

**ARMELE KARINA DA SILVA RODRIGUES**

**Efeitos da suplementação com Glutamina e Glutamato em cães com enterite  
hemorrágica**

**RECIFE**

**2016**

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO**  
**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA VETERINÁRIA**

**ARMELE KARINA DA SILVA RODRIGUES**

**Efeitos da suplementação com Glutamina e Glutamato em cães com enterite  
hemorrágica**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciência Veterinária do Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciência Veterinária.

**Orientador:**

Prof<sup>o</sup>. D<sup>o</sup>. Hélio Cordeiro Manso Filho

**Co-orientadora:**

Prof<sup>a</sup>. D<sup>a</sup>. Helena Emília Cavalcanti da Costa Cordeiro Manso

**RECIFE**

**2016**

Ficha catalográfica

R696e Rodrigues, Armele Karina da Silva  
Efeitos da suplementação com glutamina e glutamato em cães  
com enterite hemorrágica / Armele Karina da Silva Rodrigues.  
– Recife, 2016.  
40 f. : il.

Orientador: Hélio Cordeiro Manso Filho.  
Dissertação (Mestrado em Ciência Veterinária) – Universidade  
Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Medicina  
Veterinária, Recife, 2016.  
Referencias.

1. Aminoácidos 2. Albumina 3. Globulina 4. Linfócitos 5. Cão  
I. Manso Filho, Hélio Cordeiro, orientador II. Título

CDD 636.089

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO  
PRÓ REITORIA DE PESQUISA E PÓS GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA VETERINÁRIA

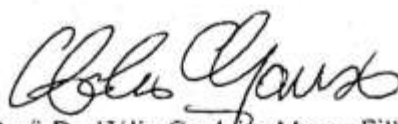
EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO COM GLUTAMINA E  
GLUTAMATO EM CÃES COM ENTERITE HEMORRÁGICA

Dissertação de mestrado elaborada por

ARMELE KARINA DA SILVA RODRIGUES

Aprovada em 17 / 02 / 2016

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Hélio Cordero Manso Filho

Universidade Federal Rural de Pernambuco – RFRPE



Prof. Dra. Erika Korinsky Wandersley

IBGM / Instituto Brasileiro de Saúde



Dra. Nubia Michelle Vieira da Silva

Universidade Federal da Paraíba / Centro de Ciências Agrárias



Prof. Dr. Giovanni Rota Bertani

Universidade Federal de Pernambuco - DBIOq

Dedico este título a minha mãe Helena Rodrigues,  
por todo amor.

## **AGRADECIMENTOS**

Certamente a vida foi bastante generosa, colocando ao meu lado pessoas realmente especiais e que fizeram toda a diferença na minha vida, e é chegada a hora de agradecer a vocês por toda a contribuição, ajuda e dedicação.

A minha mãezinha, meus sinceros agradecimentos pelo amor incondicional, eterna paciência, estímulo, apoio, carinho, coragem e por sempre acreditar que tudo daria certo, você sempre será minha pessoa preferida.

Ao meu amado Jorfred, conseguiu tornar a jornada mais leve e iluminada, muito obrigada pelas risadas, pelo amor, companheirismo, paciência e por ter se tornado um par tão incrível.

As minhas tias Lucia e Ceça, pela preocupação e principalmente por toda a torcida desde o início e a todos os tios e primos que partilharam da minha alegria.

A minha avó Rejane, Tia Angela e Tia Adi, um agradecimento especial por toda a contribuição em diferentes etapas da minha vida e principalmente por sempre acreditar na minha capacidade.

As eternas amigas e irmãs, Gisele Barbosa e Telga Lucena, que sempre com boa vontade ajudaram muito durante toda a pesquisa. Certamente não teria dado certo se elas não estivessem ao meu lado.

Aos meus amigos para sempre Givanildo, Claudia, Majjora e Nathalia meus verdadeiros alicerces durante todos esses anos, muito obrigada por toda ajuda, vocês sempre farão parte da minha vida.

As professoras Eneida Willcox e Mirian Teixeira, orientadoras durante a graduação, sem dúvida ajudaram a trilhar o caminho até aqui.

Aos professores Hélio Manso e Helena Emilia, que me receberam no BIOPA, foram ótimos orientadores contribuindo para o meu crescimento profissional.

A todos os membros do BIOPA, Beth, Monica, Carol, professora Lucia, Stephania, Erika sempre dispostos a ajudar.

A todos os professores, funcionários e amigos da Universidade Federal Rural de Pernambuco, obrigada pelo convívio e aprendizado.

Aos animais, parte fundamental desse trabalho, em especial aos meus anjinhos de quatro patas, Suzy, Luck e Rapunzel.

E a todos aqueles que direta ou indiretamente me ajudaram durante esses dois anos, com certeza sou resultado do carinho e apoio e todos vocês.

*“A felicidade aparece para aqueles que choram,  
para aqueles que se machucam, para aqueles que  
buscam e tentam sempre.”*

Clarice Lispector



## RESUMO

Sabe-se que a Glutamina desempenha diversas funções no organismo, além de ser uma importante fonte de energia para os enterócitos e sistema imune, objetivou-se avaliar o efeito da suplementação com Glutamina (GLN) e Glutamato (GLU) sobre as variáveis hematológicas e bioquímicas em cães que apresentassem quadro clínico de enterite. 15 cães foram selecionados e divididos em dois grupos: grupo 01 (G-CON) – 5 animais e grupo 02 (G-GLN) – 10 animais. Os animais pertencentes ao grupo 01 foram submetidos ao tratamento clínico sem suplementação e os animais pertencentes ao grupo 02 foram submetidos ao tratamento clínico e suplementados com uma mistura de GLN e GLU (Aminogut<sup>®</sup>, Ajinomoto do Brasil) por via oral, por um período de 14 dias. Foi realizado hemograma desses animais e determinação de GLN, GLU, proteína total (PT), albumina (ALB), globulina (GLOB), ureia (UR), creatinina (CREA), aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), colesterol total e triglicérido. Os resultados obtidos foram submetidos ao ANOVA e ao teste de Tukey, foi estabelecido o nível de significância em 5%. Após análise dos resultados observou-se alterações nas concentrações de GLN e GLU, PPT, GLOB, ALB, UR e triglicérido ( $P < 0,05$ ). A contagem de eritrócitos, concentração de hemoglobina, o percentual de hematócrito, os índices hematimétricos e contagem de plaquetas, não apresentaram diferenças ( $P > 0,05$ ). O leucograma demonstrou alteração significativa nos valores de leucócitos totais, neutrófilos e linfócitos ( $P < 0,05$ ), os demais parâmetros analisados não apresentaram variação estatística ( $P > 0,05$ ). Concluiu-se que em caninos com enterite, a suplementação com uma mistura de GLN + GLU associada ao tratamento medicamentoso foi capaz de produzir elevação nas células do sistema imune (leucócitos e linfócitos) e das proteínas e suas frações.

**Palavras chave:** aminoácidos, albumina, globulina, linfócitos

## ABSTRACT

We know that glutamine performs many functions in the body as well as being an important energy source for the enterocytes and immune system, the intention was to evaluate the effect of supplementation with Glutamine (GLN) and Glutamate (GLU) on hematologic variables and biochemical in dogs that presented clinical enteritis. 15 dogs were selected and divided into two groups: Group 01 (G-CON) - 5 animals and Group 02 (G-GLN) - 10 animals. The animals of the group 01 were subjected to medical treatment without supplementation and animals belonging to the group 02 were submitted to clinical treatment and supplemented with GLN and GLU (Aminogut®, Ajinomoto of Brazil) orally for a period of 14 days. It was conducted blood count of these animals and determination of GLN, GLU, total protein (TP), albumin (ALB), globulin (GLOB), urea (UR), creatinine (CREAT), aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), total cholesterol and triglycerides. The results obtained were submitted to ANOVA and Tukey test, it was established the level of significance of 5%. After analyzing the results It has been observed alterations in the concentrations of GLN and GLU, PPT, GLOB, ALB, UR and triglycerides ( $P < 0.05$ ). The count of erythrocytes, hemoglobin concentration, percentage of hematocrit, RBC indices and platelets count did not differ ( $P > 0.05$ ). The leucocyte count showed significant change in the total white blood cell values, neutrophils and lymphocytes ( $P < 0.05$ ), the other parameters analyzed did not show statistical change ( $P > 0.05$ ). We concluded that canines with enteritis, supplementation with a mixture of GLN + GLU associated with drug treatment was capable of producing elevation in immune cells (leukocytes and lymphocytes), proteins and its fractions.

**Key words:** amino acids, albumin, globulin, lymphocytes

## **LISTA DE TABELAS**

		Pag.
Tabela 1	The effect of glutamine and glutamate supplementation on blood metabolites and proteins in dogs with hemorrhagic enteritis	37
Tabela 2	Effect of glutamine and glutamate supplementation on blood cell numbers in dogs with hemorrhagic enteritis	38

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA	Aminoácido
AST	Aspartato aminotransferase
ALT	Alanina aminotransferase
ALB	Albumina
ATP	Adenosina Tri-Fosfato
BIOPA	Laboratório de Biologia Molecular Aplicada à Produção Animal
CHCM	Concentração de hemoglobina corpuscular média
Cl	Cloro
CO <sub>2</sub>	Gás carbônico
CPV-1	Parvovírus canino-1
CPV-2	Parvovírus canino-2
dL	Decilitro
EDTA-K3	Etilenodiaminotetra-acético tripotássico
g	Gramma
GLOB	Globulina
GLN	Glutamina
GLU	Glutamato
GS	Glutamina sintetase
K	Potássio
Kda	Kilodalton
Kg	Kilograma
mg	Miligrama
mmol	Milimol
Na	Sódio
PT	Proteína Total
U/L	Unidade por litro
VCM	Volume corpuscular médio
μl	Microlitro
μmol	Micromol

## LISTA DE SÍMBOLOS

~	Aproximadamente
%	Porcentagem
®	Marca registrada
[ ]	Concentração
>/<	Maior / Menor que

## SUMÁRIO

	Pag.
<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>13</b>
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b>	<b>15</b>
2.1 Metabolismo da Glutamina (GLN) e Glutamato (GLU)	15
2.2 Enterite: causas gerais	18
2.3 Alterações laboratoriais associadas à diarreia em cães	20
<b>3. OBJETIVO</b>	<b>21</b>
3.1 Geral	21
3.2 Específicos	21
<b>4. REFERÊNCIAS</b>	<b>22</b>
<b>5. ARTIGO: Effects of Glutamine and Glutamate supplementation in dogs with hemorrhagic enteritis</b>	<b>27</b>
<b>6. CONSIDERAÇÕES FINAIS</b>	<b>39</b>

## 1. INTRODUÇÃO

A Glutamina (GLN) é o aminoácido (AA) livre mais abundante no plasma e no tecido muscular e está associado a diversas funções metabólicas importantes, o que reforça seu papel essencial para o organismo. O emprego deste AA como suplemento nutricional tem sido estudado ultimamente e sua administração parenteral pode ser empregada com a finalidade de atenuar a redução na sua concentração plasmática, promover a síntese de proteínas e melhorar o sistema imunológico em doenças mais graves ou em estado catabólico (MASSAMBANI e BAZOTTE, 1998).

Já o Glutamato (GLU) é um AA não essencial mais abundante intracelular, é um componente natural encontrado em todos os alimentos que contem proteínas e pode ser absorvido rapidamente no intestino, o qual 50% deste é metabolizado em CO<sub>2</sub> (CURI, 2000; REEDS et al., 2000a, ROGERO et al., 2004).

Participam da síntese de GLN o músculo esquelético, os pulmões, fígado e cérebro, enquanto que as células da mucosa intestinal, leucócitos e células do túbulo renal são os principais consumidores deste AA (WALSH et al., 1998). Entre suas principais funções podemos citar a manutenção do sistema imunológico, equilíbrio do balanço ácido-básico durante estado de acidose, controle do volume celular, síntese de proteínas e construção de tecido muscular. O intestino delgado é considerado o principal sítio de metabolização da GLN, sendo este um substrato respiratório de grande importância para os enterócitos. A GLN adquirida pelas células intestinais pode ser da dieta ou do sangue arterial (CURI, 2000 e FORTI et al., 2004).

Em caninos, a exposição do trato gastrointestinal a infecções por diferentes patógenos, geralmente leva o paciente a um quadro de enterite e lesão da mucosa intestinal, ocasionando uma combinação de diarreia e má absorção de nutrientes, o quadro de enterite geralmente vem acompanhado de má absorção e má nutrição dos animais enfermos, dificultando a recuperação dos mesmos. E em diferentes espécies já foi demonstrado a importância deste AA para a saúde dos enterócitos, participando da redução do processo de atrofia da mucosa intestinal, elevação da sua capacidade absorptiva, favorecendo a proliferação de células do trato gastrointestinal sendo também importante para a manutenção da resposta imunológica, além de atenuar a proteólise e melhorar o balanço nitrogenado (CURI, 2000; PADOVESE et al., 2000; TAMS, 2005; BORGES et al., 2009; SCHENCK, 2010).

Objetivou-se avaliar o efeito da suplementação de uma mistura de Glutamina e Glutamato sobre as concentrações plasmáticas de GLN e GLU, biomarcadores bioquímicos e variáveis hematológicas de caninos com enterite.



## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Metabolismo da Glutamina (GLN) e Glutamato (GLU)

Nove aminoácidos são considerados essenciais: treonina, valina, leucina, isoleucina, metionina, fenilalanina, triptofano, lisina e histidina, estes devem ser ingeridos na alimentação, uma vez que sua síntese no organismo é inadequada para satisfazer as necessidades metabólicas do organismo. Enquanto que glutamina, glutamato, prolina, aspartato, arginina, alanina, glicina, tirosina e cistéina são considerados aminoácidos não essenciais (CHIPPONI et al., 1982).

Entretanto muitos aminoácidos não-essenciais devem ser ingeridos em certas condições onde a demanda metabólica excede a capacidade de síntese pelo organismo, esses são considerados aminoácidos “condicionalmente essenciais” (PADOVESE et al., 2002). É o que acontece com a GLN, onde em situações como trauma, septicemia e câncer a concentração intracelular e plasmática desse aminoácido pode reduzir até 50% (CURI, 2000).

A GLN ( $C_5H_{10}N_2O_3$ ) tem um peso molecular de aproximadamente 147,1 kda e pode ser sintetizada por todos os tecidos do organismo, na sua composição química tem-se o carbono, hidrogênio, oxigênio e nitrogênio. É um aminoácido regularmente produzido no organismo animal em condições normais de saúde, sendo este, o mais abundante no plasma e nos tecidos. O músculo esquelético é o principal tecido de armazenamento e síntese deste aminoácido, sendo sua concentração 30 vezes maior que a concentração sanguínea (CURI, 2000; ALBERTINI e RUIS, 2001; CRUZAT et al., 2009).

Pode ser sintetizado pelo organismo para preencher adequadamente as necessidades metabólicas durante o estado hígido, mas a demanda por esse aminoácido é maior em certas condições catabólicas como trauma, septicemia e câncer. Essas situações são caracterizadas pelo balanço nitrogenado negativo com elevação das taxas de degradação proteica muscular, o que provoca alteração no fluxo de GLN entre os tecidos com aumento do consumo deste aminoácido causando redução na sua concentração intracelular e plasmática. Sendo assim, quando a demanda é maior que a produção estabelece-se um quadro de deficiência de GLN, por essa razão esse aminoácido foi recentemente reclassificado como “condicionalmente essencial” (CURI, 2000; REEDS e BURRIN, 2001).

Este aminoácido apresenta diversas funções importantes no organismo, entre elas, a manutenção do sistema imunológico, equilíbrio do balanço ácido-básico durante estado de

acidose, controle do volume celular, desintoxicação corporal do nitrogênio e da amônia, controle entre o catabolismo e anabolismo e participa também da síntese de nucleotídeos fornecendo metade da exigência de nitrogênio para a síntese de purinas e pirimidinas (CURI, 2000; LOBLEY e HOSKIN, 2001). Atua também na síntese de proteínas e na construção de tecido muscular (FORTI et al., 2004) e é o principal nutriente para os enterócitos (TAMS, 2005 e SCHENCK, 2010). Participa diretamente do metabolismo energético, pois estimula a síntese de glicogênio, ou seja, atua diretamente na gliconeogênese, importante fonte de energia para os músculos (FORTI et al., 2003).

Dentre os principais órgãos envolvidos na sua síntese, inclui-se o músculo esquelético, pulmões, fígado e cérebro, os quais contêm atividade da enzima glutamina sintetase (GS). Por outro lado células da mucosa intestinal, leucócitos e células do túbulo renal contêm elevada atividade da enzima glutaminase e são primariamente consumidores de GLN (WALSH et al., 1998). A enzima glutamina sintetase participa da conversão de GLU em GLN com a utilização de amônia como fonte de nitrogênio e consumo de ATP (CURI, 2000).

Participam da regulação da glutamina sintetase, glicocorticoides, hormônios tireoidianos, hormônio do crescimento e insulina (CURI, 2000; SANTOS et al., 2007). Em resposta ao estresse a GLN pode ser mobilizada para o espaço extracelular, ao mesmo tempo em que pode aumentar sua captação pelos rins, fígado e intestino (NEWSHOLME, 1994; PITHON-CURI et al., 2004).

Na mitocôndria, a GLN pode ser desamidada a GLU, pela ação de duas isoformas de glutaminase, a glutaminase independente de fosfato e a glutaminase dependente de fosfato (PDG). Destas duas, apenas a PDG é responsiva a alterações no equilíbrio ácido-básico (CURI, 2000), em condições em que a resposta imune é prejudicada como em caso de envelhecimento ou desnutrição ocorre uma mudança na atividade de glutaminase dependente de fosfato, uma enzima chave do metabolismo da GLN (CURI et al., 1999).

A GLN presente no sangue é proveniente de três fontes: liberação da GLN presente nos espaços intercelulares dos músculos, degradação de proteínas musculares, da qual a GLN representa uma fração de 4% dos aminoácidos existentes e a transformação de outros aminoácidos em GLN (EHRlich e SHABERT, 1994). No estado pós-absortivo, a sua síntese no músculo esquelético ocorre por meio da captação do GLU a partir da circulação sanguínea, sendo este responsável por 40% da síntese de GLN (NEWSHOLME et al., 2003).

A hidrólise da GLN é o primeiro passo para a sua utilização, resultando em glutamato e amônia, o GLU resultante pode ser utilizado na síntese proteica ou convertido em  $\alpha$ -cetoglutarato, que é oxidado no ciclo de Krebs resultando na produção de 30 mols de ATP

(SOUBA et al., 1985; CURI, 2000). Essa hidrólise é responsável por regular os níveis de amônia nos tecidos, a qual pode ser tóxica para as células corporais. A amônia é utilizada para produzir GLN, que então é transferida para outros tecidos a fim de ser utilizada como combustível, especialmente para os enterócitos e para as células do sistema imune (PIVA et al., 2001).

A produção do GLU depende da ação da enzima glutaminase, encontrada em altas concentrações e associada às mitocôndrias nas células que utilizam glutamina. No fígado e músculo esquelético, o glutamato e a amônia podem ser combinados pela ação da glutamina sintetase para a produção da glutamina. O GLU é o mais abundante aminoácido intracelular, enquanto que a glutamina se apresenta em maior quantidade no sangue (CURI, 2000). É um aminoácido não essencial, encontrado na natureza e é um componente natural encontrado em todos os alimentos que contêm proteínas, como carnes, peixes, leite e vegetais. É absorvido rapidamente no intestino, o qual 50% deste é metabolizado em CO<sub>2</sub>, contribuindo para a produção de energia usada pelo intestino (REEDS et al., 2000a).

O GLU é o centro de carga proteica diária e exerce um papel chave na transaminação e desaminação de aminoácidos, o que inclui a formação de aspartato, alanina e GLN. Quando derivado da dieta o GLU pode substituir a GLN em diversos dos seus papéis metabólicos incluindo a geração de energia e síntese de aminoácidos. Sendo também precursor da síntese de ornitina em macrófagos e monócitos, conectando-o ao ciclo da ureia resultando na formação de arginina, que serve de substrato para a enzima oxido nítrico sintetase (REEDS et al., 2000b; NEWSHOLME et al., 2003).

Quando derivada das proteínas da dieta, a GLN é usada pelos enterócitos como principal fonte de energia (BAYNES e DOMINICZAK, 2007). Toda ou quase toda GLN consumida é absorvida pelos enterócitos, que necessitam sintetizar constantemente compostos estruturais, pois são células que se renovam rapidamente. A sua absorção ocorre no lúmen intestinal através das microvilosidades dos enterócitos e quanto maior a sua concentração no lúmen, maior será o transporte através do sistema transportador de nitrogênio e sua liberação no sangue via sistema porta (SOUBA et al., 1990; SOUBA, 1993)

A GLN é constantemente utilizada por células isoladas do sistema imune, como linfócitos, macrófagos e neutrófilos, além de ser importante para a proliferação dos macrófagos e morte bacteriana pelos neutrófilos (NEWSHOLME, 2001). Sua concentração no sangue cai significativamente em doenças graves, levando a um estado de depleção acentuada desse aminoácido (SOUBA et al., 1990). Em condições como estresse, câncer, sepse ou lesões graves, os órgãos necessitam de uma demanda muito maior de GLN, o que

pode não ser suprido apenas pela síntese corporal, podendo ser utilizada a suplementação com este aminoácido (FORTI et al., 2004).

Em situações patológicas a GLN adicionada à dieta melhora as funções imunes intestinais, a sua administração exógena favorece a proliferação de células do trato gastrointestinal e é importante para a manutenção da resposta imunológica, além de atenuar a proteólise e melhorar o balanço nitrogenado. Efeitos positivos do fornecimento de GLN ou seus precursores têm sido relatados em pacientes submetidos à cirurgia, tratamento de radiação ou transplante de medula óssea, queimaduras ou sepse (CURI et al., 1999; CURI, 2000).

Nutrição e funcionalidade intestinal são fatores que estão sempre relacionados, sendo assim, enfermidades gastrointestinais resultam em má nutrição. A adição de GLN na dieta desses pacientes reduz o processo de atrofia da mucosa intestinal, além de elevar a sua taxa de crescimento e a capacidade absorptiva de nutrientes, atuando também como precursor na síntese de N-acetil-glicosamina e N-acetil-galactosamina que possuem papel importante na produção de mucina e portanto na manutenção da barreira de proteção contra a invasão de agentes bacterianos (KHAN et al., 1999; PADOVESE, et al., 2000).

O intestino delgado é o principal sitio de metabolização da GLN, sendo este um substrato respiratório mais importante para os enterócitos do que a glicose. As células intestinais adquirem a glutamina através do sangue arterial e da dieta (CURI, 2000).

## **2.2 Enterite: causas gerais**

O trato gastrointestinal é um grande órgão que fornece uma barreira de proteção para o organismo e promove a absorção de nutrientes. A mucosa do trato gastrointestinal protege o corpo da invasão de bactérias, toxinas e outros agentes prejudiciais (SCHENCK, 2010). Este órgão representa o maior tecido imune do organismo e é responsável pela digestão e absorção dos nutrientes, além disso é o principal tecido de captação e metabolização da GLN que é consumida primariamente pelas células da mucosa intestinal (BORGES et al., 2008).

O intestino delgado é o primeiro sitio de digestão e absorção de nutrientes. É caracterizado pela presença de microvilosidades, que aumenta a área de superfície do intestino delgado e promove uma maior área de absorção dos nutrientes. Os enterócitos são as células especializadas da mucosa, que contem enzimas necessárias para a absorção dos nutrientes (SCHENCK, 2010).

Cerca de 50% das necessidades energéticas dos enterócitos podem ser supridas pela absorção de nutrientes que ocorre no lúmen intestinal, sendo o restante suprido pela corrente circulatória. A entrada de nutrientes no lúmen intestinal permite a nutrição das próprias células intestinais e a presença desses nutrientes funciona como um estímulo trófico para a mucosa intestinal, permitindo maiores taxas de replicação e diferenciação celular, melhorando a mucosa intestinal, maior capacidade de absorção e defesa contra a entrada de antígenos. Desta forma, a nutrição tem um papel significativo no TGI de animais saudáveis e doentes. (BRUNETTO, 2009). Entretanto, os caninos encontram-se sujeitos a infecções por muitos patógenos, dentre os quais podemos citar os fungos, vírus, riquetsias, bactérias, protozoários, algas e parasitas, que podem levar a quadros gastroentéricos que variam de leve a grave, dependendo do agente envolvido (BORGES et al., 2008).

O quadro de enterite é comum em cães e gatos, caracterizada por um começo repentino de vômito e diarreia. Existe um número de causas potenciais para as enterites, incluindo dieta inadequada, ingestão de corpo estranho, infecção bacteriana, parasitas intestinais, infecção viral ou ingestão de toxinas. Agentes bacterianos incluem *Campylobacter*, *Clostridium*, *E. coli*, *Salmonella* e *Staphylococcus*. As causas virais de enterite em cães incluem parvovirose 1 e 2, vírus da cinomose, coronavírus, astrovírus e rotavírus, sendo as três últimas mais raras (TAMS, 2005 e SCHENCK, 2010).

A parvovirose em cães é mais severa do que a doença causada por coronavírus. Enterites resultam em lesão à mucosa intestinal que induz uma combinação de diarreia secretória e má absorção (TAMS, 2005). As diarreias agudas são agrupadas por mecanismo ou doença, os mecanismos mais comuns incluem secreção anormal de fluidos, má absorção e motilidade intestinal anormal.

Existem dois tipos de parvovírus que infectam o cão, o parvovírus canino-1 (CPV-1), relativamente não patogênico que causa, algumas vezes, gastroenterite, pneumonite e/ou miocardite em caninos muito jovens, e o parvovírus canino-2 (CPV-2) que é responsável pela clássica parvovirose canina, o vírus causa aparecimento dos sintomas em aproximadamente 5 a 12 dias após a infecção por via oral-fecal, invade e destrói células em rápida divisão como células hematopoiética e epitélio da cripta intestinal (WILLARD, 2006).

O CPV-2 é altamente contagioso, e a infecção pode ocorrer como resultado do contato ambiental com fezes contaminadas. No entanto constituem fomites pessoas, instrumentos e equipamentos, assim como os insetos e roedores também podem representar vetores de transmissão (MCCAWE e HOSKINS, 2006).

Acomete principalmente os cães jovens, talvez pelo fato dos cães adultos serem mais resistentes pela imunidade naturalmente adquirida (SOUZA e ZAPPA, 2008). Os cães das raças doberman, pinscher, rotwailer, pit bull e labrador retriever são mais suscetíveis do que os de outras raças. O diagnóstico é baseado na anamnese e nas alterações encontradas no exame físico, entretanto o teste ELISA para CPV-2 nas fezes é o melhor teste diagnóstico (WILLARD, 2006).

### **2.3 Alterações laboratoriais associadas à diarreia em cães**

Em caso de parvovirose, as alterações hematológicas podem ajudar no diagnóstico, se revelar leucopenia com neutropenia e linfopenia (HALL e GERMAN, 2005). É possível notar aumento do hematócrito, da concentração de hemoglobina e da contagem de eritrócitos, bem como do teor plasmático ou sérico de proteínas, no caso de diarreia aguda, alterações provocadas pela perda de fluido no trato gastrointestinal e consequente desidratação (LASSEN, 2006).

Em caso de diarreia aguda podem ocorrer alterações variáveis na contagem de leucócitos. Caso a diarreia seja causada por microorganismos infecciosos, o sequestro de neutrófilos e a intensa demanda tecidual podem ocasionar leucopenia por neutropenia. Demanda tecidual menos grave pode induzir a neutrofilia com desvio à esquerda (LASSEN, 2006). Linfócitos, macrófagos e neutrófilos desempenham um papel importante na resposta imune e inflamatória, sendo estimulados durante, por exemplo, uma infecção bacteriana ou viral. Os neutrófilos constituem 60% dos leucócitos circulantes e atuam como primeira linha de células de defesa no plasma executando a fagocitose (CURI et al., 1999).

Os dois principais tipos de proteínas do plasma são a albumina e a globulina, a albumina é a menor delas e encontra-se em maior quantidade em relação a globulina. Quando a absorção intestinal está comprometida, pode ocorrer uma menor absorção de aminoácidos, levando a uma menor produção de albumina já que o fígado utiliza aminoácidos para a sua síntese (LASSEN, 2006).

Sódio (Na), potássio (K) e cloro (Cl) são os eletrólitos mais avaliados em medicina veterinária. Distúrbios ácido-básicos ou eletrolíticos nesses pacientes podem ser observados, entretanto são variáveis e imprevisíveis. A perda desses eletrólitos pode resultar em menor concentração sérica dos mesmos (KERR, 2003; LASSEN, 2006; BUSH, 2004).

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Geral**

Avaliar o efeito da suplementação com Glutamina (GLN) e Glutamato (GLU) sobre os biomarcadores hematológicos e bioquímicos em caninos com quadro clínico de enterite.

#### **3.2 Específicos**

Avaliação hematológica e bioquímica de caninos apresentando quadro clínico de enterite;

Estudo hematológico e bioquímico da influência da glutamina na suplementação desses animais;

Comparar a resposta ao tratamento sintomático juntamente com a suplementação frente ao uso apenas do tratamento sintomático;

Contribuir com o desenvolvimento de programas nutricionais para animais com outras enfermidades gastrointestinais.

#### 4. REFERÊNCIAS

ALBERTINI, S. M.; RUIZ, M. A. O papel da glutamina na terapia nutricional do transplante de medula óssea. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**. v.23, n.1, p.41-47, 2001.

BAYNES, J. W.; DOMINICZAK, M. H. **Bioquímica médica**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2007.

BORGES, M. A.; ROGERO, M. M.; TIRAPEGUI, J. Suplementação enteral e parenteral com glutamina em neonatos pré-termos com baixo peso ao nascer. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. v.44, n.1, 2008.

BORGES, O. M. M.; SOUZA, A. P.; MESDES, R. S.; LUCENA, J. A. O.; MAIA, R. D.; SILVA, R. M. N.; TORRES, L. M.; DANTAS, A. K. F. P. Incidência de cinomose e parvovirose em cães acometidos por gastroenterite diagnosticados pelo método de imunocromatografia. **VI Congresso de Iniciação Científica da Universidade Federal de Campina Grande**. 2009.

BUSH, B. M. **Interpretação de resultados laboratoriais para clínicos de pequenos animais**. São Paulo: Roca, 2004.

BRUNETTO, M. A. Nutrição Clínica – Emergência e cuidados intensivos. **Revista Clínica Veterinária**, v.78, p.41-46. 2009.

CHIPPONI, X. J.; BLEIER, J. C.; SANTI, M. T.; RUDMAN, D. Deficiencies of essential and conditionally essential nutrients. **The American Journal of Clinical Nutrition**. v.35, n.5. p. 1112-1116, 1982.

CRUZAT, V. F.; PETRY, E. A.; TIRAPEGUI, J. Glutamina: Aspectos bioquímicos, metabólicos moleculares e suplementação. **Revista Brasileira de Medicina e Esporte**. v.15, n.5, 2009.



CURI R, NEWSHOLME P, PITHON-CURI PC, et al. Metabolic fate of glutamine in lymphocytes, macrophages and neutrophils. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. v.32, n.1. p.15-21, 1999.

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

EHRlich, N.; SHABERT, J. The Ultimate Nutrient: Glutamine. **Garden City Park, New York: Avery Publishing Group**. v.14, p.15-20, 1994.

FORTI, F.; CANCELLIERO, K. M.; GUIRRO, R. R. J.; SILVA, C. A. Efeitos da glutamina e da estimulação elétrica sobre o perfil metabólico de músculos desnervados. **Revista Brasileira de Educação Física**. v.18, n.3, p.273-281, 2004.

FORTI, F.; CANCELLIERO, K. M.; SILVA, C. A.; GUIRRO, R. R. J. O efeito da glutamina no músculo esquelético desnervado. **Saúde em Revista**. v.9, p.59-65, 2003.

HALL, E. J.; GERMAN, A. J. Diseases of the Small Intestine. In: ETTINGER, S. J. e FELDMAN, E. C. **Textbook of Veterinary Internal Medicine**. Philadelphia: Saunders Company, 2005.

KHAN, J.; LIBOSHI, L.; CUI, L.; WASSA, M.; SANDO, K.; TAKAGI, Y.; OKADA, A. Alanil-glutamine supplemented parenteral nutrition increase luminal mucus gel and decreases permeability in the rat small intestine. **Journal of Parenteral and Enteral Nutrition**, v. 23, p.24-31, 1999.

KERR, M. G. **Exames laboratoriais em medicina veterinária: bioquímica clínica e hematologia**. 2. Ed. São Paulo: Roca, 2003.

LASSEN, E. D. Avaliação laboratorial da digestão e da absorção intestinal. In: THRALL, M. A. **Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária**. São Paulo: Roca, 2006.

LOBLEY, G. E.; HOSKIN, S. O. Glutamine in animal science and production. **Journal of Nutrition**, v. 131, p.2525-2531, 2001.

MASSAMBANI, E. M; BAZOTTE, R.B. Importância da glutamina na terapia nutricional. **Arquivos de Ciências da Saúde da Unipar**, v.2, n.3, 1998.

MCCAW, D.L.; HOSKINS, J.D. Canine Viral Enteritis. In: GREENE, C. E. **Infectious Diseases of the Dog and Cat**. 3. Ed. Philadelphia: Saunders Elsevier, 2006.

NEWSHOLME, E. A. Biochemical mechanisms to explain immunosuppression in well-trained and overtrained athletes. **Internacional Journal of Sports Medicine**. v.15, n.3, p.142-171, 1994.

NEWSHOLME, P. Why is L-glutamine metabolism important to cells of the immune system in health, postinjury, surgery or infection? **The Journal of Nutrition**. v.131, n. 9, p. 2515S-2522S. 2001.

NEWSHOLME, P.; PROCOPIO, J.; LIMA, M. M. R.; PITHON-CURI, T. C.; CURI, R. Glutamine and glutamate – their central role in cell metabolism and function. **Cell Biochemistry and Function**. v.21, p.1-9, 2003.

PADOVESE, R.; GAZZOLA, J. LIMA, M. R.; CURI, R. Aplicações clínicas da glutamina. **Revista Contexto e Saúde**. Ano 2. n. 3, p. 67-86, 2002.

PADOVESE, R.; LIMA, M. R.; GAZZOLA, J.; CURI, R. Aplicações clínicas da glutamina. In CURI, R. **Glutamina: metabolismo e aplicações clínicas e no esporte**. Rio de Janeiro: Sprint, 2000.

PITHON-CURI, T. C.; DE MELO, M. P.; CURI, R. Glucose and glutamine utilization by rat lymphocytes, monocytes and neutrophils in culture: a comparative study. **Cell Biochemistry and Function**. v. 22, n. 5, p.321-326, 2004

PIVA, A.; BACH KNUDSEN, K. E.; LINDBERG, J. E. Glutamine in gut metabolism. In: **Gut environment of pigs**. 2001.

REEDS, P.J.; BURRIN, D.G. Glutamine and the bowel. **Journal of Nutrition**, v.131, p.2505s-2508s, 2001.

REEDS, P. J.; BURRIN, D. G.; DAVIS, T. A.; FIOROTTO, M. L.; STOLL, B.; VAN GOUDOEVER, J. B. Protein nutrition of the neonate. **Proceedings of the Nutrition Society**. v.59, n.1, p. 87-97, 2000a

REEDS, P. J., BURRIN, D. G., STOLL, B., & JAHOOR, F. Intestinal glutamate metabolism. **The Journal of nutrition**, v.130, n. 4, p.978-982, 2000b

ROGERO, M. M.; TIRAPEGUI, J.; PEDROSA, R. G.; CASTRO, I. A.; PIRES, I. S. O. Plasma and tissue glutamine response to acute and chronic supplementation with L-glutamine and L-alanyl-L-glutamine in rats. **Nutrition Research**. v.24, p.261-270, 2004.

SANTOS, R. V.; CAPURETO, E. C.; COSTA ROSA, L. F. B. P. Effects of acute exhaustive physical exercise upon glutamine metabolism of lymphocytes from trained rats. **Life Science**. v.80, n.6, p.573-578, 2007.

SCHENCK, P. A. **Home-prepared dog and cat diets**. United States: Wiley-Blackwell. 2010.

SOUBA, W. W.; SMITH, R. J.; WILMORE, D. W. Glutamine metabolism by the intestinal tract. **Journal of Parenteral Enteric Nutrition**, v. 9, p.608-617, 1985.

SOUBA, W. W. Intestinal glutamine metabolism and nutrition. **The Journal of Nutritional Biochemistry**. v.4, n.1, p.2-9, 1993.

SOUBA, W. W.; KLIMBERG, V. S.; PLUMLEY, D. A.; SALLOUM, R. M.; FLYNN, T. C. et al. The role of glutamine in maintaining a healthy gut and supporting the metabolic response to injury and infection. **Journal of Surgical Research**. v.48. p.383-391, 1990.

SOUZA, J. M.; ZAPPA, V. Parvovirose canina. **Revista Científica Eletônica de Medicina Veterinária**. Ano, 6, n.11, 2008.

TAMS, T. R. **Gastroenterologia de pequenos animais**. São Paulo: Roca, 2005

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

WILLARD, M. D. In NELSON, R. W.; COUTO, C. G. **Medicina interna de pequenos animais**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2006.

## 5. ARTIGO

### **Effects of Glutamine and Glutamate supplementation in dogs with hemorrhagic enteritis**

A.K.S. Rodrigues<sup>a</sup>, G.B. Silva<sup>a</sup>, T.L.A.C. Almeida<sup>a</sup>, N. M. Borba<sup>b</sup>, H.E.C.C. Cordeiro Manso<sup>a</sup>, H.C. Manso Filho<sup>c,\*</sup>

<sup>a</sup> *Laboratório de Biologia Molecular Aplicada da Produção Animal (BIOPA), Departamento de Zootecnia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Rua Dom Manoel de Medeiros, S/N, Recife, Brasil*

<sup>b</sup> *Departamento de Medicina Veterinária Universidade Federal Rural de Pernambuco, Rua Dom Manoel de Medeiros, S/N, Recife, Brasil*

<sup>c</sup> *Núcleo de Pesquisa Equina, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Rua Dom Manoel de Medeiros, S/N, Recife, Brasil*

## Abstract

This study aimed to evaluate the effect of the Glutamine (GLN) and Glutamate (GLN) supplementation on hematological and biochemical biomarkers in dogs with clinical enteritis. Fifteen young dogs (3-10 months) with clinical enteritis were divided into two groups: group 01 (G-CON) - 5 animals subjected to medical treatment without supplementation and group 02 (G-GLN) - 10 animals subjected to medical treatment and orally supplemented with GLN and GLU (Aminogut, Ajinomoto of Brazil) for 14 days. The following blood variables were measured: blood count, GLN and GLU, total protein (TP), albumin (ALB), globulin (GLOB), urea (UR), creatinine (CREAT), aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), total cholesterol and triglycerides. Supplementation changed the concentrations of GLN and GLU, PT, GLOB, ALB, UR and triglycerides ( $P < 0.05$ ). The count of erythrocytes, hemoglobin concentration, percentage of hematocrit, RBC indices and platelets count did not differ ( $P > 0.05$ ). There was significant elevation in total white blood cells, neutrophils and lymphocytes ( $P < 0.05$ ) after supplementation, but other variables were not significantly different ( $P > 0.05$ ). A mixture of GLN + GLU along with drug treatment is therefore capable of producing elevations in immune cells (leukocytes and lymphocytes) and biomarkers associated with markers of protein metabolism and health that favor recovery of the animals without causing damage to renal and hepatic systems.

**Keywords:** amino acids, albumin, globulin, lymphocytes.

## Introduction

Enteritis is common in both young and adult dogs and can result in high morbidity and mortality. It may present different etiologies, among which the most common are infections (viral and bacterial), intestinal parasites and ingestion of toxins present in dog's food (SASAKI et al, 1999).

Clinical enteritis is regularly accompanied by malabsorption, and thus malnutrition, that complicates recovery and may increase mortality. In part, this is due to the loss of the enteric barrier, which not only reduces the uptake of nutrients, but also allows entry of pathogens into the bloodstream. Thus two major cell types affected by enteritis are enterocytes and cells of the immune system, such as lymphocytes and macrophages. These cells show high rates of cell proliferation and are known to be major consumers of glutamine (GLN) and glutamate (GLU).

Glutamine is the most abundant free alpha amino acid in dog and is a major form of transport of nitrogen, carbon and energy in the body (SOUBA, 1990). Glutamine is produced in muscle, liver and lung, and is considered a non-essential amino acid because, in healthy conditions, it can be synthesized in sufficient amounts within the body. However, in catabolic conditions such as septicemia, gastroenteritis and others showing high rates of protein degradation the high demand for endogenous Gln may result in Gln deficiency. Thus under these conditions Gln is recognized as being a conditionally essential amino acid (LOBLEY et al., 2001; WERNERMAN, 2008).

A number of studies have demonstrated the importance of GLN to the health of the intestine. In GLN supplemented pigs, Dell'Orto et al., (2002) observed an increase in villus height and crypt depth in the ileum. Similarly, Wilmore et al., (1990) showed that diets containing supplemental GLN reduce intestinal injury caused by chemotherapy in animals with cancer. Similarly, supplemental glutamine has been shown to improve immune function. Given these findings we tested the effect of supplementation with a mixture of Glutamine and Glutamate in the treatment of enteritis. Such supplementation, in combination with standard medical treatment, showed improvements in blood immune function and makers of general health that could improve the recovery of dogs with enteritis.

## Materials and methods

### *Animals*

The Committee of Ethics and Animal Welfare of UFRPE-CEUA authorized this research by protocol #23082.006184/2010. Fifteen young dogs (3-10 months), of both sexes were obtained from two veterinary centers in the City of Recife. The criterion for selection of patients was the observation of enteritis in the clinical examination. After clinical examination and confirmed diagnosis of enteritis, they were randomly divided into two groups. One group received standard drug treatment (n = 5, weight 6.4±0.3 Kg) (G-CON) and the second group received the standard drug treatment plus oral supplementation with a mixture of Glutamine (GLN) and Glutamate (GLU) (n = 10, weight 8.0±0.5 Kg) (G-GLN).

### *Supplementation and Treatment*

The animals in the G-GLN were supplemented with 0.5g/Kg/day of a mixture of L-Glutamine and L-Glutamic Acid (Aminogut, Ajinomoto do Brazil), orally, mixed with a very small amount of concentrate for a period of 14 days, shortly after the clinical care. All of the animals from G-CON and G-GLN groups received the same standard medical treatment: fluid therapy with ringer lactate or sodium chloride, ceftriaxone (25mg/Kg, BID, IV), maropitant (1.0mg/Kg, SID, SC), ondansetron (0.2mg/Kg, SID, IV) for seven days.

### *Sampling and laboratory analysis*

Blood samples were obtained by venipuncture from the jugular vein on the first visit to the veterinary clinic (pre-test), and seven and 14 days after initiation of treatments. The samples were divided in three aliquots, one aliquot placed into tubes containing anticoagulant (EDTA-K3) for determination of RBC variable, the second aliquot into a tube without anticoagulant to obtain serum for biochemical analyzes, and the third aliquot into tubes containing sodium heparin for GLN and GLU determination in plasma. Blood cell counts were processed according to Weiss and Wardrop, (2005). Biochemical analyzes (UR, CREAT, AST, ALT, TP, ALB, total cholesterol and triglycerides) were performed commercial kits and a semi-automatic analyzer (Doles D-250, Doles, Brazil). Globulin was obtained from the difference between total protein and albumin (Weiss and Wardrop, 2005).



The GLN and GLU concentrations in plasma were determined enzymatically in deproteinized and neutralized extracts (Manso Filho et al., 2008). All personnel involved in the analyzes were unaware of the supplementation program or clinical condition of the animals.

### *Statistical analysis*

The results were subjected to one-way ANOVA and if significant differences were observed analysis using the Tukey test. In all cases, the stated value of  $P$  was 5%. The method of Pearson was used to determine correlations between analyzed variables. The results were analyzed using SigmaStat 13.0 software for Windows and the results are expressed as mean  $\pm$ SEM.

### **Results**

Differences were observed among groups in concentrations of Glutamine, Glutamate, total protein, albumin, globulin, urea and triglycerides ( $P < 0.05$ ) (Table 1). The highest [Glutamine] was observed in the supplemented group (G-GLN) at 14 days and the lowest in the control group (G-CON) after seven days of treatment. The lowest [Glutamate] was observed in the G-GLN group and highest in the G-CON 14 days ( $P < 0.05$ ). The highest concentration of total protein, albumin and globulin were observed in the G-GLN group at 14 days, and the lowest values for total protein ( $\sim 4.57$  g/dL) and globulin ( $\sim 3.11$  g/dL) concentrations which occurred at seven days, and for [albumin] at 14 days in the G-CON group ( $P < 0.05$ ). The highest [Urea] was observed in the L-GLN group at seven days ( $\sim 38.23$  mg/dL) and the lowest in the pre-testing phase ( $\sim 18.70$  mg/dL). The concentration of triglycerides rose significantly in the G-GLN group after 14 days of supplementation ( $\sim 127.01$  mg/dL) compared with the G-CON group. Other biomarkers (creatinine, ALT, AST, and total cholesterol) were not significantly different ( $P > 0.05$ ) for any treatment or sampling times. Glutamine concentration was positively correlated with total protein ( $R^2 = 0.43$ ;  $P < 0.05$ ), albumin ( $R^2 = 0.33$ ;  $P < 0.05$ ), globulin ( $R^2 = 0.43$ ;  $P < 0, 05$ ) and triglycerides ( $R^2 = 0.31$ ;  $P < 0.05$ ). Urea also showed significant correlation with the total protein ( $R^2 = 0.35$ ;  $P < 0.05$ ), albumin ( $R^2 = 0.34$ ;  $P < 0.05$ ) and globulin ( $R^2 = 0.33$ ;  $P < 0.05$ ). As creatinine, which also correlated with total protein ( $R^2 = 0.45$ ;  $P < 0.05$ ), albumin ( $R^2 = 0.43$ ;  $P < 0.05$ ) and globulin ( $R^2 = 0.44$ ;  $P < 0.05$ ).

The concentration of the total leukocytes has been reduced in the pre-test but after treatment occur elevation in this values in both groups. The highest value of the total leukocytes was observed in the G-GLN groups at 14 days ( $P < 0.05$ ). The concentration of segmented neutrophils was also higher in the G-GLN group at seven days when compared with other groups ( $\sim 6175.13 \mu\text{L}$ ) ( $P < 0, 05$ ). Similarly it was observed that the absolute concentration of lymphocytes was increased at 14 days in the G-GLN group ( $P < 0.05$ ). The count of erythrocytes, hemoglobin concentration, percentage of hematocrit, MCV, MCHC, [Eosinophils], [Monocytes] and platelets count were not significantly different among groups ( $P > 0.05$ ).

## Discussion

In severe illnesses such as cancer, sepsis and burns, often occurs catabolic process that is associated with the increase in Glutamine degradation. Also, it is known that a rapid decrease in [GLN] in patients with catabolic state increases the rate of mortality or recovery time (HACKETT, 2011; WERNERMAN, 2008). It is often suggested supplementation with GLN to patients in catabolic state in an attempt to prevent or reduce the functional impairment of different tissues and promote recovery. Also, this type of supplementation with GLN is associated with recovery of the enterocytes, but there is little clues about the effects of GLN supplementation in sick dogs.

In this study it was demonstrated that [GLN] in G-GLN was  $\sim 40\%$  higher than that described in the G-CON after 14 days of supplementation with GLN+GLU and  $\sim 56\%$  when compared to the values observed in sick dogs in pretest phase. Also, it was also observed that [GLN] in the pretest phase and the G-CON were lower than the values reported in literature for healthy dogs ( $\sim 0.80 \mu\text{mol/mL}$ ) (ARCHIBALD 1944; IWASHITA, 2005), however the values described for healthy dogs are similar to those of G-GLN 14 days ( $\sim 0.83 \mu\text{mol/mL}$ ). It should be noted that [GLN] can be very low in dogs with cancer and pyometra ( $< 0.3 \text{ mmol/L}$ ) (SOUBA, 1993), values that was not observed in actual dogs with enteritis in any period.

The supplementation with GLN in sick and healthy animals is described (HUMBERT et al., 2002; HACKETT, 2011). There are indications in the literature for the L-GLN supplementation ranging from 0.24 - 0.50 g/Kg for dogs (CENTER, 2004; HACKETT, 2011), and in the present experiment we used a supplement that it is a mixture of GLN+GLU and we gave 0,5g/Kg/day *orally*. There are two studies that try to identify the effects of L-GLN in dogs, and in one, dogs with hypercatabolic state were supplemented with L-GLN (intra-gastric

plus parenterally) and found a large increase in the appearance rate of GLN in plasma, changing from ~0.76 in control dogs to ~1.35 $\mu$ mol/mL in supplemented dogs (HUMBERT et., 2002). Another one, in dogs affected by parvovirus and supplemented with L-GLN (0,50g/Kg orally) were not observed beneficial effects, with similar mortality rate in the control and supplemented group (COSTA et al., 2009), however in this study the authors did not present blood [GLN] in both groups.

Different studies have demonstrated that dogs with gastroenteritis tend to have hypoproteinemia since intestinal absorption is impaired, resulting in a lower uptake of proteins and amino acids in the intestines and high nutrient loss (TESSARI, 2000; REEDS, 2001). In the dogs of G-GLN group was observed a rise in [total protein] and [albumin] of ~46% and ~32%, respectively, when compared to animals in the pre-test phase. The increase in [total protein] was attributed to both the increase in albumin as the globulin fraction, especially in the G-GLN. Moreover, it should be noted that there was an increase in the concentration of urea in both groups ( $P < 0.05$ ), but showed no change in creatinine experimental animals ( $P < 0.05$ ), and these values were not so different from those described in the literature for healthy dogs (KANEKO, 2008). Finally, it should be noted that some of these increases is due to the increase in the overall protein metabolism, which favored the increase in the concentrations of total protein, albumin and globulin but no apparent impairment of renal system.

It is known that GLN is used at high rates by lymphocytes, macrophages and neutrophils, proving to be an important nutrient for their proliferation and function (NEWSHOLME, 2001). The results of the present experiment demonstrated a higher elevation in total white blood cell, segmented neutrophils and lymphocytes values in the G-GLN compared to the pretest and G-CON animals, confirming the idea that GLN is important for those cells in also sick dogs. In a study with pigs previously infected with *E. coli*, Yoo et al. (1997), observed that GLN supplementation produced elevation in [leucocytes] and [lymphocytes] after seven days of supplementation (40.0g Gln/Kg of concentrate). Similarly to what was described in the present experiment for G-GLN supplementation on day 7, with an increase in [leucocytes] and [lymphocytes], when compared with the pretest phase, confirming the importance of the Gln supplementation to dogs with enteritis.

In addition, the triglycerides concentration increased in the G-GLN, at the end of supplementation period, which can be explained by the higher amount of this amino acid and stimulating the recovery of the enterocytes, favoring the absorption of nutrients. Recently it was demonstrated that the higher amount of GLN, by oral supplementation promotes higher

absorption of lipids, producing increase in the concentration of triglycerides in the blood of rats (SCHWIMMER et al., 2002). Thus, supplementation with GLN promotes not only protein synthesis for tissue recovery, but also energy for the enterocytes and for the overall metabolism, with the increase in the concentration of triglycerides in the blood of dogs, as observed in G-GLN. Meanwhile in the animals of the present study, no alteration in hepatic function of the experimental groups, with the AST and ALT enzymes within the reference range for the species ranging from 21.0 - 102.0 U/L and 23.0 - 66.0 U/L, respectively (KANEKO, 2008).

Finally, the analysis of erythrocyte parameters showed no significant changes between the groups, as shown as shown by Rodrigues et al., (2007) where they studied supplementation with GLN on biochemical and hematological variables of malnourished rats, not observing change in [red cells], [hemoglobin] and hematocrit. However due to the small number of studies that relate the GLN and GLU supplementation on erythrocyte parameters in dogs, should be analyzed these results with care since the possible effects are still not so deeply studied.

## **Conclusions**

Supplementation with a mixture of GLN + GLU was able to produce significant increases in the concentration of Glutamine and Glutamate and have moved towards the recovery of the animals when observing the other parameters analyzed in animals with enteritis. Also the largest supply of amino acids produced increase in biomarkers related to nutrition of animals with increased protein and its fractions, and cells involved in the immune response. Finally, it should be emphasized that this supplementation caused no increase in biomarkers associated with nephrotoxicity and hepatotoxicity in the sick animals.

## **Acknowledgements**

This study was funded by the National Scientific and Technological Development (CNPq) and wanted to thank Ajinomoto of Brazil (Sao Paulo-SP, Brazil). Also to Professor Malcolm Watford, Rutgers University, for his review and comments to this paper.

## References

- Archibald, M.R., 1944. The enzymatic determination of glutamine. *Journal of Biological Chemistry* 16, 648-656.
- Center, S.A., 2004. Metabolic, antioxidant, nutraceutical, probiotic, and herbal therapies relating to the management of hepatobiliary disorders. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice* 34, 67-172.
- Costa, P.R.S., Conceição, L.G., Lopes, M.A.F., 2009. Nutrição enteral precoce com glutamina em cães com gastroenterite hemorrágica pelo parvovírus canino. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia* 61 (5), 1251-1253.
- Dell'Orto, V., Di Giancamillo, A., Savoini, G., 2002. Influence of nucleotides and glutamine dietary supplementation on gut health of weaning piglets. *Journal of Animal Science* 80, 220.
- Hackett, T.B., 2011. Gastrointestinal Complications of Critical Illness in Small Animals. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice* 41, 759-766.
- Humbert, B., Nguyen, P., Dumon, H., Deschamps, J., Darmaun, D., 2002. Does enteral glutamine modulate whole-body leucine kinetics in hypercatabolic dogs in a fed state? *Metabolism Clinical and Experimental* 51, 628-635.
- Iwashita, S., Williams, P., Jabbour, K., Ueda, T., Kobayashi, H., Baier, S., Flakoll, P. J., 2005. Impact of glutamine supplementation on glucose homeostasis during and after exercise. *Journal of Applied Physiology* 99, 1858-1865.
- Kaneko, J. J., 2008. *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*. 6th Edn. Academic Press, San Diego, USA.
- Lobley, G.E., Hoskin, S.O., Mcneil, C.J., 2001. Glutamine in animal science and production. *Journal of Nutrition* 131, 2552-2531.
- Manso Filho, H.C., Mckeever, K.H., Gordon, M.E., Costa, H.E.C., Lagakos, W.S., Watford, M., 2008. Changes in glutamine metabolism indicate a mild catabolic state in the transition mare. *Journal of animal science* 86, 3424-3431.
- Newsholme, P., 2001. Why is l-glutamine metabolism important to cells of the immune system in health, post-injury, surgery or infection? *The Journal of Nutrition* 131, 2515S-2522S.

- Rodrigues, N.C.L., Nunes, L.A., Horie, L.M., Torrinas, R., Waitzberg, D.L., 2007. Efeito da suplementação de glutamina sobre variáveis hematológicas e do estado nutricional de ratas desnutridas. *Arquivo Brasileiro de Cirurgia Digestiva* 20, 270-273.
- Reeds, P.J., Jahoor, F., 2001. The amino acids requirements of disease. *Clinical Nutrition* 20, 15-22.
- Sasaki, J., Goryo, M., Asahina, M., Makara, M., Shishido, S., Okada, K., 1999. Hemorrhagic enteritis associated with *Clostridium perfringens* type A in a dog. *Journal of Veterinary Medical Science* 61, 175-177.
- Schwimmer, J.B., Looi, E.E., Zheng, S., Tso, P., 2002. Glutamine promotes triglyceride absorption in a dose-dependent manner. *American Journal of Physiology* 282, 317-323.
- Souba, W.W., 1993. Glutamine and cancer. *Annals of Surgery* 218, 715-728.
- Souba, W.W., Herskowitz, K., Austgenn, T.R., Chen, M.K., Salloum, R.M., 1990. Glutamine nutrition: theoretical considerations and therapeutic impact. *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition* 14, 37-42.
- Tessari, P., Garibotto, G. 2000. Interorgan amino acid exchange. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care* 3, 51-57.
- Weiss, D.J., Wardrop, K.J., 2005. *Schalm's Veterinary Hematology*. 6th Edn. Wiley-Blackwell, Iowa, USA.
- Wernerman, J. 2008. Clinical use of glutamine supplementation. *The Journal of Nutrition*, 138: 2040S-2044S.
- Wilmore, D.W., Goodwin, C.W., Aulick, L.H., 1990. Effect of injury and infection on visceral metabolism and circulation. *Annals of Surgery* 192, 491-504.
- Yoo, S.S., Field, C.J., Mcburney, M.I., 1997. Glutamine supplementation maintains intramuscular glutamine concentrations and normalizes lymphocyte function in infected early weaned pigs. *The Journal of Nutrition* 127, 2253-2259.

**Table 1**

The effect of glutamine and glutamate supplementation on blood metabolites and proteins in dogs with hemorrhagic enteritis

Biomarkers	Group				
	Pretest (n=15)	Control (n=5)		Glutamine + Glutamate (n=10)	
		+7days	+14days	+7days	+14days
Glutamine, umol/mL	0.55 ± 0.03 <sup>BC</sup>	0.53 ± 0.05 <sup>BC</sup>	0.60 ± 0.09 <sup>BC</sup>	0.61 ± 0.05 <sup>B</sup>	0.83 ± 0.02 <sup>A</sup>
Glutamate, umol/mL	0.10 ± 0.01 <sup>ABC</sup>	0.13 ± 0.01 <sup>AB</sup>	0.16 ± 0.01 <sup>A</sup>	0.10 ± 0.01 <sup>ABC</sup>	0.07 ± 0.01 <sup>C</sup>
Total plasma protein, g/dL	5.07 ± 0.32 <sup>CD</sup>	4.57 ± 0.78 <sup>CD</sup>	5.10 ± 0.74 <sup>ABC</sup>	7.09 ± 0.45 <sup>AB</sup>	7.45 ± 0.63 <sup>A</sup>
Albumin, g/dL	1.58 ± 0.09 <sup>ABC</sup>	1.45 ± 0.27 <sup>ABCD</sup>	1.30 ± 0.17 <sup>CD</sup>	2.06 ± 0.14 <sup>AB</sup>	2.09 ± 0.15 <sup>A</sup>
Globulin, g/dL	3.47 ± 0.26 <sup>CD</sup>	3.11 ± 0.64 <sup>CD</sup>	3.80 ± 0.57 <sup>ABC</sup>	5.03 ± 0.32 <sup>AB</sup>	5.36 ± 0.48 <sup>A</sup>
Urea, mg/dL	18.71 ± 1.34 <sup>BDC</sup>	26.84 ± 6.25 <sup>AB</sup>	26.48 ± 12.89 <sup>ABC</sup>	38.23 ± 5.45 <sup>A</sup>	25.57 ± 4.24 <sup>ABCD</sup>
Creatinine, mg/dL	0.68 ± 0.06	0.68 ± 0.11	0.69 ± 0.11	0.87 ± 0.12	0.81 ± 0.08
ALT, UI/L	30.13 ± 6.50	32.30 ± 5.41	19.29 ± 2.74	23.57 ± 2.40	22.52 ± 2.72
AST, UI/L	35.38 ± 8.93	63.51 ± 21.24	28.60 ± 3.13	21.33 ± 3.87	17.27 ± 3.05
Total Cholesterol, mmol/L	175.75 ± 12.26	148.98 ± 11.18	171.58 ± 23.83	187.18 ± 13.03	208.28 ± 20.77
Triglyceride, mg/dL	80.11 ± 12.54 <sup>ABC</sup>	38.78 ± 4.39 <sup>CD</sup>	25.72 ± 6.73 <sup>BCD</sup>	108.14 ± 23.22 <sup>AB</sup>	127.01 ± 21.10 <sup>A</sup>

**Note:** Different letters in the same line indicate statistically significant differences by Tukey test ( $P < 0.05$ ); ALT - Alanine aminotransferase; AST - Aspartate aminotransferase.

**Table 2**

Effect of glutamine and glutamate supplementation on blood cell numbers in dogs with hemorrhagic enteritis

Hemogram	Group				
	Pretest (n=15)	Control (n=5)		Glutamine + Glutamate (n=10)	
		+7days	+14days	+7days	+14days
Red Cells, $\times 10^6/\mu\text{L}$	5.44 $\pm$ 0.21	5.04 $\pm$ 0.45	5.90 $\pm$ 0.31	5.85 $\pm$ 0.34	5.95 $\pm$ 0.22
Hemoglobin, g/dL	11.92 $\pm$ 0.48	11.10 $\pm$ 1.05	12.82 $\pm$ 0.70	12.63 $\pm$ 0.75	12.88 $\pm$ 0.52
Hematocrit, %	35.80 $\pm$ 1.41	33.20 $\pm$ 2.95	38.60 $\pm$ 2.08	38.00 $\pm$ 2.25	38.66 $\pm$ 1.58
MCV, fL	66.98 $\pm$ 0.68	66.12 $\pm$ 1.07	65.40 $\pm$ 0.14	65.50 $\pm$ 0.11	65.00 $\pm$ 0.29
MCHC, g/dL	31.25 $\pm$ 2.01	33.34 $\pm$ 0.19	33.24 $\pm$ 0.02	33.19 $\pm$ 0.02	33.28 $\pm$ 0.03
Total leukocytes, $\times 10^3/\mu\text{L}$	8.00 $\pm$ 0.58 <sup>C</sup>	10.92 $\pm$ 2.13 <sup>ABC</sup>	9.90 $\pm$ 1.38 <sup>ABC</sup>	13.78 $\pm$ 1.04 <sup>A</sup>	12.51 $\pm$ 0.79 <sup>AB</sup>
Rods, %	6.00 $\pm$ 1.14	5.40 $\pm$ 2.54	1.80 $\pm$ 0.58	3.30 $\pm$ 1.30	4.16 $\pm$ 1.75
Rods, $\times 10^3/\mu\text{L}$	0.45 $\pm$ 0.08	0.76 $\pm$ 0.52	0.19 $\pm$ 0.08	0.49 $\pm$ 0.20	0.46 $\pm$ 0.16
Segmented, %	76.20 $\pm$ 3.12	74.40 $\pm$ 3.58	77.80 $\pm$ 1.96	73.00 $\pm$ 2.78	69.00 $\pm$ 4.42
Segmented, $\times 10^3/\mu\text{L}$	6.12 $\pm$ 0.62 <sup>B</sup>	8.01 $\pm$ 1.36 <sup>AB</sup>	7.63 $\pm$ 1.00 <sup>AB</sup>	10.04 $\pm$ 0.99 <sup>A</sup>	8.60 $\pm$ 0.73 <sup>AB</sup>
Eosinophils, %	1.26 $\pm$ 0.34	3.00 $\pm$ 1.37	1.80 $\pm$ 1.56	1.90 $\pm$ 0.50	4.33 $\pm$ 2.24
Eosinophils, $\times 10^3/\mu\text{L}$	0.11 $\pm$ 0.03	0.26 $\pm$ 0.11	0.10 $\pm$ 0.08	0.30 $\pm$ 0.09	0.55 $\pm$ 0.30
Lymphocytes, %	13.60 $\pm$ 2.25	16.60 $\pm$ 3.07	17.20 $\pm$ 2.57	20.00 $\pm$ 2.87	23.80 $\pm$ 2.80
Lymphocytes, $\times 10^3/\mu\text{L}$	1.04 $\pm$ 0.19 <sup>B</sup>	1.82 $\pm$ 0.50 <sup>AB</sup>	1.82 $\pm$ 0.40 <sup>AB</sup>	2.65 $\pm$ 0.38 <sup>AB</sup>	3.16 $\pm$ 0.43 <sup>A</sup>
Monocytes, %	1.66 $\pm$ 0.36	1.00 $\pm$ 0.01	1.40 $\pm$ 1.16	1.80 $\pm$ 0.57	1.66 $\pm$ 0.55
Monocytes, $\times 10^3/\mu\text{L}$	0.13 $\pm$ 0.03	0.40 $\pm$ 0.03	0.15 $\pm$ 0.12	0.24 $\pm$ 0.07	0.24 $\pm$ 0.07
Platelet, $\times 10^3/\mu\text{L}$	257.32 $\pm$ 21.54	235.02 $\pm$ 26.00	155.66 $\pm$ 33.02	291.39 $\pm$ 17.11	299.22 $\pm$ 20.76

**Note:** Different letters in the same line indicate statistically significant differences by Tukey test ( $P < 0.05$ ).



## **6. CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Com a suplementação com GLN+GLU, foi possível observar uma elevação significativa na concentração da Glutamina sanguínea, o que pode favorecer a recuperação dos animais, quando observados os demais parâmetros analisados nos animais com enterites. Assim como também foi possível produzir elevação nos biomarcadores associados à nutrição dos animais, com aumento das proteínas e suas frações, e nas células envolvidas na resposta imune, o que pode estar relacionado ao maior aporte de aminoácidos, não causando elevação nos biomarcadores associados à nefrotoxicidade e hepatotoxicidade nos animais enfermos.