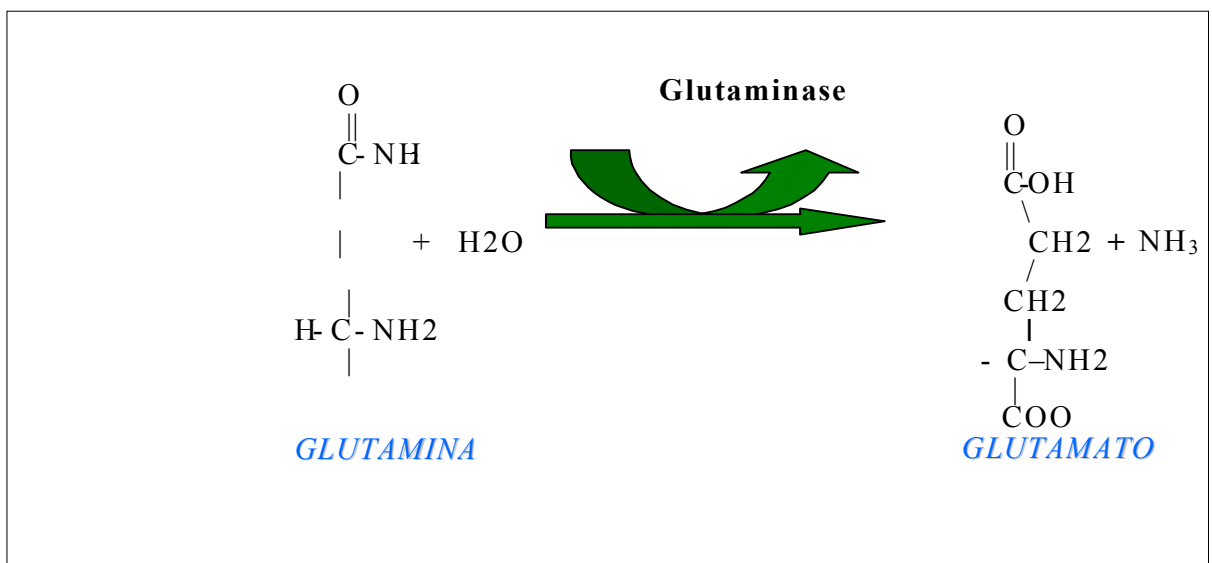


Figura 09 – Hidrólise da glutamina pela enzima glutaminase

1.3.1 Glutamina e SNC

No SNC, assim como na maioria dos sistemas, os aminoácidos são importantes para manutenção da concentração de nitrogênio no tecido. O acúmulo tanto de aminoácidos como de amônia, uma anomalia comum em distúrbios hepáticos e em muitos erros inatos do metabolismo, freqüentemente resulta em disfunção neurológica e, em vários casos, em danos cerebrais irreversíveis. Da mesma forma, períodos prolongados de inanição podem comprometer o fornecimento completo de aminoácidos, que são importantes para a síntese de proteínas cerebrais. No sistema nervoso, a manutenção de compostos nitrogenados adquire importância que vai além das necessidades de síntese protéica. O fornecimento de determinados aminoácidos é indispensável para a manutenção do conteúdo de neurotransmissores, tanto no sentido de que alguns aminoácidos são os próprios neurotransmissores, ou em outros casos servem como precursores para a síntese de aminas biogênicas (CURI, 2000). Em adição os danos ao tecido nervoso não são causados apenas pelo déficit nas concentrações de aminoácidos, mas o aumento exagerado nessas concentrações parecem também ser nocivo a estrutura e funcionamento do tecido em questão. Este é o caso da LM, onde parece haver aumento exagerado nas concentrações de alguns aminoácidos, como por exemplo, ácido gama-aminobutírico (GABA), glutamato, e glutamina, sendo o glutamato neurotransmissor citotóxico, em concentrações elevadas (;SHIN, et al., 2003; HULSEBOSCH, 2002; NASHMI; FEHLINGS, 2001; BENTON; ROSS; MILLER, 2000; LLEWELLY-SMITH, 1997; DAS, 1989).

A concentração de glutamina no SNC de mamíferos é de aproximadamente 6-11 mM e difere pouco entre as regiões cerebrais. Embora sua distribuição entre as várias populações de células do tecido neural não seja bem determinada, acredita-se que em células gliais, onde a glutamina é avidamente sintetizada, sua concentração seja maior. Por outro lado, sinaptossomos isolados do cérebro contêm quantidades menores de glutamina, cerca de 1 mM, porém quando *in vitro*, são capazes de acumular glutamina avidamente e alcançar concentrações que chegam a 10 mM. Isto demonstra que os neurônios e suas terminações são capazes de estocar grandes quantidades de glutamina. No líquido céfalo-raquidiano (LCR), a concentração é de 0,5 mM, sendo muito próxima à encontrada no plasma. Por sua vez, a concentração de glutamina no espaço extracelular do tecido neural está na

ordem de 0,13 – 0,3 mM. Portanto, a glutamina está predominantemente localizada no espaço intracelular do cérebro. Isto significa que a captação deste aminoácido pelas células neurais ocorre contra gradiente de concentração e deve estar ligado a processos fornecedores de energia. Ainda não está bem esclarecido se alterações nas concentrações da glutamina cerebral exercem efeito direto sobre os processos de neurotransmissão. Há evidências de que certos aminoácidos, incluindo a glutamina, inibem a ligação específica do GABA a seus receptores (CURI, 2000).

O principal papel da glutamina no SNC é servir como precursor para síntese dos neurotransmissores glutamato e GABA, participando do processo conhecido como ciclo glutamato-glutamina (mesmo ciclo já citado anteriormente e utilizado em outros tecidos). Estes podem ser considerados os dois principais neurotransmissores do SNC, sendo o GABA inibitório e o glutamato excitatório (NEWSHOLME et al., 2003; SHIN, et al., 2003; BENTON; ROSS; MILLER, 2000; CURI, 2000). A função da glutamina porém, não se limita simplesmente a síntese de glutamato, mas tem participação muito mais ampla no metabolismo do SN. Existe grande interação da glutamina com o metabolismo energético das células neurais, tanto no sentido de gerar diretamente substratos para a produção de energia como em sua ação de regular a utilização de outros metabólitos pelo SNC (NEWSHOLME et al., 2003, CURI, 2000).

Com relação ao transporte de glutamina (captação e liberação de glutamina pelo SNC), também não há consenso. De uma maneira geral, parece que o transporte da glutamina para fora do SNC é bem mais facilitado do que sua captação pelo mesmo tecido (CURI, 2000; NEWSHOLME et al., 1989; LUND; WILLIAMSON, 1985). Essa restrição na captação de glutamina pelo SNC se deve pela organização da barreira hemato-encefálica (BHE). A membrana adluminal (face voltada para o tecido neural) da BHE transporta glutamina de forma diferente da membrana luminal (face voltada para o sangue). Acredita-se que a glutamina plasmática ultrapassa a BHE através de processo facilitado que é bastante lento, quando comparado com o de outros aminoácidos neutros. O contrário, ou a facilitação na remoção, se daria talvez para manter o balanço nitrogenado no cérebro, removendo o nitrogênio do tecido neural, que em altas concentrações é citotóxico, na forma de glutamina, glutamato e amônia (CURI, 2000; NEWSHOLME et al., 1989; LUND; WILLIAMSON, 1985).

1.3.2 Glutamina e músculo esquelético

Quantitativamente, o principal tecido de síntese, estoque e liberação de glutamina é o tecido muscular, como já mencionado anteriormente, o qual apresenta alta atividade das enzimas glutamina sintase e aminotransferase de aminoácidos de cadeia ramificada. O músculo esquelético é capaz de aumentar a taxa de liberação e de síntese de glutamina em resposta ao aumento da demanda por outros órgãos e tecidos do corpo (WALSH et al., 1998b; DI PASQUALE, 1997).

O gradiente transmembrana através da célula muscular é elevado para a glutamina. A existência deste gradiente de concentração torna restrita a difusão livre através da membrana celular. A glutamina é ativamente transportada para dentro das células através de sistema dependente de Na^+ , o qual resulta em gasto de energia. O transporte de glutamina através da membrana da célula muscular é rápido, sendo sua velocidade superior a de todos os outros aminoácidos. A estabilização da concentração observada no fluido intracelular e o gradiente de concentração através da membrana representam o efeito combinado da afinidade do sistema de transporte, da influência de outros aminoácidos competindo por moléculas carreadoras, da razão intracelular de produção e utilização, do fornecimento extracelular, da taxa de fluxo através da membrana celular, e das quantidades intra e extracelulares de Na^+ . A entrada de glutamina na célula muscular é estimulada pela insulina e seu efluxo é estimulado pela presença de glicocorticóides. (FÜRST; STEHLE, 1995; WINDMUELLER, 1982).

A síntese de glutamina no músculo esquelético durante o estado pós-absortivo ocorre através da captação de glutamato, a partir da circulação sangüínea, sendo este responsável por 40% da síntese de glutamina. O catabolismo protéico produz glutamina diretamente, mas também leva à produção dos ACR, glutamato, aspartato e asparagina. Os esqueletos de carbono destes aminoácidos são utilizados para a síntese *de novo* de glutamina (HALL; WAGENMAKERS, 1998). Estudos em ratos demonstraram que ACR são transaminados, quase que exclusivamente, com o α -cetoglutarato para formar glutamato, o qual pode fornecer seu grupamento amina para o piruvato para formação de alanina, ou incorporar amônia livre para formar glutamina (GOLDBERG; CHANG, 1978). Porém, ACR não são completamente metabolizados, devido à enzima chave de controle da sua taxa de oxidação (2-oxoisovalerato desidrogenase) apresentar-se quase totalmente na

forma inativa no músculo esquelético. Conseqüentemente, músculos de rato captam ACR inicialmente para utilizá-los como fornecedores de nitrogênio na formação de glutamina e alanina (NEWSHOLME et al., 1999; LANCHÁ JÚNIOR, 1996; GOLDBERG; CHANG, 1978).

No estado pós absortivo, glutamina (48%) e alanina (32%) respondem por 80% dos aminoácidos liberados pelo músculo esquelético, sendo que a glutamina com 2 átomos de nitrogênio por molécula é a principal fonte de transporte de nitrogênio a partir do músculo (NIEMAN; PEDERSEN, 1999; WILLIAMS; CHINKES; WOLFE, 1998; HOOD; TERJUNG, 1994; HOOD; TERJUNG, 1990). Alguns estudos sugerem que a glutamina seja mais relevante que a alanina como precursor neoglicogênico em exercícios de longa duração (WAGENMAKERS, 1998; GRAHAM et al., 1995). As taxas de trocas de glutamina e alanina excedem os seus estoques corporais, sendo que sua ocorrência na proteína muscular é de apenas 10-15%, indicando que há constante necessidade da sua síntese *de novo* no músculo. A taxa de síntese de glutamina no músculo esquelético - aproximadamente 50 mmol/h - tem demonstrado ser mais alta do que qualquer outro aminoácido (NIEMAN; PEDERSEN, 1999; ROWBOTTOM; KEAST; MORTON, 1996; GRAHAM et al., 1995). Deste modo, glutamina e alanina devem ser formadas como produtos da interconversão de aminoácidos dentro da célula, sendo este processo dependente das condições metabólicas da célula, as quais são afetadas pelo estado nutricional, hormonal, e também pelo exercício. Contrações musculares aumentam as taxas de metabolismo do piruvato, produção de lactato, transaminação de aminoácidos e amoniogênese, as quais são importantes determinantes da formação de alanina e glutamina (HOOD; TERJUNG, 1994).

A síntese e o transporte de glutamina no músculo esquelético são influenciados pelos glicocorticóides, que aumentam a atividade da glutamina sintase durante estados catabólicos e elevam o efluxo de glutamina a partir do músculo esquelético, diminuindo os estoques intracelulares de glutamina e alterando o transporte cinético, permitindo um efluxo máximo de glutamina mesmo com concentrações baixas de glutamina intracelular (WALSH et al., 1998b).

1.3.3 Glutamina e sistema imunitário

O organismo protege-se contra microorganismos através de diferentes mecanismos, sendo as imunidades inata e específica as responsáveis por esta proteção. As principais características das imunidades inata e específica estão descritas na figura 10 (ABBAS; LICHTMAN; POBER, 1997; SHEPHARD; SHECK, 1994).

Um grupo importante de leucócitos compreende as células fagocitárias, como os monócitos, macrófagos e neutrófilos polimorfonucleares. Estas células reagem aos microrganismos, englobam estes agentes e os destroem e, uma vez que utilizam sistemas de reconhecimento primitivos e inespecíficos, elas são responsáveis pelas respostas imunitárias inatas (ROITT; BROSTOFF; MALE, 1999).

Características	Inata	Específica
Especificidade para microorganismos	<i>Relativamente baixa</i>	<i>Alta</i>
Diversidade	<i>Limitada</i>	<i>Ampla</i>
Memória	<i>Não</i>	<i>Sim</i>
Barreiras físico- químicas	<i>Pele, mucosa epitelial, produtos químicos antimicrobianos</i>	<i>Sistemas imunitário cutâneo e de mucosa; anticorpos em secreções de mucosas</i>
Proteínas do sangue	<i>Sistema complemento; citocinas derivadas de macrófagos (fator de necrose tumoral)</i>	<i>Anticorpos; citocinas derivadas de linfócitos (IFN-γ)</i>
Células	<i>Macrófagos, neutrófilos, eosinófilos, basófilos, células "natural killer" (NK) (CD16+, CD56+)</i>	<i>Linfócitos: T (CD3+, CD4+, CD8+) B (CD19+, CD 20+)</i>

FIGURA 10 – Características das imunidades inata e específica.

Durante o início do processo de fagocitose de bactérias ou fragmentos teciduais por neutrófilos, um número de diferentes processos celulares são iniciados, tais como: motilidade, *burst* respiratório, secreção de enzimas citoplasmáticas (proteolíticas) e compostos imunomoduladores. A combinação desses processos auxilia na morte e digestão de bactérias fagocitadas e, de modo mais prolongado, o desenvolvimento da inflamação local (CURI et al., 1999; CURI et al., 1997). As espécies reativas de oxigênio geradas pelos neutrófilos desempenham papel relevante como oxidantes microbicidas e também como mediadores da inflamação e lesão tecidual. Uma vez estimulados, a maior parte do oxigênio consumida pelos neutrófilos é convertida em ânion superóxido pela enzima NADPH oxidase (CURI; CURI, 2000).

Neutrófilos apresenta aumento do consumo de glicose relacionado ao processo de endocitose e geração de espécies reativas de oxigênio. Porém, a glicose não é o único metabólito energético utilizado por essas células. Estudos recentes demonstraram que neutrófilos também consomem glutamina ativamente, sendo que a taxa de utilização de glutamina por neutrófilos, assim como por linfócitos e macrófagos é similar ou até mesmo superior quando comparada à de glicose (NEWSHOLME et al., 1999; CURI et al., 1997).

Com relação à imunidade específica, os linfócitos desempenham papel primordial e são produzidos em órgãos linfóides primários (timo e medula óssea) em uma taxa de 10^9 células por dia, sendo categorizados basicamente como linfócitos B e T. Os linfócitos T fazem parte da resposta imunitária celular e proliferam-se ativamente quando estimulados fisiologicamente por interleucina-2 (IL-2) ou por mitógenos como a concanavalina A. Os linfócitos B são os precursores das células produtoras de imunoglobulinas (CURI, 1993; CALICH; VAZ, 1988).

Linfócitos utilizam glicose (glicólise) e glutamina para obtenção de energia e precursores para a biossíntese de macromoléculas. A glicose é convertida principalmente em lactato, enquanto a glutamina segue sua conversão para glutamato e aspartato sofrendo oxidação parcial para CO_2 , via processo denominado glutaminólise (figura 5), o qual é essencial para o efetivo funcionamento de linfócitos e células do sistema imunitário (ROWBOTTOM et al., 1995; FRISINA et al., 1994; CURI, 1993). A glicólise fornece ribose-5-fosfato, a qual é precursora da síntese de RNA e DNA e glicerol 3-fosfato para a síntese de fosfolípidios. A glutaminólise

fornece glutamina, amônia, e aspartato, que são utilizados na síntese de purinas e pirimidinas, sendo estas fundamentais para a formação de DNA e RNA (NEWSHOLME et al., 1989).

A glutamina é utilizada em altas taxas por linfócitos, ainda que estes estejam em estado quiescente, como uma importante fonte de energia e também atuando na regulação biossintética dos nucleotídeos purinas e pirimidinas. A capacidade de responder frente a um estímulo mitogênico e antigênico estimula a blastogênese da linhagem linfocitária e aumenta a utilização de glicose e glutamina (DEMARCO et al., 1999; KEW et al., 1999; KOYAMA et al., 1998; RODHE; MCLEAN; PEDERSEN, 1998; HOOD; TERJUNG, 1994).

A taxa de proliferação de linfócitos T e B, como também as taxas de síntese protéica, síntese de RNA, produção de IL-2, e sínteses de imunoglobulinas são dependentes de glutamina (WALSH et al., 1998b). A produção de imunoglobulinas por linfócitos B *in vivo* pode ser avaliada pela medida da concentração sérica de imunoglobulinas específicas sendo que a principal classe de imunoglobulinas no soro é a IgG, enquanto a IgA é a mais prevalente em secreções de mucosa (lágrima, saliva, fluidos respiratórios) (ABBAS; LICHTMAN; POBER, 1997).

A avaliação da função imunitária específica e mediada por linfócitos T *in vivo* pode ser realizada através do teste de hipersensibilidade do tipo tardio (HTT). A resposta ao teste de HTT pode estar prejudicada em várias situações, tais como desnutrição protéico-calórica e exercício físico intenso e prolongado (NIEMAN; PERDENSEN, 1999; HENNINGSEN et al., 1984). Uma explicação para esta supressão na resposta ao teste de HTT é a redução no número de linfócitos T e na migração de células inflamatórias, sendo este processo devido, em parte, à redução da expansão clonal (HENNINGSEN et al., 1984; TITUS; CHILLER, 1981).

Pesquisadores têm avaliado a função linfocitária usando estimulação mitogênica *in vitro*, a qual simula eventos que ocorrem após a estimulação dos linfócitos *in vivo*. Estudos em modelos animais e humanos demonstram que a concentração de glutamina é importante para a produção de IL-2, por parte dos linfócitos em resposta a estímulos antigênicos. A proliferação de linfócitos é induzida pela ligação da IL-2 com os seus respectivos receptores, localizados em grande quantidade na superfície de linfócitos T ativados (PAHLAVANI et al., 1988).

Os linfócitos apresentam alta atividade da enzima glutaminase dependente de fosfato, e sendo esta uma enzima mitocondrial (KOYAMA et al., 1998; RODHE; MCLEAN; PEDERSEN, 1998; ARDAWI; NEWSHOLME, 1982), é provável que o destino da glutamina na mitocôndria seja:

Glutamina → glutamato → oxoglutarato → succinil-CoA → succinato → fumarato → malato.

Parte do malato poderia ser convertido para oxaloacetato, o qual poderia ser transaminado com o glutamato para produzir oxoglutarato e aspartato. O restante do malato poderia ser transportado dentro do citossol, onde sofreria o seguinte destino: conversão para oxaloacetato, o qual poderia ser transaminado com glutamato através da enzima aspartato aminotransferase citossólica ou convertido para fosfoenolpiruvato via enzima PEP-carboxiquinase para a formação de piruvato, e conseqüentemente lactato, via enzimas piruvato quinase e lactato desidrogenase, respectivamente (CURI; NEWSHOLME; NEWSHOLME, 1986).

As concentrações de glutamina estão diminuídas em situações clínicas tais como: queimaduras, sepse, pós-operatório, e após exercícios de resistência prolongados. Estas situações estão associadas com um aumento na susceptibilidade a infecções, sendo sugerido que isto pode ser parcialmente devido a uma diminuição do fornecimento de glutamina para células imunocompetentes, tais como linfócitos (KEW et al., 1999). Durante processos catabólicos, há evidências de uma elevada captação de glutamina pelo intestino e rim a partir da circulação sangüínea. Estudos demonstram a possibilidade de diminuição das concentrações de glutamina plasmática pelo aumento da taxa de utilização entre diversos tecidos, superior à taxa de produção pelo músculo esquelético (ROWBOTTOM; KEAST; MORTON, 1996; PARRY-BILLINGS et al., 1989). Este inadequado suprimento de glutamina para a circulação sangüínea, e conseqüentemente para as células do sistema imunitário pode estar associado com a redução da proliferação de linfócitos frente a um estímulo mitogênico (ROWBOTTOM et al., 1995).

Por outro lado, a utilização de glutamina pela população total de linfócitos em ratos é de cerca de 24 $\mu\text{mol/h}$, sendo que a capacidade do músculo esquelético em liberar glutamina é de pelo menos 42 $\mu\text{mol/h}$ (CURI, 1993).

Ainda são grandes os questionamentos sobre respostas imunitárias em PLM, principalmente nas fases aguda e secundária, em que pesquisas praticamente são inexistentes, tanto em animais como em humanos. As informações publicadas sobre lesão medular nas fases aguda e secundária referem às patologias histológica ocorridas no local da injúria (no tecido nervoso), bem como nas respostas imunitárias obtidas em nível celular, porém não extrapola quanto a imunocompetência, de maneira geral, do indivíduo acometido de LM.

2. OBJETIVOS

Indivíduos acometidos de LM tem maiores índices de infecções. Glutamina tem sido demonstrado, desempenhar papel chave na imunocompetência. Assim, este trabalho teve como objetivo determinar as concentrações tecidual (ME) e plasmática deste aminoácido, em ratos submetidos à lesão medular experimental em fase aguda e secundária. Para alcançar este objetivo investigou-se a:

1. determinação do peso corpóreo dos animais ao longo da fase aguda e secundária;
2. determinação da concentração de glutamina sérica e tecidual (músculo esquelético dos membros anteriores e posteriores);
3. determinação da expressão de populações de linfócitos T (CD4 e CD8), por citometria de fluxo;
4. determinação da atividade fagocítica de macrófagos peritoniais por método colorimétrico;
5. determinação da produção de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e ânion superóxido (O_2^-), pelos macrófagos peritoniais por técnica colorimétrica.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Condições experimentais

3.1.1 Animais

Foram utilizados ratos machos albinos adultos da linhagem Wistar, obtidos do Biotério do Setor de Ciências Biológicas, Centro Politécnico, Curitiba, PR, com peso entre 250g e 300g.

3.1.2 Modelo experimental

Ratos Wistar machos foram mantidos em ciclo claro/escuro (12/12h) e temperatura ($23^{\circ}\text{C} \pm 1$) com livre acesso a comida e água. Os ratos foram aleatoriamente divididos nos seguintes grupos: Controle (CTL), N=5; falso-operado (S), (N=5); e submetido à Lesão Medular (LM), N=7. Estes grupos foram ortotansados nos tempos 48 h (agudo) e 05 dias pós-cirurgia (secundário).

3.1.3 Protocolo cirúrgico

O presente protocolo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal do Setor de Ciências Biológicas (CEEAA). Este protocolo de lesão medular segue padronização conforme LEMAN; BERNET; SEQUEIRA, 2000 e OSBORN; TAYLOR; SCHRAMM, 1990 e também as normas de pré e pós-operatório do *Multicenter Animal Spinal Cord Injury Study (MASCIS)*.

Os animais foram anestesiados com ketamina e xylazina, nas proporções de 90 mg/Kg e 15 mg/Kg, respectivamente. Após verificação da completa ação anestésica, os ratos foram acomodados em campo cirúrgico com ambiente aquecido ($33 - 35^{\circ}$), onde foram submetidos à tricotomia na região cervical e torácica, e anti-sepsia local com solução de polivinil pirrolidona iodo (PVP - I). Em seguida procedeu-se incisão de aproximadamente 5 cm de pele e subcutâneo sob a linha média da região cervical, seguindo-se do afastamento subperiosteal da musculatura paravertebral até a coluna vertebral ficar exposta. Localizou-se as vértebras T3 e T4 – local exato da secção - por apalpação, e rapidamente, após laminectomia, foi executada a secção completa do tecido medular por uso de bisturi. Os animais foram

suturados (músculo e pele) e colocados em pares em caixas e em local aquecido (de 21 - 23 para 33 – 35°), com água e comida de fácil acesso.

Os diferentes grupos (controle, falso-operado, lesados medular 48hs e 05 dias) foram ortotaniados por decapitação e o sangue coletado para a determinação da glutaminemia. Os músculos gastrocnêmio, sóleo e epitoclearis foram removidos e imediatamente congelados em nitrogênio líquido para posterior determinação da concentração de glutamina. Os linfonodos mesentéricos foram retirados para obtenção de linfócitos.

3.1.4 Grupo falso operado

O grupo falso operado foi submetido ao mesmo procedimento cirúrgico dos animais LM, sem transsecção da medula espinhal.

3.1.5 Pesagem corporal

Durante o experimento, os animais foram pesados todas as manhãs imediatamente antes do procedimento cirúrgico e diariamente até a ortotanásia, utilizando - se a balança Urano modelo UDI 10000/1.

3.1.6 Enzimas e reagentes

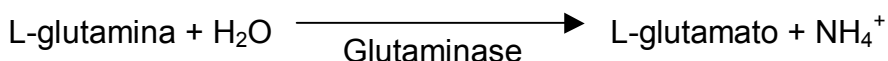
Enzimas e reagentes utilizados foram obtidos da Sigma Chemical Co., St. Louis, USA. A [2-¹⁴C]-Timidina (50 mCi/mmol) foi obtida da New England Nuclear Research Products (Du Pont Company – Biotechnology Systems – EUA).

3.2 Determinações plasmáticas e séricas

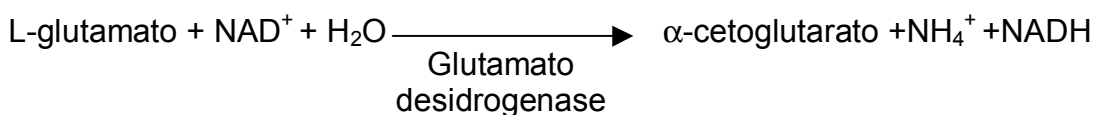
3.2.1 Glutamina

A determinação de glutamina plasmática foi realizada segundo a metodologia descrita por LUND (1985), em duas etapas:

Reação A: desaminação da L-glutamina para L-glutamato



Reação B: desidrogenação do L-glutamato para α -cetoglutarato acompanhada pela redução do NAD^+ para NADH.



A conversão de NAD^+ para NADH foi determinada espectrofotometricamente, em comprimento de onda de 340 nm, sendo esta conversão proporcional à quantidade de L-glutamina inicial.

3.3 Determinações teciduais

3.3.1 Glutamina muscular

A extração de glutamina tecidual foi realizada de acordo com a metodologia descrita por SAHLIN et al., (1990). As amostras congeladas de músculos (gastrocnêmio sóleo e epitroclearis) foram imediatamente pesadas e homogeneizadas em ácido perclórico (0,5M) gelado. As amostras foram posteriormente centrifugadas (Eppendorf – Centrifuge 5810 R) a 3000 rpm a 4°C durante 15 minutos. O sobrenadante foi neutralizado com KHCO_3 e, posteriormente, determinada a concentração de glutamina segundo LUND (1985). Os valores médios foram expressos em milimoles de glutamina por quilograma de tecido fresco.

3.4 Estudos realizados com linfócitos

3.4.1 Obtenção dos Linfócitos

Dos animais ortotansados, os linfonodos mesentéricos foram retirados e dissecados. Os linfócitos foram obtidos por compressão destes órgãos em cilindro de malha. Este é um sistema composto por dois cilindros de aço inox de diferentes diâmetros, de modo que um se encaixe no outro, cujas extremidades de cada um contem um sistema de malha. Deste sistema foram obtidos linfócitos íntegros e isolados de gordura (VIEIRA et al., 1990).

Os linfócitos foram mergulhados em solução salina 0,9%, as quais foram filtradas em papel filtro especial (Whatman nº 105) e centrifugadas a 1800 rpm, 4°C, durante seis minutos, por 3 vezes, para posteriormente proceder o cultivo.

3.4.2 Capacidade proliferativa de linfócitos

Uma vez isolados os linfócitos, 2×10^5 células por *well*, foram cultivados em meio de cultura RPMI-1640 enriquecido com 10% de soro fetal bovino e antibióticos (penicilina 10.000U e estreptomicina 10 mg/L), em placas de 96 *wells* (volume final de 200 μ L), a 37° C em atmosfera de 95% ar / 05% CO₂, por 48 horas. Os linfócitos foram estimulados com 20 μ L/poço de solução dos mitógenos Concanavalina A (Con A), estimulador da proliferação de linfócitos T e Lipopolissacarídeos (LPS), estimulador de proliferação de linfócitos B. Após 48h, foram adicionados 20 μ L de solução contendo (2-¹⁴C)-Timidina (0,01 μ Ci/*well*) e as células cultivadas por período adicional de 18 horas, sob as mesmas condições descritas anteriormente. Em seguida, as células foram coletadas em Cell Harvester device para determinação da (2-¹⁴C)-Timidina incorporada no DNA, utilizando-se o Cintilador Beckman LS 6000 (FERNANDES et al, 1996).

3.5 Estudos realizados com macrófagos

3.5.1 Obtenção de macrófagos

Para obtenção de células peritoniais, os animais controle, falso operado e lesado medular foram exsanguinados por decapitação. Após a remoção da pele da região abdominal, 10 mL de tampão fosfato-salina (PBS – estéril), pH 7,4, foram injetados na cavidade peritoneal dos animais. Trinta segundos após a administração, a cavidade peritoneal foi aberta e o fluido, contendo as células, aspirado com o auxílio de pipeta Pasteur de plástico, estéril. Em seguida, estas células foram centrifugadas (Eppendorf – Centrifuge 5810 R) a 1200 rpm, 4 °C, durante 5 minutos. Os macrófagos então, após descarte do sobrenadante, foram ressuspensos em 3 mL de PBS.

Soluções

Solução de tampão fosfato salina pH 7,4, 10 mM (PBS) foi utilizada como meio de diluição para os corantes. O fixador utilizado foi o Baker formol-cálcio (formaldeído 4%, cloreto de sódio 2% e acetato de cálcio 1%). A solução de extração consiste de ácido acético glacial 1% e etanol 50% em água destilada. A solução estoque do corante vermelho neutro foi preparada pela dissolução de 20 mg de corante em 1 ml de DMSO (dimetil sulfóxido) e a solução para uso de rotina é preparada pela diluição de 20 ml da solução estoque em 5 ml de PBS. A solução de vermelho fenol para os ensaios de produção de H₂O₂ consiste de 5,5 mM de dextrose, 0,56 mM de vermelho fenol e 8,5 U/ml peroxidase “horseradish” em PBS pH 7,4 a 340 mOsm, e previamente adiciona-se 0,05% de zymosan (2,3 x 10⁸ partículas/ml), para os ensaios de fagocitose, obtém-se uma solução diluindo-se 40 mg de zymosan em 6 ml de PBS e adiciona-se 600 ml de vermelho neutro. Para o preparo do reagente de Griess, foram utilizadas soluções estoques de cloreto de naftiletilenodiamina (0,1%) e de sulfanilamida a 1%, ambos dissolvidos em H₃PO₄ (5%). Pouco antes do uso, as soluções foram misturadas na proporção 1:1, formando o reagente de Griess propriamente dito.

3.6 Determinação de parâmetros de resposta imunitária

3.6.1 Atividade fagocítica

Utilizou-se o método descrito por PIPE *et al.* (1995). Foram depositados 100 µL da solução de macrófagos obtidos como descrito acima, em placa do tipo ELISA e adicionou-se 10 µL de zymosan ($2,3 \times 10^8$ partículas/mL) corado com vermelho neutro e incubou-se por 30 minutos. Após este procedimento, foram adicionados 100 µL de fixador para interromper o processo de fagocitose e, 30 minutos depois a placa foi lavada com PBS e, posteriormente, centrifugada, por 5 minutos a 1.500 rpm, a fim de remover o zymosan e o vermelho neutro não fagocitados pelos macrófagos. O vermelho neutro no interior dos macrófagos foi solubilizado utilizando-se 100 µL de solução de extração. Após 30 minutos procedeu-se a leitura das placas, a 550 nm utilizando espectrofotômetro (Microplate reader Bio-rad - Benchmark). Os dados foram expressos em % de fagocitose por mg de proteína.

3.6.2 Retenção de lisossomos

Para esta análise utilizou-se o método descrito por PIPE *et al.* (1995), onde em placa do tipo ELISA depositou-se 100 µL da solução de macrófagos e adicionou-se 20 µL de vermelho neutro a 2%. Após 30 minutos, a placa foi centrifugada por 5 minutos a 1.500 rpm. O sobrenadante foi descartado e os “wells” lavados com PBS, para eliminar o vermelho neutro que não foi internalizado pelas células. Adicionou-se 100 µL de solução de extração para solubilizar o vermelho neutro que estava dentro dos lisossomos. Esta solubilização é possível porque o vermelho neutro é um corante catiônico que se difunde através da membrana celular e, uma vez presente no lisossomo, fica aprisionado devido à mudança de cargas causada pelo pH ácido do sistema lisossomal. Finalmente, após 30 minutos, a placa foi lida a 550 nm utilizando espectrofotômetro (Microplate reader Bio-rad - Benchmark). Os dados foram expressos em % de retenção lisossomal por mg de proteína.

3.6.3 Produção de peróxido de hidrogênio

A produção de peróxido de hidrogênio foi mensurada utilizando-se o método descrito por PICK & MIZEL (1981) modificado. Através da oxidação de vermelho fenol foi possível detectar a produção de H₂O₂. Alíquotas de 100 µL de solução de macrófagos e 10 µL de éster de forbol miristato acetato (PMA – 20 µM) foram colocadas em placas de ELISA. Após 1 hora de incubação no escuro (para prevenir a foto-oxidação), o sobrenadante foi descartado por inversão da placa e os “wells” receberam 100 µL da solução de vermelho fenol contendo peroxidase (horseradish) e zymosan. Incubou-se durante 30 minutos e em seguida fez-se a leitura em espectrofotômetro a 620 nm (Microplate reader Bio-rad - Benchmark). Os resultados foram determinados a partir de uma curva padrão ($r = 0,9987$) e, expressos em µmol/mg de proteínas.

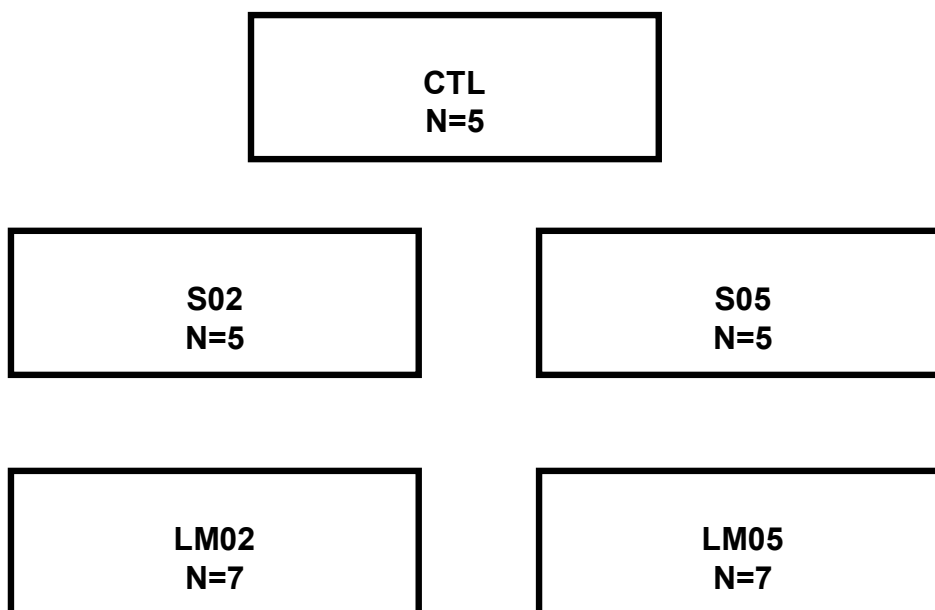
3.6.4 Mensuração do ânion superóxido

A geração de superóxido foi estimada através da redução de “nitroblue tetrazolium” (NBT – Sigma), um composto amarelo lipossolúvel que se torna insolúvel e de cor azul no seu estado reduzido (MADHAVI *et al.*, 1994). Os macrófagos (450 µL) foram incubados por 1 hora com 0,1% de NBT e 30 µL de PMA (80 µM) em PBS a 37 °C. Esta reação foi interrompida pela adição de um volume igual de ácido acético glacial. Esta mistura foi centrifugada rapidamente (30 segundos a 10.000 rpm) e o NBT reduzido, presente no sedimento, foi solubilizado em 900 µL de ácido acético a 50% e sonicado (1 pulso). Os restos celulares foram sedimentados e a absorbância do sobrenadante determinada a 550 nm em espectrofotômetro (Ultrospec – 2000). Os dados foram expressos em % de ânion superóxido por mg de proteína.

3.7 Análise estatística

Os dados foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM) e submetidos a análise de variância de uma via (ANOVA) seguido do pós-teste Tukey, com nível de significância para $p < 0,05$.

3.8 Desenho experimental



CTL = Controle

S (SHAM) = Falso operado

S02 = Falso operado fase aguda (2 dias)

S05 = Falso operado fase secundária (5 dias)

LM = Lesado medular

LM02 = Lesado medular fase aguda (2 dias)

LM05 = Lesado medular secundária (5 dias)

4. RESULTADOS

Na figura 11 está apresentada a variação de peso dos animais controle (CTL), falso operado (S) e lesado medular (LM). Há ganho de peso crescente no grupo CTL, em média 1% por dia, totalizando aproximadamente 5% ao final do período de 5 dias. Após o procedimento cirúrgico, os animais do grupo falso operado (S) tiveram perda de peso imediata atingindo 4% no terceiro dia, havendo recuperação do peso posteriormente, ficando 2% abaixo do pré-cirúrgico, entretanto significativamente menor quando comparado ao CTL ($p < 0,001$). Já os animais com LM, tiveram perda significativa de peso já no primeiro dia pós-cirurgia, atingindo no 3º. dia a maior perda (12%) a qual foi mantida até o experimento. Esta perda de peso foi significativamente menor quando comparado ao grupo CTL e S ($p < 0,001$)

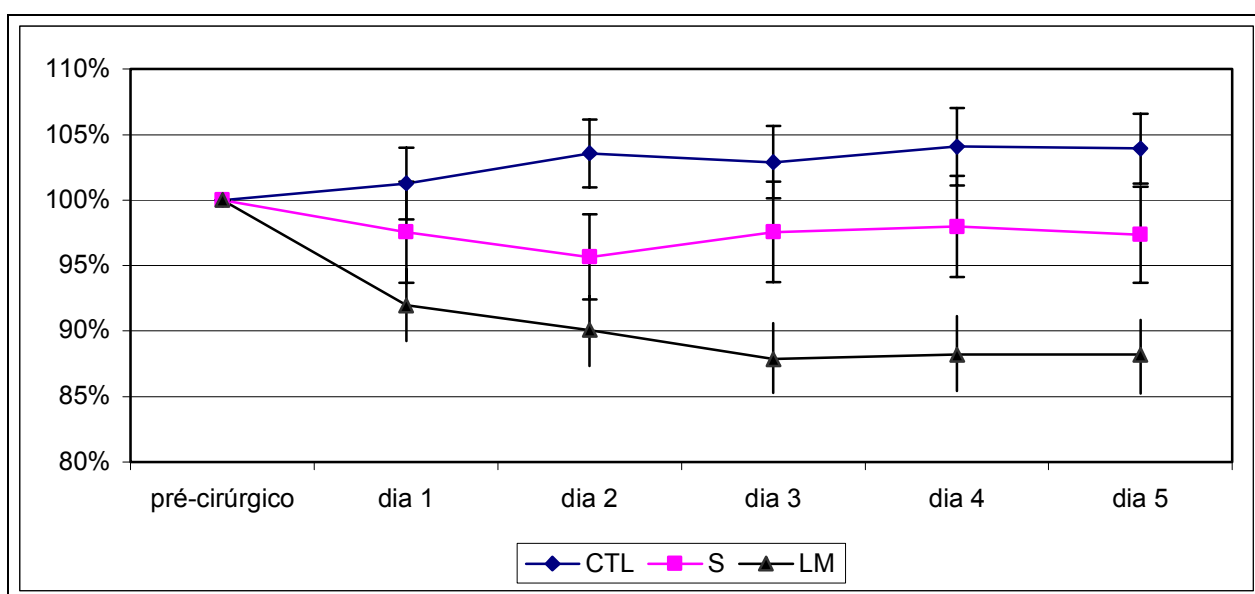


Figura 11 – Porcentagem de variação de peso corpóreo (%) dos animais durante o período do experimento. Os dados estão apresentados como média \pm EPM dos animais controle (CTL), falso operado (S), e lesado medular (LM).

A concentração plasmática de glutamina (figura 12) dos grupos S e LM estava reduzida significativamente no dia 2 quando comparada à dos CTL ($p < 0,001$). No dia 5 a concentração plasmática de glutamina retornou aos valores normais no S mas continuou reduzida no LM ($p < 0,01$).

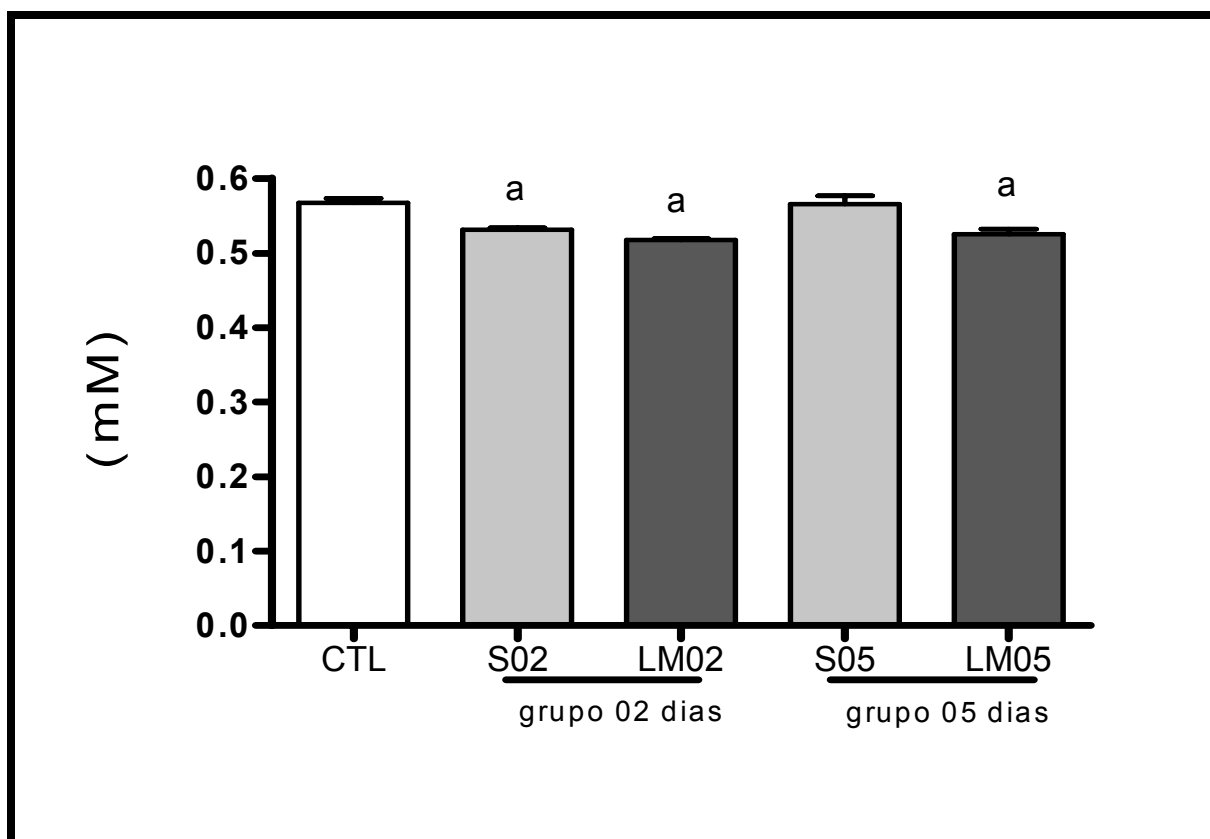


Figura 12 – Concentração plasmática de glutamina (mM) dos animais dos grupos controle (CTL), falso operado (S) e com lesão medular (LM) no 2º. e 5º. dia. Os dados representam a média \pm EPM.

a) diferença significativa ($p < 0,01$) quando comparado ao grupo controle (CTL).

CTL	S-02	LM-02	S-05	LM-05
(n=5)	(n=5)	(n=7)	(n=5)	(n=7)
0,567	0,531	0,517	0,565	0,525
$\pm 0,006$	$\pm 0,007$	$\pm 0,002$	$\pm 0,002$	$\pm 0,006$

A concentração de glutamina (figura 13) no músculo epitroclearis (rico em fibras tipo II) dos animais CTL, S e LM nos dias 2 e 5 não foi diferente.

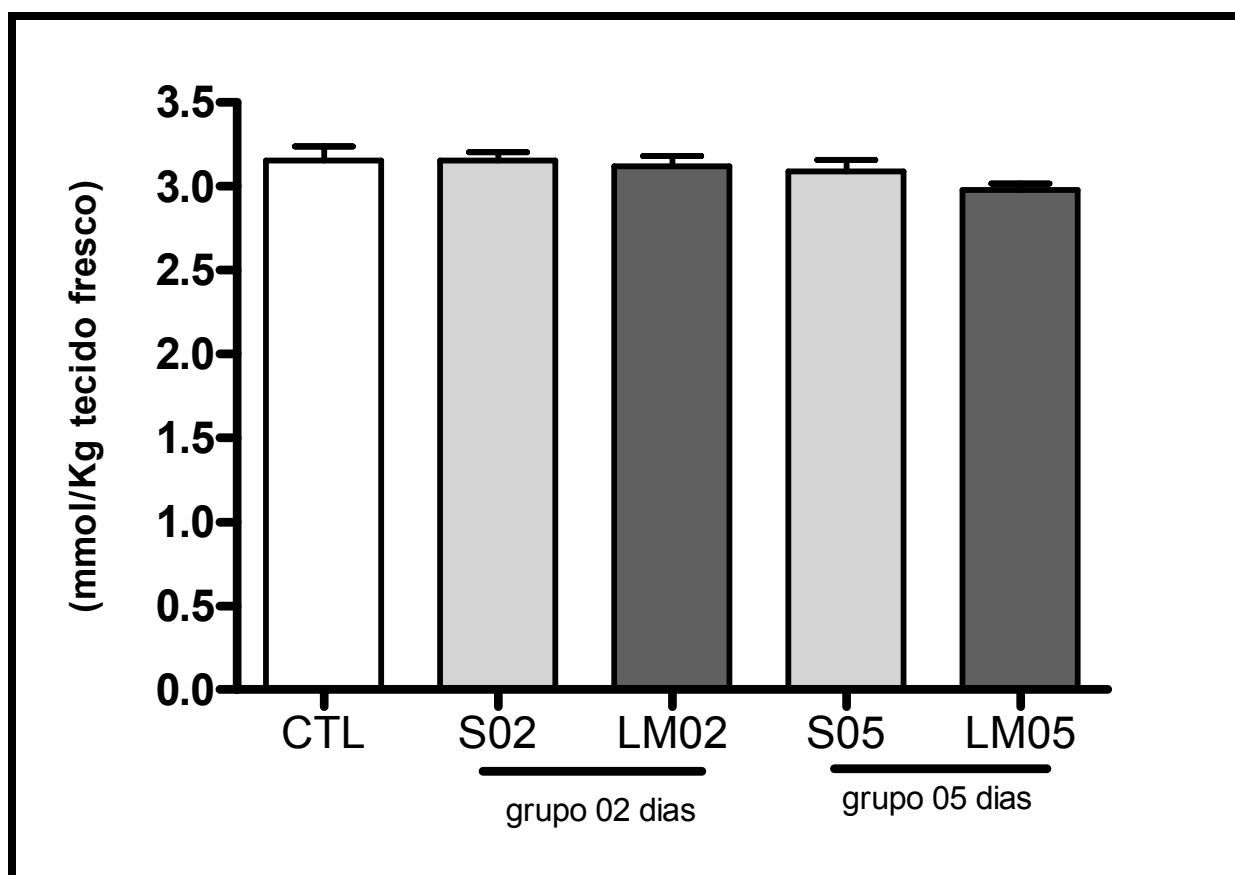


Figura 13 – Concentração de glutamina no músculo epitroclearis, dos animais dos grupos controle (CTL), falso operado (S) e com lesão medular (LM) no 2^o. e 5^o. dia. Os dados representam a média \pm EPM.

CTL	S-02	LM-02	S-05	LM-05
(n=5)	(n=5)	(n=7)	(n=5)	(n=7)
3,155	3,150	3,120	3,088	2,977
±0,08	±0,02	±0,02	±0,07	±0,04

A concentração de glutamina na porção branca do músculo gastrocnêmio (figura 14), foi significativamente menor nos animais com lesão medular quando comparado aos grupos CTL e S ($p < 0,001$). O grupo LM05 foi significativamente menor ao grupo LM02 ($p < 0,05$). Entre CTL e S não foi observado alteração ($p > 0,05$).

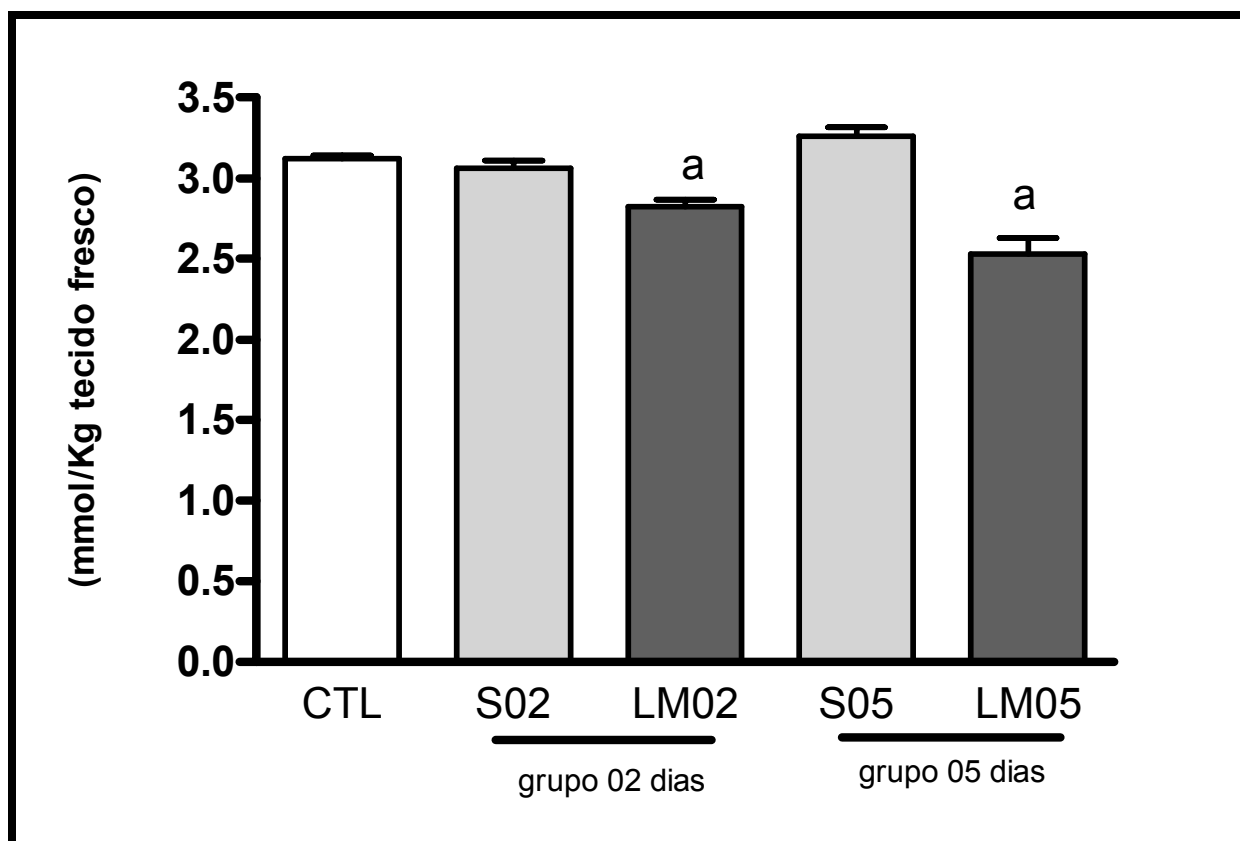


Figura 14 – Concentração de glutamina no músculo gastrocnêmio (porção branca), dos animais dos grupos controle (CTL), falso operado (S) e com lesão medular (LM) no 2º. e 5º. dia. Os dados representam a média \pm EPM.

a) diferença significativa ($p < 0,001$) quando comparado ao grupo controle (CTL).

CTL	S-02	LM-02	S-05	LM-05
(n=5)	(n=5)	(n=7)	(n=5)	(n=7)
3,122	3,060	2,826	3,259	2,530
$\pm 0,02$	$\pm 0,05$	$\pm 0,01$	$\pm 0,06$	$\pm 0,10$

Na figura 15, a concentração de glutamina no músculo sóleo (fibras tipo I) do grupo LM estava reduzida significativamente no 2º. ($p < 0,05$) e 5º. dia ($p < 0,01$) quando comparada à dos animais dos grupos CTL e S, onde entre estes não houve diferença estatística ($p > 0,05$).

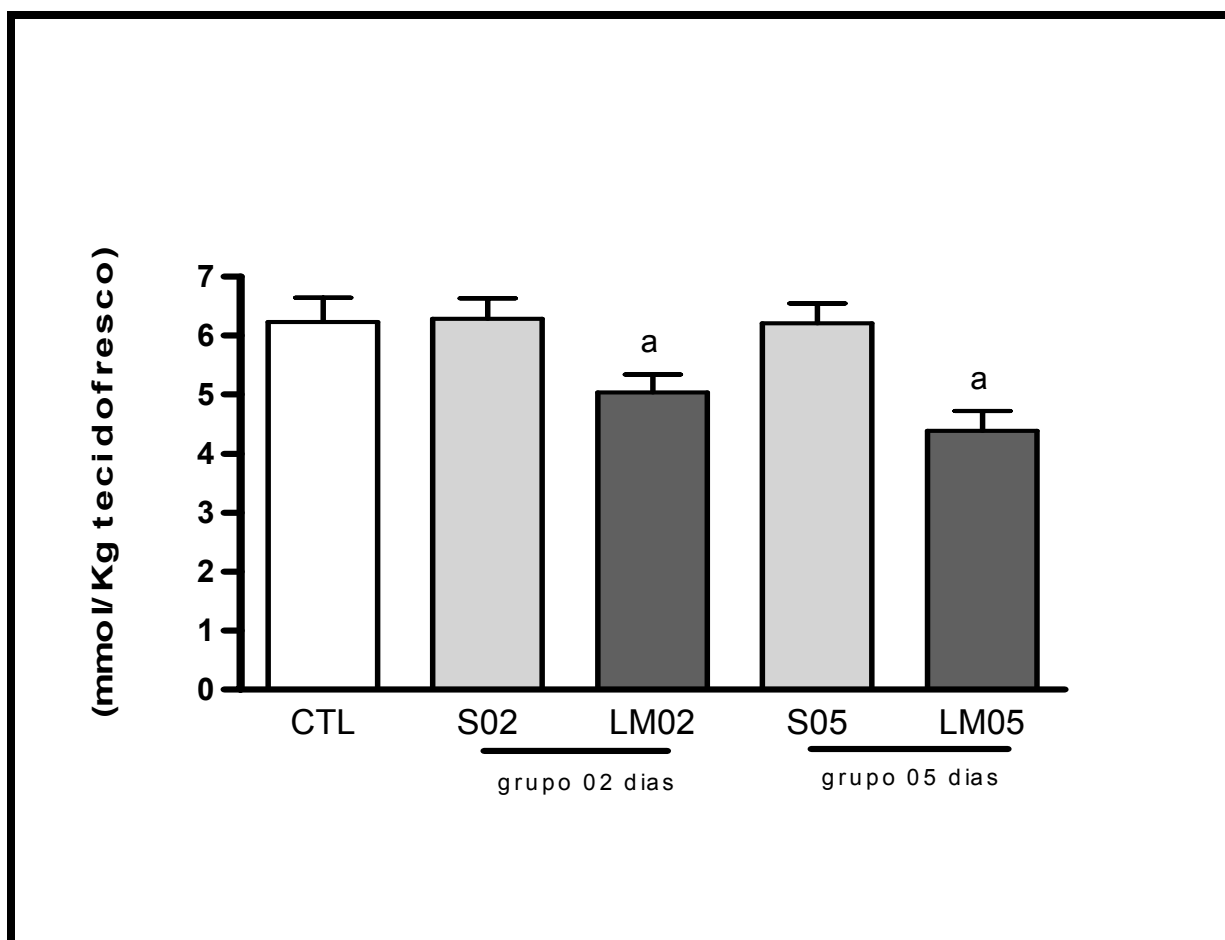


Figura 15 – Concentração de glutamina no músculo sóleo (mmol/Kg de tecido fresco), dos animais dos grupos controle (CTL), falso operado (S) e com lesão medular (LM) no 2º. e 5º. dia. Os dados representam a média \pm EPM.

a) diferença significativa ($p < 0,05$) quando comparado ao grupo controle (CTL).

CTL	S-02	LM-02	S-05	LM-05
(n=5)	(n=5)	(n=7)	(n=5)	(n=7)
6,225	6,291	5,041	6,210	4,390
± 0,18	± 0,20	± 0,12	± 0,28	± 0,25

Na figura 16 estão apresentadas as diferentes concentrações de glutamina nos músculos epitroclearis, gastrocnêmio (porção branca) e sóleo (predominantemente do tipo I). A concentração de glutamina no músculo do tipo I chega ser 2 vezes maior quando comparado ao tecido com fibras branca.

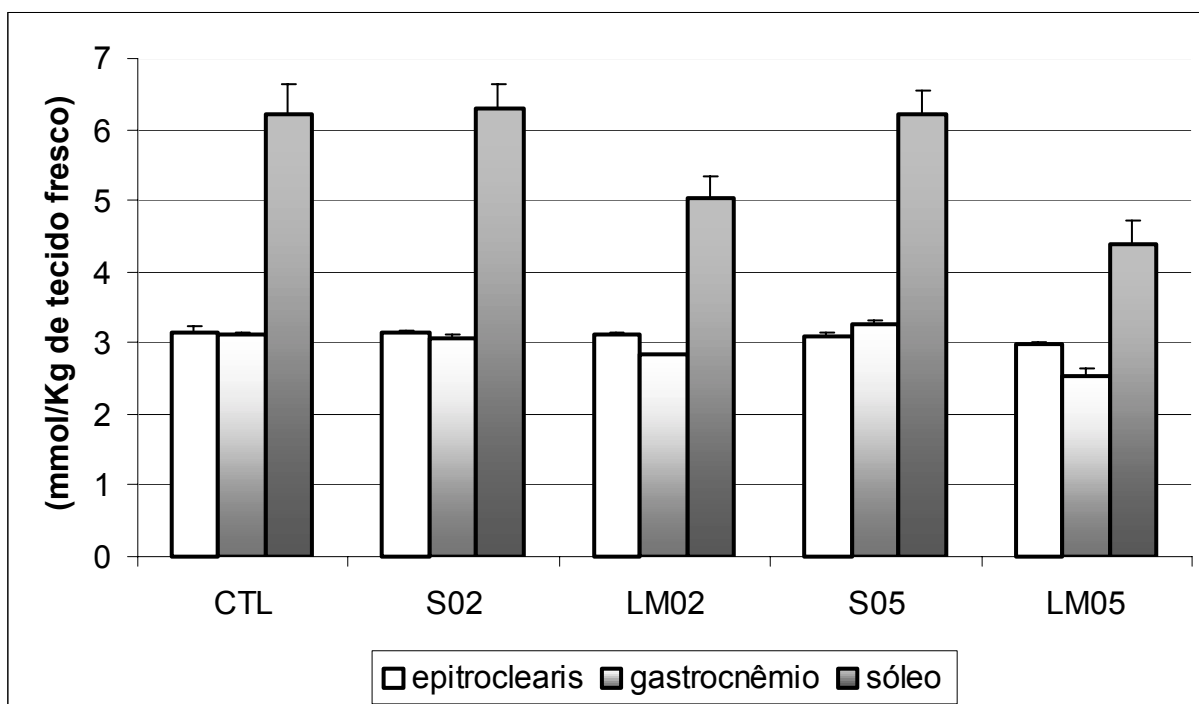


Figura 16 – Concentração de glutamina nos diferentes músculos estudados (epitroclearis, gastrocnêmio e sóleo) e nos diferentes grupos (C, S02, LM02, S05 e LM05). A unidade de medida da concentração muscular é mmol/Kg de tecido fresco. Os dados estão em média \pm EPM.

A capacidade fagocítica (figura 17) dos animais com LM e S estavam respectivamente 4 e 2,8 vezes menor, no 2º. dia, quando comparada à dos animais do grupo CTL. No 5º. dia, esta capacidade elevou em aproximadamente 3 vezes quando comparada ao CTL.

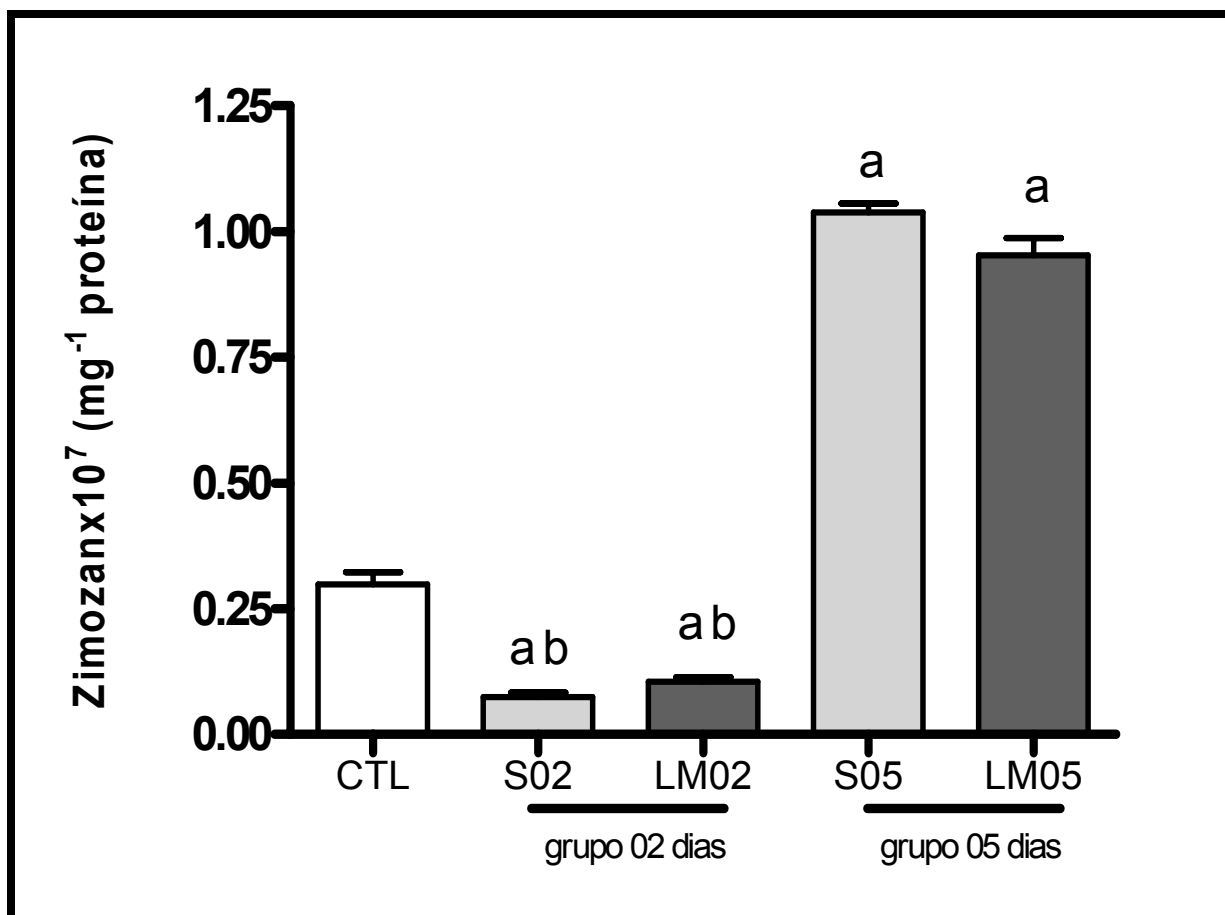


Figura 17 - Fagocitose de zimozan pelos macrófagos peritoneais dos animais do grupo controle (CTL), falso operado (S) e lesado medular (LM) no 2º. e 5º. dia. Os dados estão apresentados como média \pm EPM.

- a) diferença significativa ($p < 0,001$) quando comparado ao grupo controle (CTL).
 b) diferença significativa ($p < 0,001$) quando comparado ao grupo 05 dias; falso operado (S05) e lesão medular (LM05).

CTL	S-02	LM-02	S-05	LM-05
(n=5)	(n=5)	(n=7)	(n=5)	(n=7)
0,298	0,074	0,105	1,039	0,954
$\pm 0,025$	$\pm 0,010$	$\pm 0,009$	$\pm 0,018$	$\pm 0,034$

O volume lisossomal dos macrófagos peritoneais (figura 18) dos animais falso operado e com lesão medular estavam 10 vezes menor quando comparado aos do controle, no 2.º dia ($p < 0,001$). No 5.º dia o volume elevou-se 1,7 e 1,4 vezes, respectivamente nos grupos falso operado e com lesão medular quando comparado ao controle ($p < 0,001$).

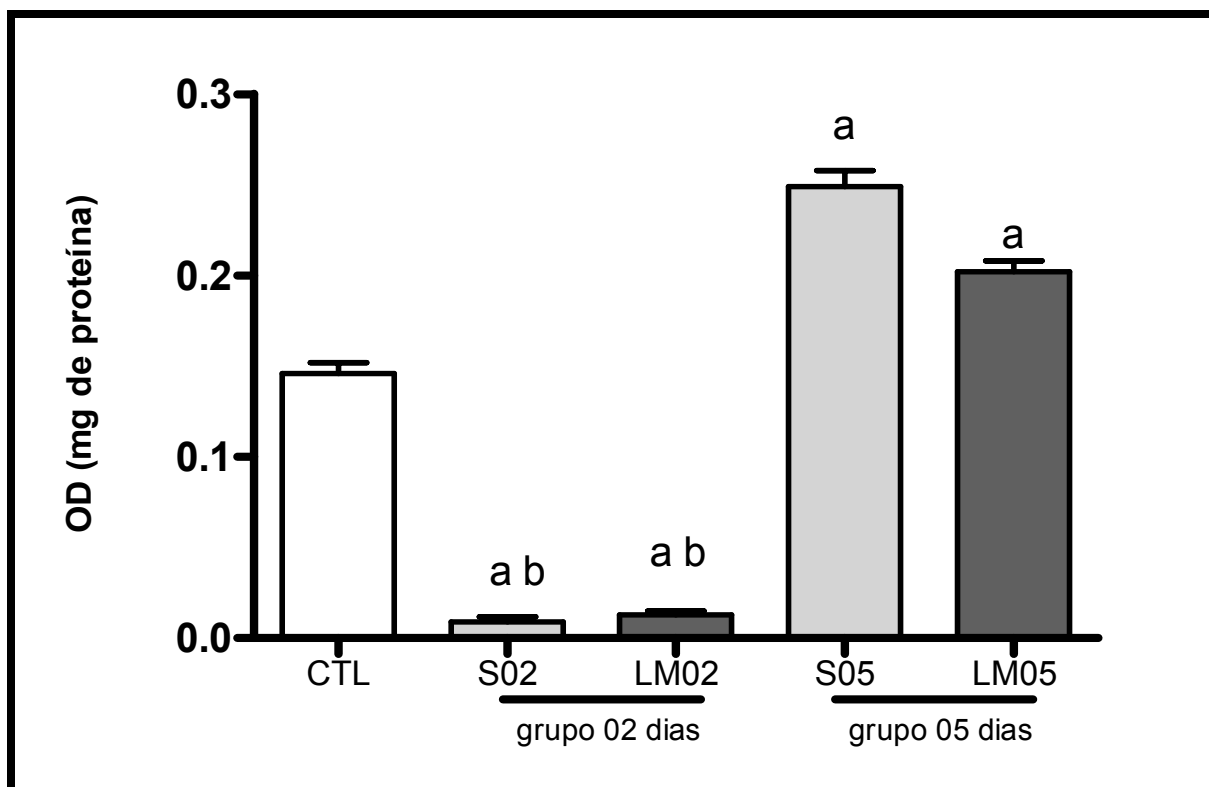


Figura 18 – Captação de vermelho neutro pelos macrófagos peritoneais dos animais do grupo controle (CTL), falso operado (S) e lesado medular (LM) no 2.º e 5.º dia. Os dados estão apresentados como média \pm EPM.

- a) diferença significativa ($p < 0,001$) quando comparado ao grupo controle (CTL).
 b) diferença significativa ($p < 0,001$) quando comparado ao grupo 05 dias; falso operado (S05) e lesão medular (LM05).

CTL	S-02	LM-02	S-05	LM-05
(n=5)	(n=5)	(n=7)	(n=5)	(n=7)
0,146	0,009	0,013	0,249	0,202
$\pm 0,006$	$\pm 0,003$	$\pm 0,002$	$\pm 0,009$	$\pm 0,006$

A produção de peróxido de hidrogênio (figura 19) pelos macrófagos peritoneais dos animais CTL, S e LM não foi diferente tanto no 2º. quanto no 5º. dia ($p>0,05$).

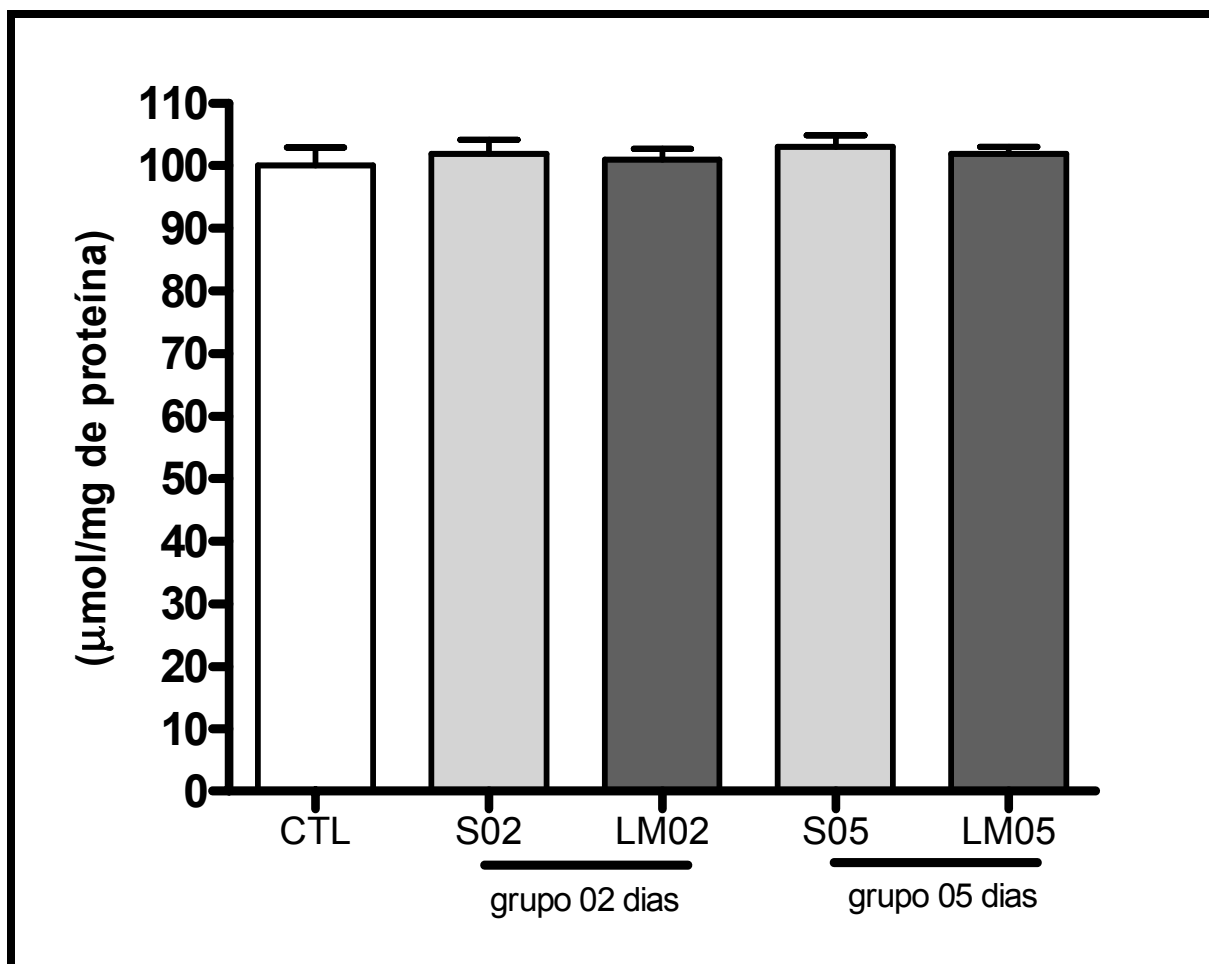


Figura 19 – Produção de H₂O₂ pelos macrófagos peritoneais dos animais do grupo controle (CTL), falso operado (S) e lesado medular (LM) no 2º. e 5º. dia. Os dados estão apresentados como média \pm EPM.

CTL	S-02	LM-02	S-05	LM-05
(n=5)	(n=5)	(n=7)	(n=5)	(n=7)
100	102	101	103	102
$\pm 2,92$	$\pm 2,16$	$\pm 1,69$	$\pm 1,88$	$\pm 1,02$

A produção de O_2^- pelos macrófagos peritoneais (figura 20), no 2º. dia, foi 4,1 e 2,6 vezes maior nos grupos S e LM, respectivamente, quando comparado ao CTL. No 5º. dia esta produção reduziu em comparação ao 2º. dia, mas ainda foi 1,8 vezes maior quando comparada à do CTL ($p < 0,05$).

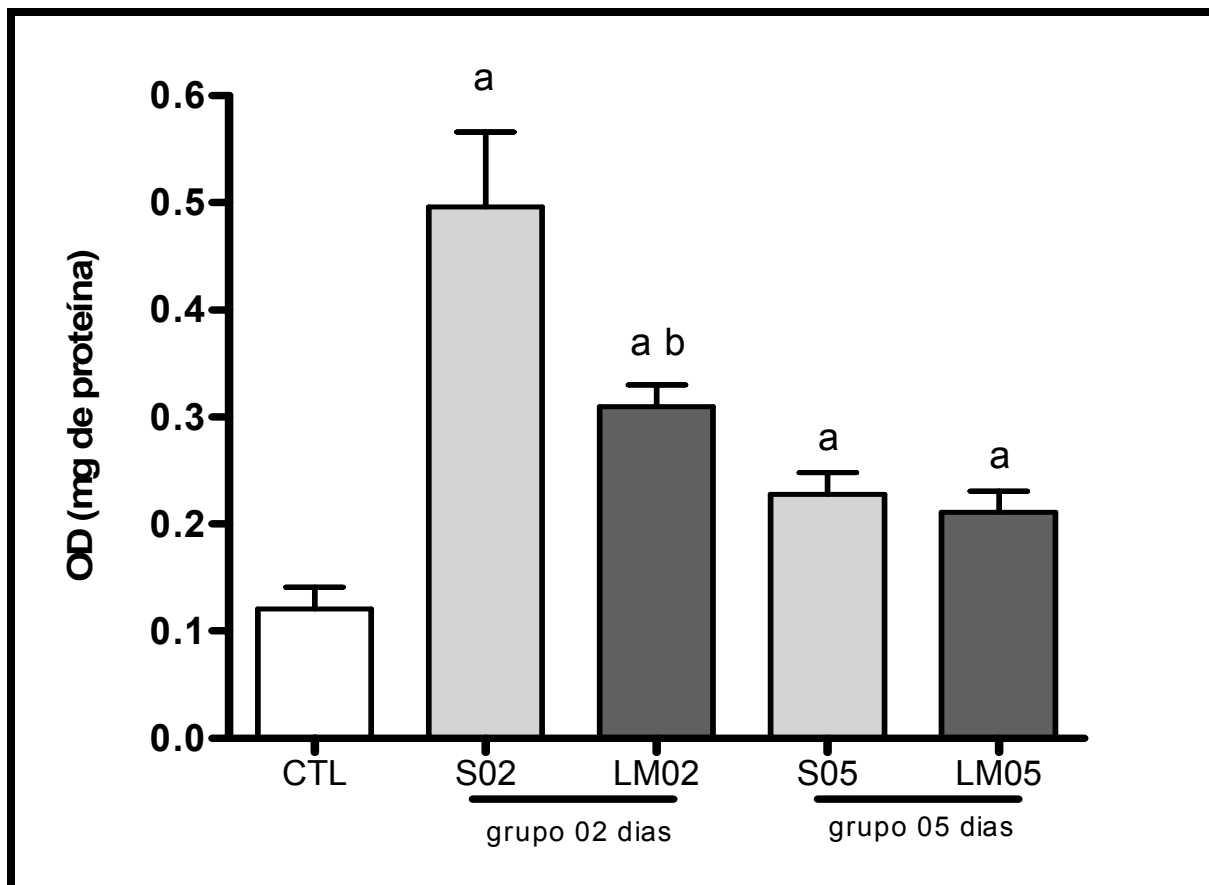


Figura 20 – Produção do ânion superóxido pelos macrófagos peritoneais dos animais do grupo controle (CTL), falso operado (S) e lesado medular no 2º. e 5º. dia. Os dados estão apresentados como média \pm EPM.

- a) diferença significativa ($p < 0,05$) quando comparado ao grupo controle (CTL).
 b) diferença significativa ($p < 0,05$) quando comparado ao grupo falso operado 02 dias (S02).

CTL	S-02	LM-02	S-05	LM-05
(n=5)	(n=5)	(n=7)	(n=5)	(n=7)
0,121	0,496	0,31	0,228	0,211
$\pm 0,02$	$\pm 0,07$	$\pm 0,02$	$\pm 0,02$	$\pm 0,02$

A lesão medular não alterou a expressão de linfócitos CD4 de modo significativo ($p>0,05$), quando comparado aos grupos CTL e S (figura 21), havendo apenas uma tendência à redução dessa população

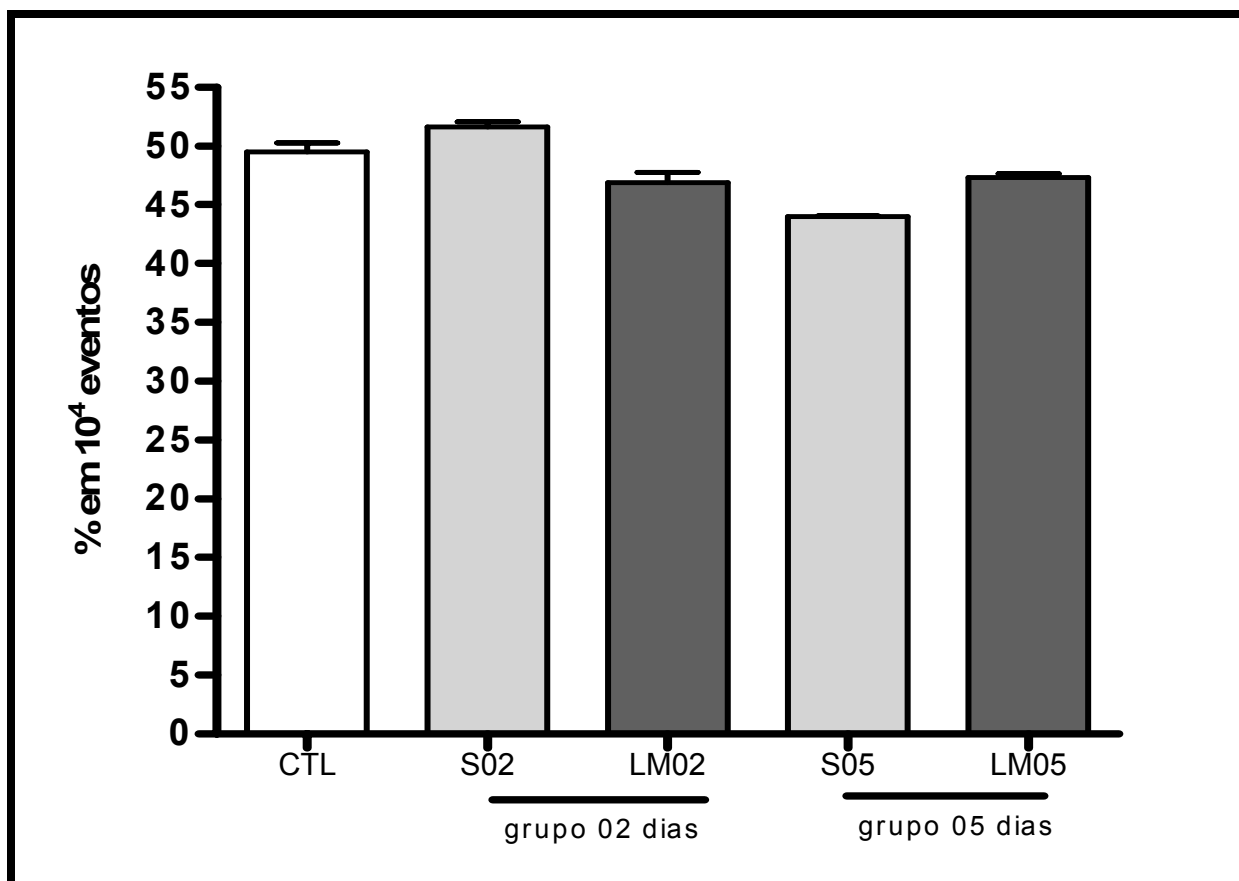


Figura 21 – Expressão de linfócitos CD4 dos animais do grupo controle (CTL), falso operado (S) e lesado medular no 2º. e 5º. dia,. Os dados estão apresentados como média \pm EPM.

CTL	S-02	LM-02	S-05	LM-05
(n=5)	(n=5)	(n=7)	(n=5)	(n=7)
49,51	51,63	46,88	43,96	47,31
± 0,77	± 0,44	± 0,84	± 0,10	± 0,33

Na figura 22 está apresentada a população de linfócito CD8. A lesão medular induziu a redução no número desta população de linfócitos tanto no 2°. quanto no 5°. dia quando comparada à dos animais do grupo CTL e S ($p < 0,001$).

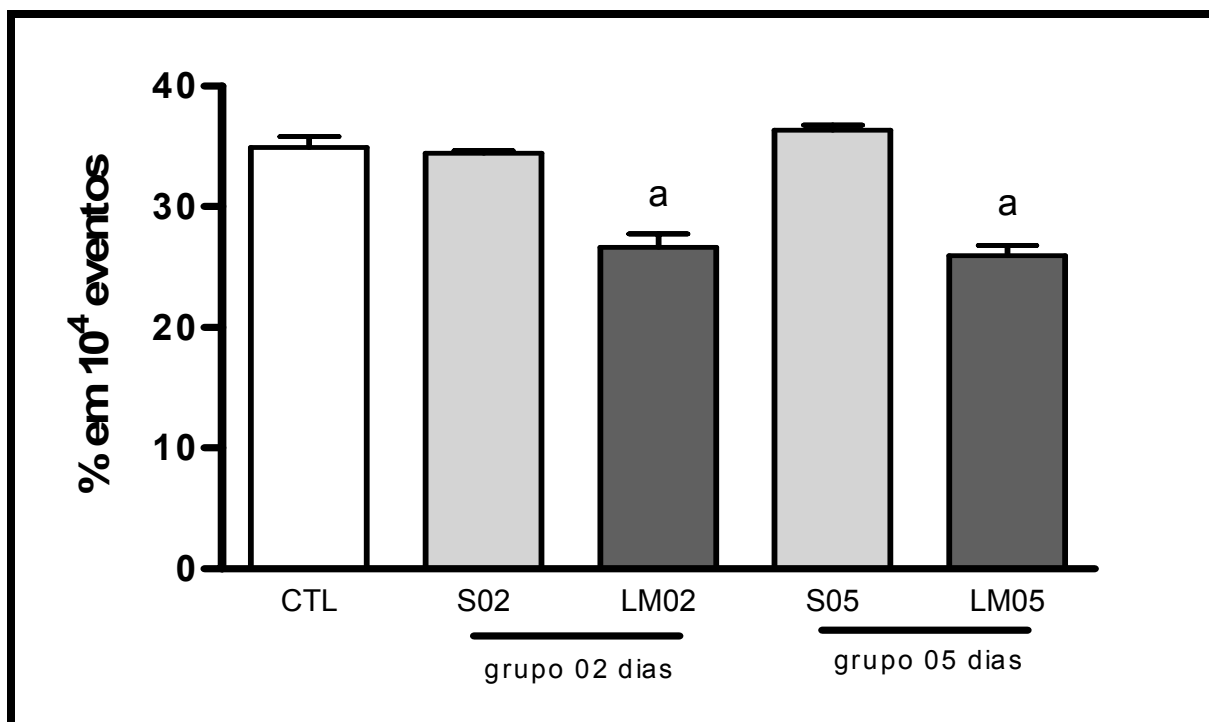


Figura 22 – Expressão de linfócitos CD8 dos animais do grupo controle (CTL), falso operado (S) e lesado medular no 2°. e 5°. dia,. Os dados estão apresentados como média \pm EPM.

a) diferença significativa ($p < 0,001$) quando comparado ao grupo controle (CTL).

CTL	S-02	LM-02	S-05	LM-05
(n=5)	(n=5)	(n=7)	(n=5)	(n=7)
34,87	34,40	26,65	36,34	25,95
$\pm 0,91$	$\pm 0,26$	$\pm 1,10$	$\pm 0,41$	$\pm 0,84$

Na figura 23 apresenta-se comparação de expressão entre linfócitos CD4 e CD8. A população de linfócitos CD8 mostrou-se de 1,4 a 1,8 vezes menor quando comparado à linfócitos CD4.

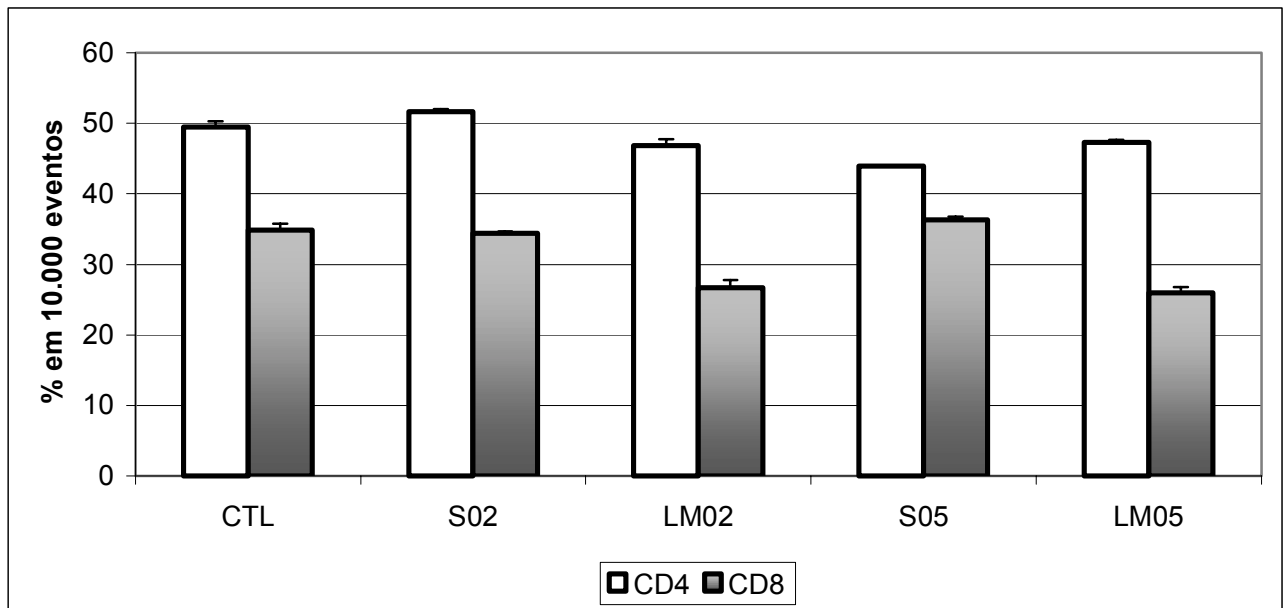


Figura 23 – Comparação de expressão entre populações de linfócitos CD4+ e CD8+

5. DISCUSSÃO

Várias são as patologias secundárias encontradas em portadores de lesão medular, sendo as infecções causadoras dos maiores prejuízos no que concerne à saúde e longevidade do PLM. O por quê deste aumento nos índices ainda não é sabido (CAMPAGNOLO; BARTLETT; KELLER, 2000; CURI, 2000; CAMPAGNOLO et al., 1994; CRUSE et al., 1992; LYONS, 1987), precisando portanto de maiores estudos a respeito. Como a glutamina está relacionada com a imunocompetência e diminuição drástica de sua concentração reflete em depressão do sistema imunitário (CURI, 2000; NEWSHOLME et al., 1999), e que o principal sítio de síntese do aminoácido glutamina é a musculatura esquelética (CURI, 2000; WALSH et al., 1998b; CURI et al., 1997; DI PASQUALE, 1997), neste estudo determinamos a concentração plasmática de glutamina e na musculatura esquelética, bem como a resposta imunitária de macrófagos e linfócitos, em animais submetidos à lesão medular.

Na figura 11, está expresso a evolução do peso corpóreo (%), em função do impacto do trauma nos animais. Enquanto o grupo controle teve ganho de peso gradual e diário de aproximadamente 1%, aumentando quase 5% na ortotanásia, ao quinto dia, o grupo S teve redução do peso de 5% nas primeiras 48 horas, e no terceiro dia começou a recuperação do peso corporal de maneira discreta porém contínua. O grupo com lesão medular teve repercussão drástica na composição corporal, iniciando perda de peso já no primeiro dia, e chegando perto de 15% já no terceiro dia. Esse resultado indica a perda de massa magra acentuada, devido a desnervação causada pela secção da medula espinhal, que tem como resultado a paralisia dos membros inervados pelo segmento medular lesionado. De fato a ME, por ser induzida a contração muscular por estimulação nervosa, faz com que o músculo trabalhe e assim mantenha sua integridade estrutural e funcional. A desnervação, por outro lado, leva ao não estímulo da ME, que culminará em hipotrofia muscular. Em humanos, a perda de musculatura esquelética nas fases aguda e secundária pode chegar a 15% do volume total de massa magra, e no decorrer de vários meses pode alcançar níveis de 41% (BICKEL et al., 2003; BUCHHOLZ.; MCGILLIVRAY; PENCHARZ, 2003; MODLESKY et al., 2003; SPUNGEN et al., 2003; TALMADGE et al., 2002; AKIMA et al., 2002; CASTRO et al.,

2000; DUROZARD; GABRIELLE; BAVEREL, 2000; CASTRO et al., 1999; RAY; DUDLEY, 1998; SAITO, 1998; CARDUS; McTAGGART, 1985). Essa redução de volume e tamanho das fibras musculares esqueléticas, tem conseqüências muito mais drásticas do que mera descaracterização estética. Estudos crônicos têm demonstrado diferenças adversas na composição corporal dos indivíduos com LM, comparados à de pessoas sem lesão. Esta mudança na composição corporal está associada às alterações estruturais encontradas no músculo esquelético do indivíduo acometido de LM, assim como disfunções funcionais e metabólicas decorrentes dessa desordem estrutural muscular. Redução no potássio intracelular, redução na H₂O intracelular (BUCHHOLZ.; MCGILLIVRAY; PENCHARZ, 2003; SPUNGEN et al., 1993; RASMANN-NUHLICEK et al., 1988; CARDUS; McTAGGART, 1985; CHANTRAINE; DELWAIDE, 1976), intolerância a carboidrato, resistência a insulina e alterações lipídicas (JEON et al., 2002; BAUMAN; SPUNGEN, 2001; KUZEYLI et al., 2001; BAUMAN et al, 1999; KARLSSON, 1999; BAUMAN; SPUNGEN, 1994b; BRENES et al., 1986; DUCKWORTH; JALLEPALLI; SOLOMON, 1983; LaPORTE et al., 1983), são informações publicadas relacionando patologias secundárias associadas à perda de massa magra devido à imobilização de parte do corpo decorrente de LM, ou seja, de maneira geral, a longevidade de indivíduos portadores de LM está associada com os distúrbios causados pela redução e hipotrofia da musculatura esquelética, porém como citado, as publicações são referentes a estudos crônicos, pouco se sabendo dessas e outras disfunções decorrentes da LM na fase aguda.

Um dos fatores que motivou este trabalho foi, até essa data, à ausência de publicação, de nosso conhecimento, relatando as concentrações de glutamina em PLM, visto sua importância na imunocompetência e em adição, a alta incidência de infecções que acomete essa população. Hipotetizou-se que as alterações provocadas em todo metabolismo devido à disfunção neuro-muscular, poderia também alterar a concentração do aminoácido glutamina no músculo esquelético, refletindo na concentração do plasma. E, de fato, estas concentrações mostraram-se alteradas nas fases aguda e secundária.

As concentrações de glutamina no plasma encontram-se diminuídas em situações geralmente associadas com imunodepressão (queimaduras, sepse, exercícios prolongado intenso e pós-operatórios) pois o aminoácido é fornecido para

vários fins, entre eles, para as células de defesa, como linfócitos (ROGERO, 2002; CURI, 2000; KEW et al., 1999). No presente estudo, as concentrações plasmática de glutamina (figura 12) estão significativamente diminuídas nos grupos falso operado e com lesão medular no 2º. dia (S02 e LM02) e com lesão medular no 5º. dia (LM05) quando comparados ao controle (CTL). Em adição, o grupo com lesão medular (LM02) mostrou redução significativa comparado ao grupo falso operado, no 2º. dia ($p < 0,05$), e também para o controle ($p < 0,001$), e no 5º. dia, apenas o grupo com lesão medular apresentou queda significativa, tanto comparado ao grupo CTL, quanto ao grupo falso operado ($p < 0,01$). O grupo falso operado (S05) teve seus valores muito próximos ao do controle, não sendo diferente significativamente ($p > 0,05$). Esses dados sugerem que a lesão medular reduz de modo significativo as concentrações plasmáticas de glutamina, se comparado aos grupos submetidos à falsa lesão medular, mostrando que os animais com lesão medular podem apresentar um quadro mais suscetível a infecções que os animais expostos a um trauma cirúrgico, porém sem maiores danos ao organismo de maneira geral, porém estudos demonstraram queda na concentração plasmática de até 50% em estados catabólicos (CASTELL, 2002; ROGERO, 2002; CURI, 2000; CASTELL; NEWSHOLME, 1998), valores bem menores aos encontrados nesta pesquisa.

Em suma, dados indicam que a concentração plasmática de glutamina é agudamente afetada pelo trauma cirúrgico, mas a lesão medular mostrou que influenciou na redução do aminoácido plasmático. Entretanto, existe outro fator que pode afetar as concentrações de glutamina. Este seria a drástica alteração metabólica, em resposta ao trauma, e que ocorre no tecido nervoso, especificamente no local da injúria e migrando para o tecido sadio. Pesquisas demonstraram que logo após estabelecida a lesão, a concentração local de aminoácidos neurotransmissores (ex. GABA e glutamato) aumentam à níveis tóxicos, devido a presença de amônia (NH_3). Nesse momento, aumenta a atividade da enzima glutamina sintase, que regula o metabolismo do glutamato no SNC, catalizando a síntese de glutamato em glutamina, também em níveis extremamente altos. Como a glutamina transporta o excesso de nitrogênio para fora da medula espinhal, ela exerce papel de proteção contra a neurotoxicidade causada por estes aminoácidos ricos em nitrogênio (SHIN et al., 2003; NEWSHOLME et al., 2002; POPOVICH et al., 2002; BENTON; ROSS; MILLER, 2000; SAITO, 1998; LLEWELLYN-SMITH et al.,

1997). Para ilustrar o aumento de concentração de glutamina na medula espinhal após lesão, o valor encontrado foi de 16mM, sendo a concentração de glutamina nos tecidos do SNC variam de 6-11mM, pouco diferindo entre as diferentes regiões, acreditando-se que nas células gliais, onde a glutamina é ativamente sintetizada, sua concentração seja maior (BENTON; ROSS; MILLER, 2000; CURI, 2000).

Outra situação, é que em nosso protocolo utilizado para seccionar a medula, a meninge é igualmente seccionada, tendo perda do líquido céfalo-raquidiano (LCR) e sendo captado, provavelmente pela circulação. Estima-se que a concentração de glutamina no LCR, seja muito parecida com a do plasma, em torno de 0,5 mM. Deve-se ficar claro que esta abordagem é meramente especulativa, não havendo nenhum estudo publicado de nosso conhecimento, mas devem ser estudadas.

O tecido muscular esquelético também apresentou resultados interessantes, com queda da concentração de glutamina nos músculos comprometidos pela LM, tanto os de fibras brancas quanto os com fibras vermelhas, e sem alteração significativa ($p > 0,05$) da concentração no músculo epitroclearis (figura 13), localizado nas patas anteriores, músculo esse que manteve intacto sua comunicação com o cérebro, não sendo portanto, afetado pela desnervação da medula espinhal. São os primeiros resultados conhecidos de concentração do aminoácido glutamina em tecido músculo-esquelético comprometido por secção da medula espinhal. Os dois músculos afetados pela paralisia decorrente da LM, estudados nesta pesquisa, mostraram respostas semelhantes. A porção branca do músculo gastrocnêmio teve queda significativa na concentração de glutamina apenas nos grupos de animais com lesão medular, tanto no 2º. quanto no 5º. dia (figura 14). Em adição, houve redução significativa do grupo com LM no 5º. comparando-se ao grupo com LM do 2º. dia ($p < 0,05$), sugerindo que depois de instalada a lesão medular, a depleção de glutamina progressivamente aumenta com o decorrer do tempo. Já os resultados encontrados do músculo vermelho sóleo (figura 15) também demonstraram redução significativa dos grupos acometidos de LM tanto no 2º. quanto no 5º. dia.

A concentração de glutamina no músculo vermelho (figura 16) foi em torno de 2 vezes maior se comparado aos músculos de fibra branca, indo ao encontro à literatura. O significado fisiológico da maior concentração de glutamina nas fibras do tipo I, até a presente data, não foi ainda estabelecido. Atividade mais elevada de glutamina sintase e maior disponibilidade de ATP para a síntese de glutamina

nessas fibras talvez sejam fatores que expliquem, pelo menos em parte, a maior concentração desse aminoácido nas fibras oxidativas (ROGERO, 2002; CURI, 2000).

De maneira geral, a queda da concentração de glutamina muscular acontece quando a taxa de utilização de glutamina excede a síntese. O músculo esquelético, por sua elevada capacidade de síntese e liberação de glutamina, desempenha indiretamente um papel metabólico crucial. A proteólise muscular é estimulada em várias situações de catabolismo intenso, e o músculo esquelético passa então a garantir a manutenção da concentração plasmática de glutamina (ROGERO, 2002; CURI, 2000; NEU; SHENOY; CHAKRABARTI, 1996). No caso da LM, a proteólise muscular está de fato acelerada, de modo que pode ser a possível causa da redução significativa no conteúdo de glutamina intramuscular, entretanto essa mudança estrutural e metabólica não é bem entendida, principalmente no que concerne à fase aguda da lesão medular.

As alterações no sistema imunitário conseqüentes de cirurgias vem sendo amplamente discutidas. Após cirurgia, imediatamente inicia-se a resposta inflamatória, tanto inata quanto adquirida. Embora essa inflamação aguda seja bem conhecida e fundamentalmente necessária e benéfica, esse quadro pode se alterar, devido a indução de disfunção do sistema imunitário motivada pelo trauma cirúrgico. Essa disfunção caracteriza-se basicamente por duas etapas, não necessariamente nessa ordem. A primeira seria uma síndrome sistêmica da resposta inflamatória. Esta síndrome é caracterizada pelo quadro de hiper-inflamação e pode causar sérios prejuízos ao organismo. A hiper-inflamação é responsável pelo descontrole na resposta imunitária inata e adaptativa, como no fator de necrose tumoral (TNF), interleucinas 1 e 6 (IL-1; IL-6), ativação descontrolada de neutrófilos, granulócitos (ou leucócitos polimorfonucleares - PMN), monócitos e "burst" oxidativo por macrófagos. Em seguida, esse quadro pode ser revertido, imunodeprimindo o indivíduo, numa tentativa compensatória devido ao desequilíbrio de citocinas pró- e anti-inflamatórias. Essa imunodepressão pode ser observada pela desativação de monócitos, redução na resposta de produção de TNF ao mitógeno LPS, alterações nas relações entre Th-1 e Th-2, com prevalência da citotóxica Th-2, entre outras. (MENGER; VOLLMAR; 2004; MUTLU; WOICIECHOWSKY; BECHMANN, 2004; SHERWOOD; TOLIVER-KINSKY, 2004). Algumas dessas alterações puderam ser

observadas em nosso estudo, como a capacidade fagocítica. Ela foi fortemente influenciada pelo trauma cirúrgico, não parecendo que a lesão medular teve algum tipo de influência sobre os grupos. No 2º. dia houve redução de até 4 vezes quando comparado ao controle ($P < 0,001$). Já no 5º. dia, houve uma resposta de rebote, exacerbando os valores em quase 3 vezes acima do controle ($p < 0,001$). Não foi encontrada diferença do grupo S05 para o grupo LM05 (figura 17). Corroborando com esses resultados, o volume lisossomal dos macrófagos peritoneais mostrou uma curva similar à atividade fagocítica dos macrófagos peritoneais dos animais estudados, com uma queda de 10 vezes comparado ao controle no 2º. dia e o mesmo efeito rebote, aumentando a captação de vermelho neutro no 5º. dia dando diferença estatística comparada ao controle ($p < 0,001$).

Outra resposta imunitária, é a produção de peróxido de hidrogênio e ânions superóxido. A produção da NADPH oxidase é a primeira defesa contra agentes invasores. Quando um fagócito é estimulado, esta enzima migra e associa-se a membrana celular, e desta forma torna-se ativa. A enzima então transfere elétrons do seu substrato, o NADPH, para o oxigênio gerando o ânion superóxido. Este ânion é produzido dentro das vesículas do fagossoma sendo rapidamente convertido em espécies mais reativas, destruindo o microorganismo fagocitado (BONATTO, 2003). A produção do ânion superóxido (figura 20), formado através da oxidação da NADPH oxidase na mitocôndria, está aumentada nos animais expostos à cirurgia quando comparados ao controle ($p < 0,05$). Os grupos do 2º. dia, tanto o falso operado quanto o com lesão medular mostraram valores superiores ao do quinto dia, porém apenas o grupo S02 teve diferença na produção do ânion superóxido quando comparado à de todos os demais grupos ($p < 0,05$). Estes resultados indicam a ativação do processo inflamatório devido à cirurgia, não havendo a inversão de hiper-inflamação para imunodepressão, como citado nos trabalhos acima, do 2º. para o 5º. dia, porém a resposta à inflamação atenuou no 5º. dia se comparado ao 2º.

Quando um ânion superóxido reage com outro superóxido, temos a formação de uma substância estável, o peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Quando o H_2O_2 reage com uma molécula de ferro ele ganha mais um elétron, formando um radical livre chamado radical hidroxila (OH). O radical hidroxila pode danificar membranas ou partes internas das células, modificar proteínas, como o colágeno e a elastina ou

provocar alterações nos ácidos nucléicos. A enzima superóxido dismutase (SOD) catalisa a reação entre os radicais superóxido produzindo o peróxido de hidrogênio. (BONATTO, 2003). Nossos dados não mostraram diferença significativa entre os grupos ($p > 0,05$). Estes resultados talvez signifiquem que houve uma resposta inflamatória normal e o quadro infeccioso devido ao trauma não mobilizou esta capacidade oxidativa dos macrófagos, sendo necessário maiores estudos à respeito.

Com relação a imunidade adaptativa, o receptor para célula T é muito parecido a imunoglobulina, tanto em estrutura quanto na via na qual a variabilidade é introduzida dentro do sítio antígeno-ligante. Contudo, há importante diferença entre receptor de célula T e imunoglobulinas que estão relacionadas à natureza dos antígenos reconhecidos pelas células T. Receptores das células T reconhecem antígenos (peptídeos) estranhos ligados a molécula MHC sobre a superfície da célula alvo. Há duas classes de moléculas MHC. A classe I e II. A primeira liga-se estavelmente a peptídeos derivados de proteínas sintetizados e degradados no citosol. A segunda liga-se estavelmente a peptídeos derivados a partir de proteínas degradadas nas vesículas “endocíticas”. Em adição, quando ligado pelo receptor de célula T, as duas classes de moléculas MHC são “preferencialmente” reconhecidas pelas moléculas CD8 e CD4, que caracterizam os dois principais subsets de células T e cooperam com o receptor de célula T na ativação da célula T. Células T CD8 reconhecem molécula MHC de classe I: formam complexo de peptídeos e são ativados para destruir células que exibem peptídeos estranhos derivados de patógenos citosólicos. Células T CD4 reconhecem moléculas MHC de classe II: formam complexo de peptídeos e são especializados em ativar outras células efetadoras do sistema imunitário, por exemplo: células B, macrófagos, para agirem contra os antígenos estranhos ou patógenos que eles fagocitaram.

A expressão de linfócitos CD4 teve tendência à redução, entretanto não foi significativamente quando comparamos os diferentes grupos. Já a população de linfócitos CD8 (figura 22) teve redução significativa nos grupos acometidos de lesão medular, tanto no 2º. quanto no 5º. dia ($p < 0,001$), tanto comparados ao controle quanto aos falso-operado. Isto sugere que a LM, de alguma forma, é hábil em promover a alteração na relação CD4/CD8. Qual o significado deste achado ainda precisa ser esclarecido.

Em suma, a LM agudamente reduz a concentração de glutamina, tanto no plasma quanto na ME desnervada e isto foi acompanhado por modificações importantes da resposta imunitária.

6. CONCLUSÃO

Em resumo, nossos dados nos permitem concluir que:

1. Houve redução nas concentrações de glutamina no plasma e nos músculos paralisados devido à secção da medula espinhal, resultado da lesão medular.
2. No estado de lesão medular, a resposta imunitária linfocitária teve comprometimento, havendo diminuição da população linfocitária CD8 e tendência à redução da CD4.
3. Os macrófago tiveram respostas diferentes no 2º. (queda) e 5º. dia (elevação), quanto a fagocitose e retenção lisossomal.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.; POBER, J.S. **Cellular and molecular immunology**. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1997.

ADER, R.; COHEN, N. Behaviorally conditioned immunosuppression and murine systemic lupus erythematosus. **Science**, v. 215, n. 19, p. 1534-1536, 1982.

AIRES, M.M. **Fisiologia**. 2ª. Edição. Rio de Janeiro. Ed. Guanabara-Koogan, 1999.

AKIMA, H.; FOLEY, J.M.; PRIOR, B.M.; DUDLEY, G.A.; MEYER, R.A. Vastus lateralis fatigue alters recruitment of musculus quadriceps femoris in humans. **J Appl Physiol**, n. 92, p. 679-684, 2002.

AMERICAN SPINAL INJURY ASSOCIATION. **Spinal cord injury statistics**. Disponível em: <<http://www.asia-spinalinjury.org/facts.htm>> Acesso em: 15 jun. 2004.

ARDAWI, M.S.M.; NEWSHOLME, E.A. Maximum activities of some enzymes of glycolysis, the tricarboxylic acid cycle and ketone-body and glutamine utilization pathways in lymphocytes of the rat. **Biochem J**, v. 208, p. 743-748, 1982.

ASCÂNIO LAURO, F. A. **Influências do nível de lesão medular e do hábito de atividade física nas respostas cardio-respiratórias e metabólicas ao exercício físico em indivíduos portadores de paraplegia**. São Paulo, 1997. 213 f. Dissertação (Mestrado em Reabilitação) – Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo.

ASSOCIAÇÃO DE ASSISTÊNCIA À CRIANÇA DEFICIENTE. **Centro de reabilitação**. Disponível em: <http://www.aacd.org.br/centro_setores_arte.asp> Acesso em: 15 jun. 2004.

BAO, F.; LIU, D. Peroxynitrite generated in the rat spinal cord induces apoptotic cell death and activates caspase-3. **Neuroscience**, n. 116, p. 59-70, 2003.

BAUMAN, W.A.; ADKINS, R.H.; SPUNGEN, A.M.; WATERS, R.L. The effect of residual neurological deficit on oral glucose tolerance in persons with chronic spinal cord injury. **Spinal Cord**, v. 37, n. 11, p. 765-771, 1999.

BAUMAN, W.A.; SPUNGEN, A.M.; ZHONG, Y.G.; TSITOURAS, P.D. Chronic baclofen therapy improves the blunted growth hormone response to intravenous arginine in subjects with spinal cord injury. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 78, n. 5, p. 1135-1138, 1994a.

BAUMAN, W.A.; GARLAND, D.E.; SCHWARTZ, E. Calcium metabolism and osteoporosis in individuals with spinal cord injury. **Top Spinal Cord Inj Rehabil**, .2, p. 84-96, 1997.

BAUMAN, W.A.; SPUNGEN, A.M. Carbohydrate and lipid metabolism in chronic spinal cord injury. **Spinal Cord Med**, v. 24, n. 4, p. 266-277, 2001.

BAUMAN, W.A.; SPUNGEN, A.M. Disorder of carbohydrate and lipid metabolism in veterans with paraplegia or quadriplegia: a model of premature aging. **Metabolism**, v. 43, p. 749-756, 1994b.

BENTON, R.L.; ROSS, C.D.; MILLER, K.E. Glutamine synthetase activities in spinal white and gray matter 7 days following spinal cord injury in rats. **Neuroscience Letters**, v. 291, p. 1-4, 2000.

BERGMANN, P.; HEILPORN, A; SCHOUTENS, A; PATERNOT, J; TRICOT, A. Longitudinal study of calcium and bone metabolism in paraplegic patients. **Paraplegia**, v. 15, p. 147-159, 1977.

BICKEL, C.S. SLADE, J.M.; HADDAD, F.; ADAMS, G.R.; DUDLEY, G.A. The acute molecular responses of skeletal muscle to resistance in able-bodied and spinal cord injured subjects. **J Appl Physiol**, article in press, 2003.

BIERING-SORENSEN, F.; BOHR, H.; SCHAADT, O. Bone mineral content of the lumbar spine and lower extremities years after spinal cord lesion. **Paraplegia**, v. 26, p. 293-301, 1988.

BONATTO, S.J.R. **Avaliação da resposta imunitária em macrófagos de ratos F1, portadores de tumor de Walker 256, suplementados cronicamente com óleo de peixe**. Dissertação de Mestrado, UFPR, Curitiba, 2003.

BOUGENOT, M.P.; TORDI, N.; BETIK, A.C.; MARTIN, X.; LE FOLL, D.; PARRATTE, B.; LONSDORFER, J.; ROUILLON, J.D. Reconditioning programs for spinal cord-injured persons: a brief review and recommendations. **Science Sports**, v. 18, p. 175-181, 2003.

BRENES, G.; DEARWATER, S.; SHAPER, R.; LAPORTE, R.E.; COLLINS, E. High density lipoprotein cholesterol concentration in physically active and sedentary spinal cord injured patients. **Arch Phys Med Rehabil**, v. 67, p. 445-450, 1986.

BUCHHOLZ, A.C.; MCGILLIVRAY, C.F.; PENCHARZ, P.B. The use of bioelectric impedance analysis to measure fluid compartments in subjects with chronic paraplegia. **Arch Phys Med Rehabil**, v. 84, p. 854-861, 2003.

CALICH, V.L.G.; VAZ, C.A.C. **Imunologia básica**. São Paulo: Artes Médicas, 1988.

CAMPAGNOLO, D.I.; BARTLETT, J. A.; KELLER, S. E. Influence of neurological level on immune function following spinal cord injury: a review. **The Journal of Spinal Cord Medicine**, v. 23, n. 2, p. 121-128, 2000.

CAMPAGNOLO, D.I.; KELLER, S.E.; DELISA, J.A.; GLICK, T.J.; SIPSKI, M.L.; SCHLEIFER, S.J. Alteration of immune system function in tetraplegics. **American Journal of Physical Medicine & Rehabilitation**, v. 73, n. 6, p. 387-393, dez. 1994.

CARDUS, D.; McTAGGART, W.G. Body composition in spinal cord injury. **Arch Phys Med Rehabil**, v. 66, p. 257-259, 1985.

CASTELL, L.M.; Can glutamine modify the apparent immunodepression observed after prolonged, exhaustive exercise? **Nutrition**, v. 18, p. 371-375, 2002.

CASTELL, L.M.; NEWSHOLME, E.A. Glutamine and the effects of exhaustive exercise upon the immune response. **Can J Physiol Pharmacol**, v. 76, p. 524-532, 1998.

CASTELLANI, J.W.; ARMSTRONG, L.E.; KENEFICK, R.W.; PASQUALICCHIO, A.A.; RIEBE, D.; GABAREE, C.L.; MARESH, C.M. Cortisol and testosterone concentrations in wheelchair athletes during submaximal wheelchair ergometry. **Eur J Appl Physiol**, n. 84, p. 42-47, 2001.

CASTRO, M.J.; APPLE, D.F. JR; ROGERS, S.; DUDLEY, G.A. Influence of complete spinal cord injury on skeletal muscle mechanics within 6 months of injury. **Eur J Appl Physiol**, v. 81, p. 128-131, 2000.

CASTRO, M.J.; APPLE, D.F. JR; HILLEGASS, E.A.; DUDLEY, G.A. Influence of complete spinal cord injury on skeletal muscle within 6 months of injury. **J Appl Physiol**, v. 86, n. 1, p. 350-358, 1999.

CHANTRAINE, A.; DELWAID, P.A. Hydroelectrolytic determination in paraplegics (total body water; exchangeable sodium and total body potassium). **Paraplegia**, v. 14, p. 138-145, 1976.

CHEN, L.G.; COHEN, HALLETT, M. Nervous system reorganization following injury. **Neuroscience**, v. 111, n. 4, p. 761-773, 2002.

CHEN, Y.; DeVIVO, M.J.; LLOYD, K. Bladder stone incidence in persons with spinal cord injury: determinants and trends, 1973-1996. **Urology**, v. 58, p. 665-670, 2001.

CHEN, Y.; ROSEMAN, J.M.; DeVIVO, M.J.; FUNKHOUSER, E. Does fluid amount and choice influence urinary stone formation in persons with spinal cord injury? **Arch Phys Rehabil**, v. 83, p. 1002-1008, 2002.

COLLINS, H.L.; DiCARLO, S. Acute exercise reduces the response to colon distension in T₅ spinal rats. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 282, n. 20, p. H1566-H1570, 2001.

CRUSE, J.M.; LEWIS, R.E.; BISHOP, G.R.; KLIESCH, W.F.; GAITAN, E. Neuroendocrine-immune interactions associated with loss and restoration of immune system function in spinal cord injury and stroke patients. **Immunol Res**, v. 11, p. 104-116, 1992.

CUNNICK, J.E.; LYSLE, D.T.; KUCINSKI, B.J.; RABIN, B.S. Evidence that shock-induced immune suppression is mediated by adrenal hormones and peripheral beta-adrenergic receptors. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 36, p. 645-651, 1990.

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

CURI, R. **Metabolismo do linfócito e sua regulação**. São Paulo, 1993. 36p. Tese (livre-docência) – Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.

CURI, R.; NEWSHOLME, P.; PITHON-CURI, T.C.; PIRES-DE-MELO, M.; GARCIA, C.; HOMEM-DE-BITTENCOURT, JUNIOR P.I.; GUIMARAES, A.R. Metabolic fate of glutamine in lymphocytes, macrophages and neutrophils. **Braz J Med Biol Res**, v. 32, n. 1, p. 15-21, 1999.

CURI, R.; NEWSHOLME, P.; NEWSHOLME, E.A. Intracellular distribution of some enzymes of the glutamine utilization pathway in rat lymphocytes. **Biochem Biophys Res Comm**, v. 138, p. 318-322, 1986.

CURI, T.C.P.; CURI, R. Metabolismo da glutamina e sua implicação no processo de apoptose em neutrófilos. In: CURI, R. **Glutamina: metabolismo e aplicações clínicas e no esporte**. Rio de Janeiro: Sprint, 2000. cap. 13, p.199-208.

CURI, T.C.P. et al. Glutamine utilization by rat neutrophils: presence of phosphate-dependent glutaminase. **Am. J. Physiol.**, v. 273, p. C1124-C1129, 1997.

DAS, G.D. Perspectives in anatomy and pathology of paraplegia in experimental animals. **Brain Research Bulletin**, v. 22, p. 7-32, 1989.

DeMARCO, V.; DYESS, K.; STRAUSS, D.; WEST, C.M.; NEU, J. Inhibition of glutamine synthetase decreases proliferation of cultured rat intestinal epithelial cells. **J Nutr** , v.129, p.57-62, 1999.

DeVIVO, M.J.; KARTUS, P.L.; STOVER, S.L.; RUTT, R.D.; FINE, P.R. Cause of death for patients with spinal cord injuries. **Arch Intern Med**, v. 149, p. 1761-1766, 1989.

DiCARLO, S. Effect of arm ergometry training on wheelchair propulsion endurance of individuals with quadriplegia. **Physical Therapy**, v. 68, n. 1, p. 40-44, 2001.

DIMITRIJEVIC, M.R. Development of neurophysiological aspects of the spinal cord during past ten years. **Paraplegia**, n. 30, p. 92-95, 1992.

DI PASQUALE, M. G. Amino acids and proteins for the athlete – the anabolic edge. **Nutrition in exercise and sport**. New York: CRC press, 1997.

DUCKWORTH, W.C.; JALLEPALLI, P.; SOLOMON, S.S. Glucose intolerance in spinal cord injury. **Arch Phys Med Rehabil**, v. 64, p. 107-110, 1983.

DURÁN, F.S.; LUGO, L.; RAMIREZ, L.; EUSSE, E. Effects of an exercise program on the rehabilitation of patients with spinal cord injury. **Arch Phys Med Rehabil**, v. 82, n. p. 1349-1354, 2001.

DUROZARD, D.; GABRIELLE, C; BAVEREL, G. Metabolism of rat skeletal muscle after spinal cord transection. **Muscle & Nerve**, n. 23, p. 1561-1568, 2000.

FAHEY, M. Spinal shock: a nurse's perspective. **J Orthop Hosp**, v. 6, p. 18-22, 2002.

FAROOQUE, M.; HILLERED, L.; HOLTZ, A.; OLSSON, Y. Effects of methylprednisolone on extracellular lactic acidosis and amino acids after severe compression injury of rat spinal cord. **J Neurochem**, n. 66, p. 1125-1130, 1996a.

FAROOQUE, M.; HILLERED, L.; HOLTZ, A.; OLSSON, Y. Effect of 21-aminosteroid on extracellular energy-related metabolites and amino acids after compression injury of rat spinal cord. **Exp Brain Res**, n. 114, p. 1-4, 1996b.

FERNANDES, L.C.; MATTOZO, C.A.; MACHADO, U.F.; ROSA, L.F.; CURI, R. Insulin treatment inhibits glucose and glutamine metabolism in tumor cells from walker 256 tumor-bearing rats. **Cancer Research Therapy & Control**, v. 5, p. 35-40, 1996.

FIGONI, S. Exercise response and quadriplegia. **Med Sci Sports Exerc**, v. 25, n. 4, p. 433-441, 1993.

FOUAD, K.; METZ, G.A.; MERKLER, D.; DIETZ, V.; SCHWAB, M.E. Treadmill training in complete spinal cord injured rats. **Behav Brain Research**, v. 115, p. 107-113, 2000.

FRISINA, J.P.; GAUDIERI, S.; CABLE, T.; KEAST, D.; PALMER, T.N. Effects of acute exercise on lymphocyte subsets and metabolic activity. **Int J Sports Med**, v.15, p. 36-41, 1994.

FÜRST, P.; STEHLE, P. Glutamine and glutamine-containing dipeptides. In: **Amino acid metabolism and therapy in health and nutrition disease**. New York: CRC press, 1995.

FURUSAWA, K.; TAJIMA, F.; UMEZU, Y.; UETA, M.; IDE, M.; MIZUSHIMA, T.; OGATA, H. Activation of natural killer cell function in recreational athletes with paraplegia during a wheelchair half-marathon race. **Arch Physiol Med Rehabil**, v. 84, p. 706-711, 2003.

GARLAND, D.E.; ADKINS, R.H.; STEWART, C.A.; ASHFORD, R.; VIGIL, D. Regional osteoporosis following incomplete spinal cord injury. **Contemp Orthop**, v. 28, p. 134-138, 1994.

GOLDBERG, A.L.; CHANG, T.W. Regulation and significance of amino acid metabolism in skeletal muscle. **Fed. Proc.**, v. 37, p. 2301-2307, 1978.

GRAHAM, T.E.; TURCOTTE, L.P.; KIENS, B.; RICHTER, E.A. Training and muscle ammonia and amino acid metabolism in humans during prolonged exercise. **J Appl Physiol**, v. 78, p. 725-735, 1995.

GWAK, Y.S.; NAM, T.S.; PAIK, K.S.; HULSEBOSCH, C.E.; LEEM, J.W. Attenuation of mechanical hyperalgesia following spinal cord injury by administration of antibodies to nerve growth factor in the rat. **Neuroscience Letters**, v. 336, p. 117-120, 2003.

HALL, G.V.; WAGENMAKERS, A.J.M. Effect of carbohydrate supplementation on plasma glutamine during prolonged exercise and recovery. **Int J Sports Med**, v. 19, p. 82-86, 1998.

HENNINGSEN, G.M.; KOLLER, L.D.; EXON, J.H.; TALCOTT, P.A.; OSBORNE, C.A. A sensitive delayed-type hypersensitivity model in the rat for assessing in vivo cell-mediated immunity. **J Immunol Methods**, v. 70, p. 153-165, 1984.

HJELTNES, N. Exercise-induced overexpression of key regulatory proteins involved in glucose uptake and metabolism in tetraplegic persons: molecular mechanism for improved glucose homeostasis. **Faseb J**, n. 12, p. 1701-1712, 1998.

HOFFMAN, M.D. Cardiorespiratory fitness and training in quadriplegics and paraplegics. **Sports Méd**, v. 3, n. 5, p. 312-330, 1986.

HOOD, D.A.; TERJUNG, R.L. Endurance training alters alanine and glutamine release from muscle during contractions. **FEBS**, n. 340, p. 287-290, 1994.

HOOD, D.A.; TERJUNG, R.L. Amino acid metabolism during exercise and following endurance training. **Sports Med**, v.9, p. 23-35, 1990.

HULSEBOSCH, C.E.; Recents advances in pathphysiology and treatment of spinal cord injury. **Advances in Physiology Education**, v. 26, n. 4, 2002.

JACKSON, A.B.; GROOMES, T.E.; Incidence of respiratory complications following spinal cord injury. **Arch Phys Med Rehabil**, v. 75, n. 3, p. 270-275, 1994.

JACOB, J.E.; PNIAK, A.; WEAVER, L.C.; BROWN, A. Autonomic dysreflexia in a mouse model of spinal cord injury. **Neuroscience**, v. 108, n. 4, p. 687-693, 2001.

JACOBS, P.L.; MAHONEY, E.T.; JOHNSON, B. Reliability of arm wingate wingate anaerobic testing in persons with complete paraplegia. **J Spinal Cord Med**, v. 26, p. 141-144, 2003.

JACOBS, P.L.; MAHONEY, E.T.; ROBBINS, A.; NASH, M. Hypokinetic circulation in persons with paraplegia. **Med Sci Sports Exerc**, v. 34, n. 9, p. 1401-1407, 2002a.

JACOBS, P.L.; MAHONEY, E.T.; COHN, K.A.; SHERADSKY, L.F.; GREEN, B.A. Oral creatine supplementation enhances upper extremity work capacity in persons with cervical-level spinal cord injury. **Arch Phys Med Rehabil**, v. 83, p. 19-23, 2002b.

JACOBS, P.L.; MAHONEY, E.T.; NASH, M.S.; GREEN, B.A. Circuit resistance training in persons with complete paraplegia. **J Rehab Res and Develop**, v. 39, n. 1, p. 21-28, 2002c.

JACOBS, P.L.; NASH, M.S.; RUSINOWSKI, J.W. Circuit training provides cardiorespiratory and strength benefits in persons with paraplegia. **Med Sci Sports Exerc**, v. 33, n. 5, p. 711-717, 2000.

JACOBS, P.L.; NASH, M.S. Modes, benefits, and risks of voluntary and electrically induced exercise in persons with spinal cord injury. **J Spinal Cord Med**, v. 24, n. 1, p. 10-18, 2000.

JANSEN, T.W. Physical strain in daily life of wheelchair users with spinal cord injury. **Med Sci Sports Exerc**, v. 26, n. 6, p. 661-670, 1994.

JEON, J.Y.; STEADWARD, R.D.; WHEELER, G.D.; BELL, G.; MCCARGAR, L.; HARBER, V. Intact sympathetic nervous system is required for leptin effects on resting metabolic rate in people with spinal cord injury. **Clin Endocrinol Metab**, v. 88, n. 1, p. 402-407, 2003.

JEON, J.Y.; WEISS, C.B.; STEADWARD, R.D.; RYAN, E.; BURNHAM, R.S.; BELL, G.; CHILIBECK, P.; WHEELER, G.D. Improved glucose tolerance and insulin sensitivity after electrical stimulation-assisted cycling in people with spinal cord injury. **Spinal Cord**, v. 40, n. 3, p. 110-117, 2002.

JONES, M.L.; MATHEWSON, C.S.; ADKINS, V.K.; AYLLON, T. Use of behavioral contingencies to promote prevention of recurrent pressure ulcers. **Arch Phys Med Rehabil**, v. 84, p. 796-802, 2003.

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 4ª. edição. Rio de Janeiro. Ed. Guanabara-Koogan, 1979.

KANDEL, E.R.; SCWARTZ, J.H.; JESSELL, T.M. **Principles of Neural Science**. 3^a edição. Connecticut, USA. Ed. Appleton & Lange, 1991.

KARLSSON, A.K. Insulin resistance and sympathetic function in high spinal cord injury. **Spinal Cord**, v. 37, p. 494-500, 1999.

KARLSSON, A.K.; FRIBERG, P.; LONNROTH, P.; SULLIVAN, L.; ELAM, M. Regional sympathetic function in high spinal cord injury during mental stress and autonomic disreflexia. **Brain**, v. 121, p. 1711-1719, 1998.

KELLER, J.N.; HUANG, F.F., MARKESBERY, W.R. Decreased levels of proteasome activity and proteasome expression in aging spinal cord. **Neuroscience**, v. 98, n. 1, p. 149-456, 2000.

KELLER, S.E.; STEIN, M.; CAMERINO, M.S.; SCHLEIFER, S.J.; SHERMAN, J. Suppression of lymphocyte stimulation by anterior hypothalamic lesions in the guinea pig. **Cell Immunol**, v. 52, p. 334-340, 1980.

KEW, S.; WELLS, S.M.; YAQOOB, P.; WALLACE, F.A.; MILES, E.A.; CALDER, P.C. Dietary glutamine enhances murine t-lymphocyte responsiveness. **J Nutr**, v.129, p. 1524-1531, 1999.

KIL, K.; ZANG, Y.C.; YANG, D.; MARKOWSKI, J.; FUOCO, G.S.; VENDETTI, G.C.; RIVERA, V.M.; ZHANG, J.Z. T cell response to myelin basic protein in patients with spinal cord injury and multiple sclerosis. **Journal of Neuroimmunology**, v. 98, p. 201-207, 1999.

KOYAMA, K.; KAYA, M.; TSUJITA, J.; HORI, S.et al. Effects of decrease plasma glutamine concentrations on peripheral lymphocyte proliferation in rats. **Eur J Appl Physiol**, v.77, p. 25-31, 1998.

KREIDER, R.B. Dietary supplements and the promotion of muscle growth with resistance exercise. **Sports Med**, v. 27, p. 97-110, 1999.

KRENZ, N.R.; WEAVER, L.C. Changes in the morphology of sympathetic preganglionic neurons parallel the development of autonomic disreflexia after spinal cord injury in rats. **Neuroscience Letters**, v. 243, p. 61-64, 1998.

KUZEYLI, K.; CAKIR, E.; BAYKAL, S.; KARAARSLAN, G. Diabetes insipidus secondary to penetrating spinal cord trauma: case report and literature review. **Spine**, v. 26, n. 21, p. E510-511, 2001.

LANCHA JR, A. H. Atividade física, suplementação nutricional de aminoácidos e resistência periférica à insulina. **Rev Paul Educ Fis São Paulo**, v. 10, p. 68-75, 1996.

LaPORTE, R.E.; BRENES, G.; DEARWATER, S.; MURPHY, M.A.; CAULEY, J.A.; DIETRICK, R.; ROBERTSON, R. HDL cholesterol across a spectrum of physical activity from quadriplegia to marathon running. **Lancet**, v. 1, p. 1212-1213, 1983.

LEE, W.J.; WANG, Y.H.; SU, C.T.; CHEN, S.J.; LI, Y.W.; HUANG, T.S. Adrenal gland volume after spinal cord injury. **Am J Phys Med Rehabil**, v. 81, p. 483-488, 2002.

LEGRAMANTE, J.M.; RAIMONDI, G.; MASSARO, M.; IELLAMO, F. Positive and negative feedback mechanisms in the neural regulation of cardiovascular function in healthy and spinal cord-injured humans. **Circulation**, v. 103, p. 1250-1255, 2001.

LEMAN, S.; SEQUEIRA, H. Activation of adrenal preganglionic neurons during autonomic dysreflexia in the chronic spinal cord-injured rat. **Autonomic Neuroscience**, n. 98, p. 94-98, 2002.

LEMAN, S.; BERNET, F.; SEQUEIRA, H. Autonomic dysreflexia increases plasma adrenaline level in the chronic spinal cord-injured rat. **Neuroscience letters**, n. 286, p. 159-162, 2000.

LEVI, R.; HULTLING, C.; NASH, M.S.; SEIGER, A. The Stockholm spinal cord injury study: medical problems in a regional SCI population. **Paraplegia**, v. 33, p. 308-318, 1995.

LEVIN, B.E.; MARTIN, B.F.; NATELSON, B.H. Basal sympatho-adrenal function in quadriplegic man. **Journal of the Autonomic Nervous System**, v. 2, p. 327-336, 1980.

LIEBL, D.J.; HUANG, W.; YOUNG, W.; PARADA, L.F. Regulation of Trk receptors following contusion of the rat spinal cord. **Experimental Neurology**, v. 167, p. 15-26, 2001.

LLEWELLYN-SMITH, I.J.; CASSAM, A.K.; KRENZ, N.R.; KRASSIOUKOV, A.V.; WEAVER, L.C. Glutamato and GABA-immunoreactive synapses on sympathetic preganglionic neurons caudal to a spinal cord transection in rats. **Neuroscience**, v. 80, n. 4, p. 1225-1235, 1997.

LUND, P; WILLIAMSON, D.H. Inter-tissue nitrogen fluxes. **British Medical Bulletin**, v. 41, n. 3, p. 251-256, 1985.

LYONS, M. Immune function in spinal cord injured males. **J Neurosci Nurs**, v. 19, p. 18-23, 1987.

MACKINNON, L.T. Chronic exercise training effects on immune function. **Med Sci Sports Exerc**, v. 32, p. S369-S376, 2000.

MADHAVI, N.; DAS, V.N. Effects of n-3 and n-6 fatty acids on the survival of vineristine sensitive and resistant human cervical carcinoma cells, in vitro. **Cancer Lett.** 84:31-41, 1994.

MARTIN, W.J.; LIU, H.; WANG, H.; MALMBERG, A.B.; BASBAUM, A.I. Inflammation-induced up-regulation of protein kinase C γ immunoreactivity in rat spinal cord correlates with enhanced nociceptive processing. **Neuroscience**, v. 98, n. 4, p. 1267-1274, 1999.

MASCIS Protocol. **Multicenter Animal Spinal Cord Injury Study – acute injury and chronic care protocols**. New York University Medical Center. New York, U.S.A., p. 1-29, 1996.

MENGER, M.D.; VOLLMAR, B. Surgical trauma: hyperinflammation versus immunosuppression? **Langenbeck's Arch Surg**, 2004 (no prelo).

MIZUSHIMA, T.; TAJIMA, F.; OKAWA, H.; UMEZU, Y.; FURUSAWA, K.; OGATA, H. Cardiovascular and endocrine responses during the cold pressor test in subjects with cervical spinal cord injuries. **Arch Phys Med Rehabil**, v. 84, p. 112-118, 2003.

MODLESKY, C.M.; BICKEL, C.S.; SLADE, J.M.; MEYER, R.A.; CURETON, K.J.; DUDLEY, G.A. Assessment of skeletal muscle mass in men with spinal cord injury using dual-energy X-ray absorptiometry and magnetic resonance imaging. **J Appl Physiol**, n. 96, p. 561-565, 2003.

MORTON, S.C.; SHEKELLE, P.G.; ADAMS, J.L.; BENNETT, C.; DOBKIN, B.H.; MONTGOMERIE, J.; VICKREY, B.G. Antimicrobial prophylaxis for urinary tract infection in persons with spinal cord dysfunction. **Arch Phys Med Rehabil**, v. 83, p.129-138, 2002.

MURAKI, S.; TSUNAWAKE, N.; TAHARA, Y.; HIRAMATSU, S.; YAMASAKI, M. Multivariate analysis of factors influencing physical work capacity in wheelchair-dependent paraplegics with spinal cord injury. **Eur J Appl Physiol**, n. 81, p. 28-32, 2000.

MUTLU, L.K.; WOICIECHOWSKY, C.; BECHMAN, I. Inflammatory response after neurosurgery. **Best Pract Res Clin Anaesthesiol**, v. 18, n. 3, p. 407-424, 2004.

NAIR, K.P.; K.P.; TALY, A.B.; RAO, S.; MURALI, T. Afferent pathways of sympathetic skin response in spinal cord: a clinical and electrophysiological study. **Journal of Neurological Sciences**, v. 187, p. 77-80, 2001.

NASH, M.S. Immune responses to nervous system decentralization and exercise in quadriplegia. **Med Sci Sports Exerc**, v. 26, n. 2, p. 164-171, 1994.

NASH, M.S.; FLETCHER, M.A. The physiologic perspective: immune system. In: WHITENECK, G.G. **Aging With Spinal Cord Injury**. New York, Demos Publications, 1992, p. 159-182.

NASHMI, R.; FEHLINGS, M.G. Changes in axonal physiology and morphology after chronic compressive injury of the rat thoracic spinal cord. **Neuroscience**, v. 104, n. 1, p. 235-251, 2001.

NATIONAL SPINAL CORD INJURY ASSOCIATION. **Spinal cord injury and cure research**. Disponível em: <<http://www.spinalcord.org/html/factsheets/cure.php>> Acesso em 15 jun. 2004.

NEU, J.; SHENOY, V.; CHAKRABARTI, R. Glutamine nutrition and metabolism: where do we go from here? **Faseb J.**, v. 10, p. 829-837, 1996.

NEWSHOLME, P.; LIMA, M.M.; PROCOPIO, J.; PITHON-CURI, T.C.; DOI, S.Q.; BAZOTTE, R.B.; CURI, R. Glutamine and glutamate as vital metabolites. **Braz J Biol Res**, v. 36, n. 2, p. 153-163, 2003.

NEWSHOLME, P.; CURI, R.; PITHON-CURI, T.C.; MURPHY, C.J.; GARCIA, C.; PIRES DE MELO, M. Glutamine metabolism by lymphocytes, macrophages, and neutrophils: its importance in health and disease. **J Nutr Biochem**, v.10, p. 316-324, 1999.

NEWSHOLME, E.A. Glutamine metabolism in different tissues: its physiological and pathological importance. **Perspective in Clinical Nutrition**, p. 71-98, 1989.

NIEMAN, D.C.; PEDERSEN, B.K. Exercise and immune function. **Sports Med**, v.27, p.73-80, 1999.

NOREAU, L.; SHEPARD, R.H. Spinal cord injury, exercise and quality of life. **Sports Med**, v. 20, n. 4, p. 226-250, 1995.

OEHLER, R.; WEINGARTMANN, G.; MANHART, N.; SALZER, U.; MEISSNER, M.; SCHLEGEL, W.; SPITTLER, A.; BERGMANN, M.; KANDIOLER, D.; OISMULLER, C.; STRUSE, H.M.; ROTH, E. Polytrauma induces increased expression of pyruvate kinase in neutrophils. **Blood**, v. 95, p. 1086-1092, 2000.

OLIVE, J.L.; DUDLEY, G.A.; MCCULLY, K.K. Vascular remodeling after spinal cord injury. **Med Sci Sports Med**, v. 35, n. 6, p. 901-907, 2003.

OLIVE, J.L.; SLADE, J.M.; BICKEL, C.S.; DUDLEY, G.A.; MCCULLY, K.K. Increasing blood flow before exercise in spinal cord-injured individuals does not alter muscle fatigue. **J Appl Physiol**, n. 96, p. 477-482, 2004.

OSBORN, J.W.; TAYLOR, R.F.; SCHRAMM, L.P. Chronic cervical spinal cord injury and autonomic hyperreflexia in rats. **Am J Physiol**, n. 258, p. 169-174, 1990.

PAHLAVANI, M.A.; CHEUNG, T.H.; CHESKY, J.A.; RICHARDSON, A. Influence of exercise on the immune function of rats of various ages. **J Appl Physiol**, v. 64, p. 1997-2001, 1988.

PAN, W.; CORNELISSEN, G.; HALBERG, F.; KASTIN, A.J. Selective increase in TNF- α permeation across the blood spinal cord barrier after SCI. **J Neuroimmunology**, n. 134, p. 111-117, 2003.

PARRY-BILLINGS, M.; LEIGHTON, B.; DIMITRIADIS, G.; DE VASCONCELOS, P.R.; NEWSHOLME, E.A. Skeletal muscle glutamine metabolism during sepsis in the rat. **Int. J. Biochem.**, v. 21, p. 419-423, 1989.

PICK, E.; MIZEL, M. Rapid microassays for the measurement of superoxide and hydrogen peroxide production by macrophages in culture using an automatic enzyme immunoassay reader. **J. Immunol. Methods**, **46**: 211-226, 1981.

PIPE, R. K.; COLES, J. A.; FARLEY, S. R. Assays for measuring immune response in the mussel *Mytilus edulis*. **Tech. Fish Immunol.**, **4**:93-100, 1995.

PLUNKETT, J.A.; YU, C.G.; EASTON, J.M.; BETHEA, J.R.; YEZIERSKI, R.P. Effects of interleukin-10 (IL-10) on pain behavior and gene expression following excitotoxic spinal cord injury in the rat. **Experimental Neurology**, v. 168, p. 144-154, 2001.

POPOVICH, P.G.; VAN ROOIJEN, N.; HICKEY, W.F.; PREIDIS, G.; MCGAUGHY, V. Hematogenous macrophages express CD8 and distribute to regions of lesion cavitation after spinal cord injury. **Experimental Neurology**, v. 182, p. 275-287, 2002.

POPOVICH, P.G.; JONES, T.B. Manipulating neuroinflammatory reactions in the injured spinal cord: back to basics. **Pharmacological Sciences**, v. 24, n. 1, p. 13-17, 2003.

PRICE, M.J.; CAMPBELL, I.G. Effects of spinal cord lesion level upon thermoregulation during exercise in the heat. **Clinically Relevant**, v. 35, n. 7, p. 1100-1107, 2003.

PRIESTLEY, J.V. Neuroanatomy of the spinal cord: current research and future prospects. **Paraplegia**, n. 25, p. 198-204, 1987.

PUTZKE, J.D.; RICHARDS, J.S.; HICKEN, B.L.; DeVIVO, M.J. Predictors of life satisfaction: a spinal cord injury cohort study. **Arch Phys Med Rehabil**, v. 83, p. 555-561, 2002.

RASMANN-NULICEK, D.N. Body composition of patients with spinal cord injury. **Eur J Clin Nutr**, v. 42, p. 765-773, 1988.

RAY, C.A.; DUDLEY, G.A. Muscle use during dynamic knee extension: implication for perfusion and metabolism. **J Appl Physiol**, v. 85, n. 3, p. 1194-1197, 1998.

REDE SARAH DE HOSPITAIS DE REABILITAÇÃO. Informação sobre doenças tratadas. **Lesão medular.** Disponível em: <http://www.sarah.br/paginas/doencas/po/p_08_lesao_medular.htm> Acesso em: 15 jun. 2004.

REITZ, A.; SCHMID, D.M.; CURT, A.; KNAPP, P.A.; SCHURCH, B. Sympathetic sudomotor skin activity in human after complete spinal cord injury. **Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical**, v. 102, p. 78-84, 2002.

ROBERTS, D.; LEE, W.; CUNEO, R.C.; WITTMANN, J.; WARD, G.; FLATMAN, R.; MCWHINNEY, B.; HICKMAN, P.E. Longitudinal study of bone turnover after acute spinal cord injury. **J Clin Endocrinol Metab**, n. 85, p. 415-422, 1998.

ROGERO, M. M. **Efeitos do exercício e da suplementação com L-glutamina e L-alanil-Lglutamina sobre as concentrações de glutamina no plasma, músculo e fígado em ratos.** São Paulo, 2002. 120 f. Dissertação (Mestrado em Ciências dos Alimentos) – Área de Nutrição Experimental, Universidade de São Paulo.

ROHDE, T.; MACLEAN, D.A.; PEDERSEN, B.K. Effect of glutamine supplementation on changes in the immune system induced by repeated exercise. **Med. Sci. Sport. Exerc.**, v. 30, p. 856-862, 1998.

ROITT, I.; BROSTOFF, J.; MALE, D. **Imunologia**. São Paulo: Editora Manole Ltda, 1999. 423p.

ROSZMAN, T.L. The effect of hypothalamic lesions on the ability of adherent spleen cells to limit lymphocit blastogenesis. **Immunology**, v. 45, p. 737-742, 1982.

ROWBOTTOM, D.G.; KEAST, D.; GOODMAN, C.; MORTON, A.R. The haematological, biochemical and immunological profile of athletes suffering from the overtraining syndrome. **Eur J Appl Physiol**, v. 70, p. 502-509, 1995.

ROWBOTTOM, D.G.; GREEN, K. Acute exercise effects on the immune system. **Med Sci Sports Exerc**, v. 32, p. S396-S405, 2000.

ROWBOTTOM, D.G.; KEAST, D.; MORTON, A.R. The emerging role of glutamine as an indicator of exercise stress and overtraining. **Sports Med**, v.21, p. 80-97, 1996.

SAFARINEJAD, M.R. Level injury and hormone profiles in spinal cord-injured men. **Adult Urology**, n. 58, p. 671-676, 2001.

SAHLIN, K.; KATZ, A.; BROBERG, S. Tricarboxylic acid cycle intermediates in human muscle during prolonged exercise. **Am. J. Physiol.**, v. 259, p. C834-C841, 1990.

SAITO, H. Anabolic agents in trauma and sepsis: repleting body mass and function. **Nutrition**, v. 14, p. 554-556, 1998.

SCHEPPACH, W.; LOGES, C.; BARTRAM, P.; CHRISTL, S.U.; RICHTER, F.; DUSEL, G.; STEHLE, P.; FUERST, P.; KASPER, H. Effect of free glutamine and alanyl-glutamine dipeptide on mucosal proliferation of the human ileum and colon. **Gastroenterology**, v. 107, p. 429-434, 1994.

SCHWAB, J.M.; FREI, E.; KLUSMAN, I.; SCHNELL, L.; SCHWAB, M.E.; SCHLUESENER, H.J. AIF-1 expression defines a proliferating and alert

microglial/macrophage phenotype following spinal cord injury in rats. **J Neuroimmunology**, v. 119, p. 214-222, 2001.

SCHIMTZ, T. J. Lesão traumática da medula espinhal. In: O'SULLIVAN, S. B. & SCHIMTZ, T. J. **Fisioterapia: Avaliação e Tratamento**. São Paulo: Manole, 1993. p. 621-665.

SCHIMD, A. Catecholamines, heart rate, and oxygen uptake during exercise in persons with spinal cord injury. **Sports Med**, v. 85, n. 2, p. 635-641, 1998.

SHEPARD, R.J.; SHEK, P.N. Potential impact of physical activity and sport on the immune system – a brief review. **Br J Sport Med**, v. 28, p. 247-255, 1994.

SHERWOOD, E.R.; TOLIVER-KINSKY, T. Mechanisms of the inflammatory response. **Best Pract Res Clin Anaesthesiol**, v. 18, n. 3, p. 385-405, 2004.

SHIN, D.W.; YOON, Y.S.; MATSUMOTO, M.; HUANG, W.; CERAULO, P.; YOUNG, W. Glutamine synthetase induced spinal seizures in rats. **Yonsei Medical Journal**, v. 44, n. 1, p. 125-132, 2003.

SMITH, R.J. Glutamine metabolism and its physiologic importance. **Journal of Parenteral and Enteral Nutrition**, v. 14, n. 4, p. 40S-44S, 1990.

SOBLOSKY, J.S.; SONG, J.H.; DINH, D.H. Graded unilateral cervical spinal cord injury in the rat: evaluation of forelimb recovery and histological effects. **Behavioral Brain Research**, v. 119, p. 1-13, 2001.

SOMOGYI, G.T.; ZERNOVA, G.V.; YOSHIYAMA, M.; ROCHA, J.N.; SMITH, C.P.; DE GROAT, W.C. Change in muscarinic modulation of transmitter release in the rat urinary bladder after spinal cord injury. **Neurochemistry International**, v. 43, p. 73-77, 2003.

SPUNGEN, A.M.; ADKINS, R.H.; STEWART, C.A.; WANG, J.; PIERSON, R.N. JR.; WATERS, R.L.; BAUMAN, W.A. Factors influencing body composition in persons with spinal cord injury: a cross-sectional study. **J Appl Physiol**, n. 95, p. 2398-2407, 2003.

SPUNGEN, A.M.; BAUMAN, W.A.; WANG, J.; PIERSON, R.N. JR. The relationship between total body potassium and resting energy expenditure in individuals with paraplegia. **Arch Phys Med Rehabil**, v. 74, p. 968-968, 1993.

SUNG, J.K.; MIAO, L.; CALVERT, J.W.; HUANG, L.; LOUIS HARKEY, H.; ZHANG, J.H. A possible role of RhoA / Rho-kinase in experimental spinal cord injury in rat. **Brain Research**, n. 959, p. 29-38, 2003.

TALMADGE, R.J.; CASTRO, M.J. APPLE, D.F. JR.; DUDLEY, G.A. Phenotypic adaptations in human muscle fibers 6 and 24 wk after spinal cord injury. **J Appl Physiol**, n. 92, p. 147-154, 2002.

TAOKA, Y.; OKAJIMA, K.; UCHIBA, M.; MURAKAMI, K.; KUSHIMOTO, S.; JOHNO, M.; NARUO, M.; OKABE, H.; TAKATSUKI, K. Role of neutrophils in spinal cord injury in the rat. **Neuroscience**, v. 79, n. 4, p. 1177-1182, 1997.

TITUS, R.G.; CHILLER, J.M. A simple and effective method to assess murine delayed type hypersensitivity to proteins. **J Immunol Methods**, v.45, p. 65-78, 1981.

UMPHRED, D.A. **Fisioterapia Neurológica**. 2^a edição. Editora Manole. São Paulo, 1994.

VASCONCELOS, M.I.L.; TIRAPEGUI, J. Importância nutricional da glutamina. **Arq. Gastroenterol**. v. 35, p. 207-215, 1998.

VIEIRA, R.; HAEBISCH, E., HELL, N.S.; CURI, R. Sistema de natação para exercício físico de ratos. **Arq. Biol. Tecnol.**; v. 31, p. 387- 394, 1990.

WALSH, N.P.; BLANNIN, A.K.; CLARK, A.M.; COOK, L.; ROBSON, P.J.; GLEESON, M. The effects of high-intensity intermittent exercise on the plasma concentrations of glutamine and organics acids. **Eur J Appl Physiol**, v. 77, p. 434-438, 1998a.

WALSH, N.P.; BLANNIN, A.K.; ROBSON, P.J.; GLEESON, M. Glutamine, exercise and immune function: links and possible mechanisms. **Sports Med**, v.26, p. 177-191, 1998b.

WANG, C.X.; NUTTIN, B.; HEREMANS, H.; DOM, R.; GYBELS, J. Production of tumor necrosis factor in spinal cord following traumatic injury in rats. **Journal of Neuroimmunology**, n. 69, p. 151-156, 1996.

WANG, Y.H.; HUANG, T.S.; LIN, J.L.; HWANG, J.J.; CHAN, H.L.; LAI, J.S.; TSENG, Y.Z. Decreased autonomic nervous system activity as assessed by heart rate variability in patients with chronic tetraplegia. **Arch Phys Med Rehabil**, v. 81, p. 1181-1184, 2000.

WAGENMAKERS, A.J.M. Muscle amino acid metabolism at rest and during exercise: role in human physiology and metabolism. **Exerc Sport Sci Rev**, v. 26, p. 287-314, 1998.

WEAVER, L.C.; CASSAM, A.K.; KRASSIOUKOV, A.V. LLEWELLYN-SMITH, I.J. Changes in immunoreactivity for growth associated protein-43 suggest reorganization of synapses on spinal sympathetic neurons after cord transection. **Neuroscience**, v.81, n. 2, p. 535-551, 1997.

WECHT, J.M.; DE MEERSMAN, R.E.; WEIR, J.P.; SPUNGEN, A.M.; BAUMAN, W.A. Cardiac autonomic responses to progressive head-up tilt in individuals with paraplegia. **Clin Auton Res**, n. 13, p. 433-438, 2003.

WHALEN, M.M.; BANKURST, A.D. Effects of beta-adrenergic receptor activation: cholera toxin and forskolin on human natural killer cell function. **Biochem J**, v. 272, p. 327-331, 1990.

WHEELER, G.D.; ANDREWS, B.; LEDERER, R.; DAVOODI, R.; NATHO, K.; WEISS, C.; JEON, J.; BHAMBHANI, Y.; STEADWARD, R.D. Functional electric stimulation-assisted rowing: increasing cardiovascular fitness through functional electric stimulation rowing training in persons with spinal cord injury. **Arch Phys Med Rehabil**, v. 83, p. 1093-1099, 2002.

WILLIAMS, B.D.; CHINKES, D.L.; WOLFE, R.R. Alanine and glutamine kinetics at rest and during exercise in humans. **Med Sci Sports Exerc**, v. 30, n. 7, p. 1053-1058, 1998.

WINDMUELLER, H.G. Glutamine utilization by the small intestine. **Advances in enzymology and related areas of molecular biology**. New York: John Wiley & Sons, 1982.

WINSLOW, J.; JACOBS, P.L.; TEPAVAC, D. Fatigue compensation during FES using surface EMG. **Journal of Electromyography and Kinesiology**, n. 13, p. 555-568, 2003.

WU, S. K.; WILLIAMS, T. Factors influencing sport participation among athletes with spinal cord injury. **Med Sci Sports Exerc**, v. 33, n. 2, p. 177-182, 2001.

YING, Z.; ROY, R.R.; EDGERTON, V.R.; GOMEZ-PINILLA, F. Voluntary exercise increases neurotrophin-3 and its receptor TrkC in the spinal cord. **Brain Research**, v. 987, p. 93-99, 2003.

ZOICO, E.; ROUBENOFF, R. The role of cytokines in regulating protein metabolism and muscle function. **Nutrition Reviews**, v. 60, n. 2, p. 39-51, 2002.