

IARA ELIZA PACÍFICO QUIRINO

**AÇÃO DO PRÉ-CONDICIONAMENTO COM
ARGININA E DO ÓXIDO NÍTRICO VIA ÓXIDO
NÍTRICO SINTASE INDUZIDA SOBRE
TRANSLOCAÇÃO BACTERIANA,
PERMEABILIDADE INTESTINAL E SÍNTESE DE
CITOCINAS EM MODELO DE OBSTRUÇÃO
INTESTINAL**

Faculdade de Farmácia da UFMG
Belo Horizonte, MG
2012

IARA ELIZA PACÍFICO QUIRINO

**AÇÃO DO PRÉ-CONDICIONAMENTO COM
ARGININA E DO ÓXIDO NÍTRICO VIA ÓXIDO
NÍTRICO SINTASE INDUZIDA SOBRE
TRANSLOCAÇÃO BACTERIANA,
PERMEABILIDADE INTESTINAL E SÍNTESE DE
CITOCINAS EM MODELO DE OBSTRUÇÃO
INTESTINAL**

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial à obtenção do grau de Doutor em Ciência dos Alimentos.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria Isabel Toulson
Davisson Correia

Co-Orientador: Prof. Dr. Valbert Nascimento Cardoso

Faculdade de Farmácia da UFMG
Belo Horizonte, MG
2012

Iara Eliza Pacífico Quirino
(Aluna)

Prof^a. Dr^a. Maria Isabel Toulson Davisson Correia
(Orientadora)

Prof. Dr. Valbert Nascimento Cardoso
(Co-orientador)

Linha de Pesquisa do PPGCA
NAS – Nutrição, Alimentação e Saúde

Área de Conhecimento (CNPq/CAPES)
5.07.00.00-6 - CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

Dedico este trabalho a mim mesma, grande merecedora dessa vitória, à minha família e ao Moisés.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por sempre me atender, fortalecer e iluminar nos momentos de insegurança e desânimo;

Ao Moisés, pelo eterno e constante apoio.

Aos meus pais, Júlio e Nívea e irmãos Daniel e Marina pelos ensinamentos e consciência de que o estudo pode nos levar longe, muito longe...

À prof. Maria Isabel Toulson Davisson Correia, orientadora da Faculdade de Medicina /UFMG, pela aposta neste trabalho, valiosas sugestões, trocas de idéias e excelentes oportunidades proporcionadas.

Ao prof. Valbert Nascimento Cardoso, co-orientador da FAFAR / UFMG, por fornecer as condições necessárias para a realização deste trabalho.

Ao aluno Matheus Batista Heitor Carneiro do Laboratório de Gnotobiologia e Imunologia do ICB/UFMG, pela preciosa ajuda nos ensaios da arginase. Pesquisador nato e brilhante.

À prof. Leda Quércia Vieira do Laboratório de Gnotobiologia e Imunologia do ICB/UFMG, por disponibilizar o seu laboratório e os seus equipamentos.

Ao aluno Warley Pinheiro e à prof. Maria Beatriz de Abreu Glória, ambos do Laboratório de Bioquímica de Alimentos da FAFAR/UFMG, pelo grande apoio nas análises de poliaminas.

À prof. Rosa Maria Esteves Arantes do Departamento de Patologia Geral ICB/UFMG, pela grande colaboração nos estudos histológicos.

À prof. Jacqueline Isaura Alvarez Leite do Laboratório de Aterosclerose e Bioquímica Nutricional do ICB/ UFMG e à técnica Maria Helena, pela imensa ajuda com a criação dos animais iNOS-/-.

À aluna e amiga Jacqueline Fiúza do Centro de Pesquisas Renè Rachou pela doação de animais C57BL6/J.

Ao profs. Tasso Moraes e Santos por disponibilizar, gentilmente, materiais e equipamentos de seus laboratórios necessários no preparo da ração.

Ao Coordenador do Programa de Pós Graduação em Ciência de Alimentos, Prof. Dr. Roberto Junqueira pela ajuda com a estatística, disponibilidade e compreensão como coordenador do curso.

Aos funcionários do biotério da FAFAR / UFMG, Sra. Adelaide e Sr. Batista, pela atenção, ajuda com os animais e bom humor.

Aos colegas do Laboratório de Radioisótopo, especialmente à Luciene, Talita e André pelos agradáveis momentos e cooperação valiosa.

Às secretárias do Programa de Pós Graduação em Ciência de Alimentos Sra, Úrsula e Sra. Marilene pelo apoio com os assuntos burocráticos.

E finalmente, às minhas queridas amigas que este doutorado me proporcionou: Mirelle Viana, Rosana Santos e Simone Generoso. A ajuda e o incentivo foram muito além da pesquisa.

*“A mente que se abre a uma nova idéia
jamais voltará ao seu tamanho original.”*

Albert Einstein

SUMÁRIO

	LISTA DE FIGURAS	14
	LISTA DE TABELAS	15
	LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	16
	RESUMO	18
	ABSTRACT	20
1	INTRODUÇÃO	22
2	OBJETIVOS	25
	Objetivos gerais	26
	Objetivos específicos	26
3	REVISÃO DA LITERATURA	27
3.1	Arginina	28
3.1.1	Considerações gerais	28
3.1.2	Absorção	28
3.1.3	Metabolismo	29
3.1.3.1	Síntese	29
3.1.3.2	Catabolismo	30
3.1.4	Propriedades fisiológicas e funcionais	32
3.2	Óxido Nítrico	36
3.2.1	Considerações Gerais	36

3.2.2	Síntese	36
3.2.3	Funções	39
3.2.4	Óxido nítrico e inflamação / septicemia	40
3.3	Poliaminas	44
3.3.1	Considerações gerais	44
3.3.2	Metabolismo	45
3.3.2.1	Síntese	45
3.3.2.2	Absorção e sistemas de transporte	45
3.3.2.3	Catabolismo	46
3.3.3	Propriedades funcionais e efeitos biológicos	47
3.4	Translocação bacteriana	49
3.4.1	Considerações gerais	49
3.4.2	Etiologia	51
3.4.2.1	Alteração da microflora gastrintestinal	52
3.4.2.2	Alteração da barreira intestinal	52
3.4.2.3	Deficiência do sistema imunológico	54
3.4.2.4	Outros fatores envolvidos na translocação bacteriana	55
3.4.3	Mecanismos e Patogênese	56
3.4.4	Prevenção e Terapia	56

3.5	Obstrução Intestinal	57
3.5.1	Considerações Gerais	57
3.5.2	Fisiopatologia	58
3.6	Isótopo Radioativo	59

CAPÍTULO I- O PAPEL DA ARGININA E DA ÓXIDO NÍTRICO-SINTASE SOBRE A PERMEABILIDADE INTESTINAL E TRANSLOCAÇÃO BACTERIANA EM MODELO EXPERIMENTAL DE OBSTRUÇÃO INTESTINAL

	RESUMO	61
	ABSTRACT	62
1	INTRODUÇÃO	63
2	MATERIAL E MÉTODOS	64
2.1	Animais	64
2.2	Protocolo experimental	65
2.3	Preparo da dieta suplementada	65
2.4	Procedimento cirúrgico e indução da obstrução intestinal	66
2.5	Permeabilidade intestinal	67
2.6	Translocação bacteriana	68
2.7	Análises histológica e morfométrica	69
2.8	Determinação de poliaminas no fluido intestinal	69
2.9	Análises estatísticas	69

3	RESULTADOS	71
3.1	Ganho de peso, ingestão calórica e protéica	71
3.2	Permeabilidade intestinal	71
3.3	Análises histológica e morfométrica	72
3.4	Concentração de poliaminas no fluido intestinal	74
3.5	Translocação Bacteriana	75
4	DISCUSSÃO	76

CAPÍTULO II – SUPLEMENTAÇÃO DE ARGININA MODULA A SÍNTESE DE CITOCINAS E A ATIVIDADE DA ARGINASE EM MACRÓFAGOS ESPLÊNICOS DE ANIMAIS SUBMETIDOS À OBSTRUÇÃO INTESTINAL – PAPEL DA ÓXIDO NÍTRICO SINTASE INDUZIDA

	RESUMO	80
	ABSTRACT	81
1	INTRODUÇÃO	82
2	MATERIAL E MÉTODOS	83
2.1	Animais	83
2.2	Protocolo experimental	83
2.3	Preparo da dieta suplementada	84
2.4	Cultivo e preparo da <i>E.coli</i>	86
2.5	Procedimento cirúrgico e indução da obstrução intestinal	86

2.6	Isolamento de macrófagos do baço	87
2.7	Cultura de células	87
2.8	Determinação da concentração de citocinas	87
2.9	Avaliação da atividade da arginase	87
2.10	Análises estatísticas	88
3	RESULTADOS	89
3.1	Atividade da arginase	89
3.2	Concentração de citocinas	89
4	DISCUSSÃO	91
4	CONCLUSÕES INTEGRADAS	94
5	PERSPECTIVAS FUTURAS	97
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	98
7	ANEXO - Aprovação pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da UFMG	117

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Síntese e ações do ON e poliaminas no local da inflamação	24
Figura 2	Estrutura química da arginina e do grupo guanidino	28
Figura 3	Síntese de arginina	30
Figura 4	Metabolismo da arginina	31
Figura 5	Síntese de óxido nítrico a partir da arginina	37
Figura 6	Estrutura básica das NOSs	37
Figura 7	Metabolismo das poliaminas	47
Figura 8	Translocação bacteriana e falência múltipla de órgãos	51
Figura 9	Mecanismos e componentes envolvidos no processo de translocação bacteriana	52
Figura 10	Fisiopatologia da obstrução intestinal. Alterações locais	59
Figura 11	Esquema de delineamento experimental (Capítulo I)	65
Figura 12	Resumo da metodologia experimental (Capítulo I)	
Figura 13	Comportamento dos animais em relação à permeabilidade intestinal 4, 8 e 18 horas após a indução da obstrução intestinal	71
Figura 14	Aspectos histopatológicos da parede da porção final do intestino delgado (íleo terminal) de animais WT e iNOS -/-.	72
Figura 15	Concentração de espermidina no fluido intestinal	73
Figura 16	Concentração de espermidina no fluido intestinal	75
Figura 17	Resumo da metodologia experimental (Capítulo II)	85
Figura 18	Esquema de delineamento experimental (Capítulo II)	88
Figura 19	Atividade da arginase	89
Figura 20	Concentração de TNF- α em cultura de macrófagos do baço	90
Figura 21	Concentração de IL-10 em cultura de macrófagos do baço	90
Figura 22	Relação TNF- α / IL-10 em cultura de macrófagos do baço	91

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Ganho de peso, ingestão calórica e proteica	70
Tabela 2	Porcentagem da área edemaciada	72
Tabela 3	Biodistribuição da ^{99m}Tc - <i>E.coli</i> (cpm/g)	74

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATP	- Adenosina trifosfato
BH4	- Tetra hidrobiopterina
CAT	- Transportador de aminoácidos catiônicos
CD3	- Grupo 3 de diferenciação
CD8	- Grupo 8 de diferenciação
cGMP	- Guanosina monifosfato cíclica
DAO	- Diamino-oxidases
DNA	- Ácido desoxirribonucléico
DTPA	- Ácido dietilenotriamino pentacético
<i>E.coli</i>	- <i>Escherichia coli</i>
eNOS	- Óxido nítrico sintase endotelial
FAD	- Flavina adenina dinucleotídeo
FAE	- Epitélio folicular
FMN	- Flavina mononucleotídica
GALT	- Tecido linfóide associado à mucosa gastrintestinal
HPLC	- Cromatografia líquida de alta eficiência
ICAM-1	- Molécula 1 de adesão intercelular
Ig A	- Imunoglobulina A
Ig M	- Imunoglobulina M
IL-1	- Interleucina-1
IL-2	- Interleucina-2
IL-4	- Interleucina-4
IL-5	- Interleucina-5
IL-6	- Interleucina-6
IL-10	- Interleucina-10
IL-13	- Interleucina-13
IFN- γ	- Interferon- γ
iNOS	- Óxido nítrico sintase indutiva
KO	- <i>Knockout</i>
L-NAME	- N ^{ω} -nitro-L-arginina metil ester
L-NNA	- N ^{ω} -nitro-L-arginina
L-NIL	- N-iminoetil-L- lisina

LPS	- Lipopolissacarídeo
MHC-I	- Complexo principal de histocompatibilidade classe-I
MHC-II	- Complexo principal de histocompatibilidade classe-II
NADPH	- Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NK	- <i>Natural Killer</i>
NLM	- Nódulo linfático mesentérico
nNOS	- Óxido nítrico sintase neuronal
NOS	- Óxido nítrico sintase
ODC	- Ornitina descarboxilase
OI	- Obstrução intestinal
ON	- Óxido nítrico
PAO	- Poliamino-oxidase
RNA	- Ácido ribonucléico
SAM	- s- adenosilmetionina
SAMDC	- s-adenosilmetionina descarboxilase
SAMHC	- s-adenosil-s - metil homocisteamino
slg A	- Imunoglobulina A secretória
TCR	- Receptor de células T
TGI	- Trato gastrointestinal
TH1	- Relativo à resposta inflamatória mediada por linfócitos T auxiliares do tipo 1
TH2	- Relativo à resposta inflamatória mediada por linfócitos T auxiliares do tipo 2
TNF- α	- Fator de necrose tumoral – α
TNF- β	- Fator de necrose tumoral – β
VCAM-1	- Molécula 1 de adesão da célula vascular
WT	- <i>Wild-type</i>
ω -3	- Ácido graxo ômega-3
^{99m}Tc	- ^{99m}Tc Tecnécio
^{99m}Tc - <i>E.coli</i>	- <i>Escherichia coli</i> marcada com tecnécio

RESUMO

A arginina apresenta efeitos intestinais tróficos em condições de estresse como trauma, isquemia ou ressecção intestinal e ainda possui importante papel imunológico especialmente para a proliferação de linfócitos T e para a imunomodulação. Estudos experimentais demonstraram que a suplementação com arginina em situações de trauma, septicemia e estresse apresentou efeitos positivos sobre a mucosa intestinal, diminuindo a translocação bacteriana. Os metabólitos óxido nítrico (ON) e poliaminas estão envolvidos nestas atividades da arginina. Assim, o objetivo deste trabalho foi determinar os efeitos da arginina e da óxido nítrico sintase induzida (iNOS) sobre a permeabilidade intestinal, translocação bacteriana, atividade da arginase e síntese de citocinas TNF- α e IL-10 em camundongos. Animais machos C57BL6/J *wild-type* (WT) e iNOS *knockout* (iNOS $^{-/-}$) foram separados aleatoriamente em seis grupos. Grupos Sham e Sham $^{-/-}$ (ração comum e ausência de obstrução intestinal), OI e OI $^{-/-}$ (ração convencional + OI), Arg e Arg $^{-/-}$ (ração suplementada com arginina + OI). Decorridos sete dias após o início do experimento, os animais receberam por gavagem *E.coli* ou ácido dietilenotriamino pentacético (DTPA) marcado com 99m -Tecnécio e, posteriormente, foram submetidos à OI por meio de ligadura simples na região do íleo terminal. Após 18 horas, os animais foram eutanasiados e linfonodos mesentéricos, fígado, baço, pulmões e sangue foram coletados para determinação da radioatividade. Para análises histopatológicas e morfométricas, avaliação da permeabilidade e conteúdo de poliaminas intestinal, porções do intestino delgado e o fluido intestinal foram recolhidos. A atividade da arginase e concentração de citocinas TNF- α e IL-10 foram analisadas em experimentos distintos. Após 18 horas da indução da OI, os animais foram eutanasiados e o baço foi retirado. Macrófagos esplênicos foram isolados e mantidos em cultura para proliferação. Após 7 dias, o sobrenadante da cultura foi recolhido para dosagem de citocinas TNF- α e IL-10 e as células foram utilizadas para avaliação da arginase. O pré-tratamento com arginina manteve a permeabilidade intestinal ($p > 0,05$; grupos Arg e Arg $^{-/-}$ versus grupos Sham e Sham $^{-/-}$), elevou a concentração de poliaminas no fluido intestinal ($p < 0,05$; grupo Arg versus grupo OI) e reduziu a translocação bacteriana em animais WT (grupo Arg versus OI). A ausência da iNOS também esteve associada a papel protetor em relação à permeabilidade intestinal, o que não foi observado em relação à translocação bacteriana. A suplementação de arginina e a ausência da iNOS elevaram a atividade

da arginase em macrófagos esplênicos (grupos Arg, OI-/- e Arg-/- *versus* grupo Sham ; $p < 0,05$). A arginina esteve associada à diminuição da concentração de TNF (grupo Arg *versus* OI; $p < 0,05$) e manutenção da concentração de IL-10 (grupo Arg *versus* demais; $p > 0,05$). A inibição da iNOS não resultou em efeitos sobre a concentração de citocinas (grupos Sham-/-, OI-/- e Arg-/- *versus* demais; $p > 0,05$). Estes resultados mostram que a suplementação de arginina e a síntese de ON pela iNOS são importantes fatores em reduzir a translocação bacteriana. Contudo quando a permeabilidade intestinal é considerada, ON possui efeito danoso. A ação imunomoduladora da arginina foi evidenciada pela redução da concentração de TNF- α . É possível que este efeito esteja associado à síntese de ON.

Palavras chaves: Arginina, óxido nítrico sintase induzida, arginase, translocação bacteriana, permeabilidade intestinal, obstrução intestinal.

ABSTRACT

Arginine has been shown to have several trophic properties under stressful situations such as trauma, ischemia and intestinal resection. Arginine also presents an immunological effect, especially on lymphocyte proliferation. Recent experimental studies have shown that arginine reduces bacterial translocation in trauma and septic animal models whose diets were supplemented with it. Its metabolites nitric oxide (NO) and polyamines are related. Thus, the objectives of this work were to evaluate the effects of arginine and nitric oxide synthase (iNOS) on intestinal permeability, bacterial translocation, arginase activity and cytokine levels in animals fed an arginine-supplemented diet and submitted to intestinal obstruction induced by a simple knot. The animals were randomly divided into 6 groups: the Sham and Sham-/- groups (1, 2), which included C57BL6/J WT or C57BL6/J iNOS-/- mice fed standard chow and without IO; the IO and IO-/- groups (3, 4), which included C57BL6/J WT or C57BL6/J iNOS-/- mice fed standard chow and given an IO; and the Arg and Arg-/- groups (5, 6), which included C57BL6/J WT or C57BL6/J iNOS-/- mice fed arginine-supplemented chow and given an IO. The animals were fed these diets for 7 days prior to intestinal injury. After seven days, all mice received *E.coli* or diethylene triamine pentaacetic acid (DTPA) radiolabeled with ^{99m}Tc . Intestinal obstruction was induced by a simple knot. After 18 hours, the animals were euthanized, and the blood, mesenteric lymph nodes, liver, spleen, and lungs were removed for radioactivity detection. Samples of the small bowel and its content were taken for histological and morphometric analysis, evaluation of intestinal permeability and intestinal polyamines. Arginase activity and cytokine levels were evaluated in distinct experiments. After 18 hours of IO, spleen was harvested. Macrophages were isolated and kept in culture to proliferation. After 7 days, supernatant was collected for evaluation of TNF- α and IL-10. Macrophages were used for arginase assay. Pre-treatment with arginine maintained intestinal permeability ($p > 0.05$; Arg and Arg-/- groups versus Sham and Sham-/- groups), increased polyamine concentration in intestinal content ($p < 0.05$; Arg versus IO group) and decreased bacterial translocation in WT animals (Arg group versus IO group). Absence of iNOS also presented a protective effect on permeability, but not on bacterial translocation. Arginine supplementation and the absence of iNOS increased arginase activity in splenic macrophage (Arg, IO-/- and Arg-/- groups versus Sham group; $p < 0.05$). Arginine also was related to decrease of TNF- α and maintenance of IL-10 levels (Arg groups

versus others; $p > 0,05$). Inhibition of iNOS did not affect cytokines levels (Sham-/-; OI-/- and Arg-/- groups versus others; $p > 0,05$). These results show that arginine supplementation and the synthesis of NO by iNOS were able to decrease bacterial translocation. Therefore, NO had a deleterious effect on intestinal permeability. Immune modulator role of arginine was seen through reduction of TNF- α levels. It is possible that this propriety was linked to NO synthesis by iNOS.

Key words: Arginine, inducible nitric oxide, arginase, bacterial translocation, intestinal permeability, intestinal obstruction.

1. INTRODUÇÃO

A translocação bacteriana tem sido um dos focos de estudo em nosso laboratório de Radioisótopos da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais. Modelos experimentais de icterícia obstrutiva e de obstrução intestinal já foram utilizados para avaliação de tal evento (DINIZ et al., 2005; OLIVEIRA et al.; 2006; QUIRINO et al.; 2007). Recente trabalho avaliou a translocação bacteriana em modelo de obstrução intestinal em ratos, associada à suplementação de arginina (QUIRINO et al.; 2007). A administração deste aminoácido (300mg/dia e 600mg/dia) reduziu a translocação da *Escherichia coli* para nódulos linfáticos mesentéricos, sangue, fígado, baço e pulmões. Arginina é um aminoácido com propriedades imunomoduladoras, se tornando essencial durante situações de estresse, especialmente após trauma. Alguns estudos demonstraram que a suplementação de arginina pode reduzir a translocação bacteriana em condições inflamatórias (GURBUZ et al.; 1998; ERSIN et al.; 2000). Entretanto, ainda são obscuros os mecanismos pelos quais a arginina é capaz de reduzir a translocação bacteriana. Desse modo, este trabalho tem como foco avaliar o perfil imunológico e os efeitos do óxido nítrico e das poliaminas, metabólitos da arginina, nesse processo. A hipótese de estudo proposta é avaliar se arginina, via óxido nítrico (ON) ou via poliaminas, atua diretamente no processo da translocação bacteriana. O ON sintetizado pela eNOS em condições fisiológicas é responsável pela manutenção do fluxo sanguíneo mesentérico, mantendo a integridade das barreiras mucosa e microvascular, prevenindo desse modo o aumento da permeabilidade intestinal (CHEN et al., 1998). A síntese via iNOS, induzida por citocina TH1, é o mecanismo primário pelo qual macrófagos eliminam microrganismos intra e extracelulares. Entretanto, a síntese contínua de ON por esta via leva a hipotensão, muitas vezes resistente a agentes vasoconstritores. O ON também pode ter ação citotóxica, agravando lesões tissulares. Diversos estudos têm avaliado o papel do ON em condições de estresse, embora os resultados sejam contraditórios (DAHM et al.; 1998; HUA et al.; 2000; SUNDRANI et al; 2000; SIMSEK et al.; 2001; SASAKI et al.; 2003; HARDY et al.; 2006). Alguns autores apontam ON como molécula inerente e necessária ao processo inflamatório, protetora contra vasoconstrição e alterações orgânicas decorrentes de choque hemorrágico, de lesão isquemia/reperfusão e septicemia (DAHM et al.; 1998; SUNDRANI et al; 2000; SASAKI et al.; 2003; HARDY et al.; 2006). Outros trabalhos já mostram que o ON pode ser responsável por lesões tissulares, agravando ainda mais aquelas provocadas pela inflamação (HUA et al.; 2000; SIMSEK et al.; 2001).

Outros produtos do metabolismo da arginina são as poliaminas produzidas via arginase. Citocinas TH2 estão envolvidas com ativação da arginase. Poliaminas como putrescina, espermidina e espermina estão envolvidas na diferenciação das células imunológicas e na regulação da reação inflamatória. Além desta ação imunomoduladora, verificou-se que estas amins apresentam efeitos tróficos sobre as vilosidades da mucosa intestinal, podendo evitar ou reduzir o aumento da permeabilidade intestinal (FLYNN et al; 2002; MOINARD et al.; 2005). A relação entre inflamação, arginina e seus metabólitos, no contexto da obstrução intestinal, está representada na Figura 1.

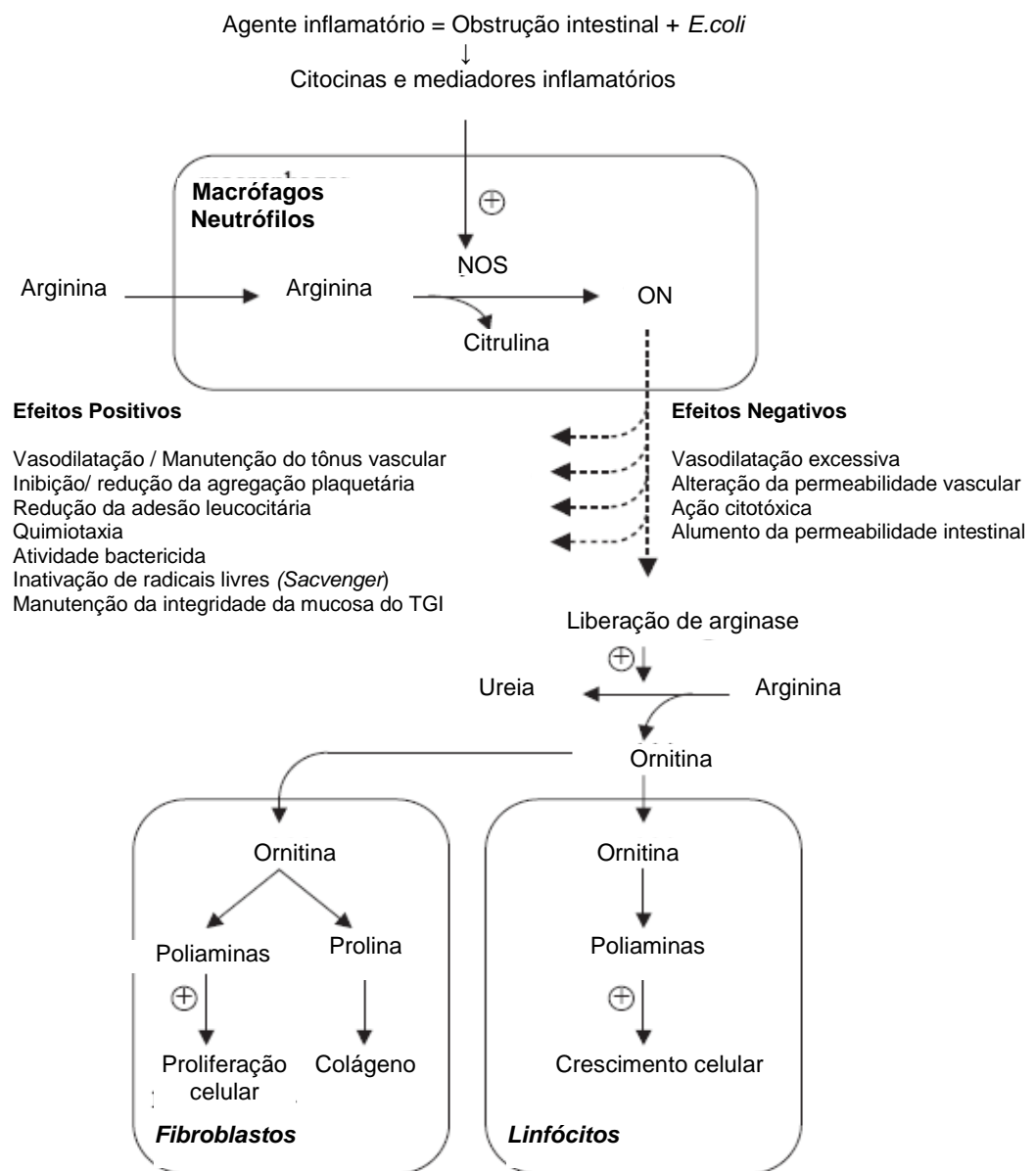


Figura 1: Síntese e ações do ON e poliaminas no local da inflamação (MOINARD et al.; 2005).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

O objetivo deste estudo foi avaliar os mecanismos de ação da arginina sobre a translocação bacteriana e a permeabilidade intestinal, enfatizando o estudo dos seus metabólitos: ON e poliaminas.

2.2. Objetivos Específicos

Para atingir o objetivo proposto anteriormente, destacam-se os seguintes objetivos específicos:

- Avaliar a permeabilidade intestinal, os aspectos histológicos, morfométricos e a translocação bacteriana em animais *wild-type* (WT) e iNOS^{-/-} após processo de obstrução intestinal e tratamento com arginina;
- Avaliar a concentração de poliaminas no fluido intestinal de animais *wild-type* (WT) e iNOS^{-/-} após processo de obstrução intestinal e tratamento com arginina;
- Avaliar a atividade da arginase em cultura de macrófagos do baço de animais *wild-type* (WT) e iNOS^{-/-} após processo de obstrução intestinal e tratamento com arginina;
- Determinar a produção da citocina TH1, TNF- α , em cultura de macrófagos do baço de animais *wild-type* (WT) e iNOS^{-/-} após processo de obstrução intestinal e tratamento com arginina;
- Determinar a produção da citocina TH2, IL-10, em cultura de macrófagos do baço de animais *wild-type* (WT) e iNOS^{-/-} após processo de obstrução intestinal e tratamento com arginina.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1. Arginina

3.1.1. Considerações gerais

A arginina (Figura 2) é um aminoácido básico, não-essencial, proveniente de fontes exógenas (dieta) ou endógenas. A arginina é amplamente distribuída na proteína dietética e o consumo no ocidente varia de 3 a 5g/dia. Melancia, peixes, carnes e nozes são considerados boas fontes de arginina. Durante fases de desenvolvimento e estados catabólicos, a arginina é considerada nutriente condicionalmente essencial. Nessas condições, a síntese *in vivo* é insuficiente para suprir as demandas do organismo (EVANS et al., 2004; HARDY et al.; 2006; POPOVIC et al.; 2007; WU et al.; 2009).

A arginina é substrato para síntese de proteínas, aminoácidos, óxido nítrico, ornitina, prolina, poliaminas, glutamato, creatina e agmatina. Muitas dessas moléculas são importantes para sinalização celular e funcionamento de canais iônicos. A arginina funciona também como intermediária do ciclo da ureia. Esse aminoácido é estável em solução aquosa e não é destruído pela esterilização (ZALOGA et al., 2004).

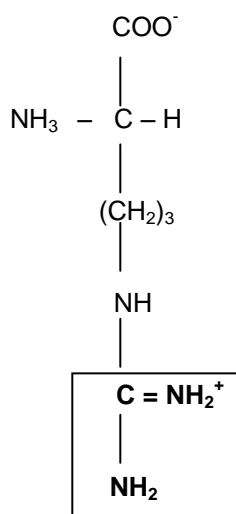


Figura 2: Estrutura química da arginina e grupo guanidino (CYNOBER et al., 1995).

3.1.2. Absorção

A arginina é absorvida principalmente no jejuno e no íleo, sendo pequena a absorção no cólon. A absorção é estimulada pela presença de alguns aminoácidos dipolares como leucina, lisina, ornitina e cisteína (CYNOBER et al., 1995; ZALOGA et al., 2004).

A absorção intestinal da arginina na porção da borda em escova da membrana do enterócito envolve os sistemas B^{0+} e b^{0+} , específicos para aminoácidos bipolares e básicos. O sistema B^{0+} é um co-transportador que acopla o influxo do aminoácido ao influxo de sódio eletronegativamente, ao contrário do sistema b^{0+} , não dependente de sódio (AIRES, 1999; WU et al; 2009).

Na porção basolateral da membrana, a arginina é transportada pelo sistema Y^+ , formado por família de transportadores de aminoácidos catiônicos (CAT). Estes transportadores, independentes de sódio, realizam difusão facilitada que depende do potencial de membrana (CYNOBER et al., 1995; AIRES, 1999; WU et al.; 2009). Atualmente, estão identificados três tipos de CAT: CAT-1, CAT-2B e CAT-3. Um quarto carreador, CAT-2A, possui a mesma atividade transportadora sódio-independente, mas possui afinidade cerca de 10 vezes menor pela arginina. A distribuição dos CATs varia de acordo com o tipo de tecido. Enquanto CAT-1 é expresso amplamente no organismo, CAT-2A e CAT-2B apresentam-se em tecidos específicos. CAT-2-A está presente no fígado, músculo esquelético, pele, ovário e estômago. CAT-2B é encontrado nos pulmões, cérebro, macrófagos ativados, baço, ovário e músculo esquelético. CAT-3 é exclusivo do cérebro (HALLEMEESCH et al., 2002).

3.1.3. Metabolismo

3.1.3.1. Síntese

A síntese de arginina (Figura 3) ocorre por meio do metabolismo proteico e do *turnover* no intestino e nos rins, no denominado ciclo renal-intestinal. A citrulina, produzida nas mitocôndrias dos enterócitos a partir de aminoácidos dietéticos (prolina, glutamina, glutamato) e de glutamina circulante, é precursora direta da arginina. O intestino é o principal local de síntese de citrulina, uma vez que apresenta enzimas reguladoras para a síntese deste aminoácido: pirrolina-5-carboxilato (P5C), prolina oxidase e N-acetilglutamato sintase. Outra fonte de citrulina para síntese de arginina é a glutamina plasmática. A citrulina sintetizada é transportada para os rins, mais especificamente, para os túbulos renais proximais, onde é convertida em arginina pela argininosuccinato sintase e argininosuccinato liase (MORI & GOTOH, 2004; PERANZONI et al.; 2007; WU et al.; 2009).

Além das células renais, adipócitos, células endoteliais, enterócitos, macrófagos, neurônios e miócitos são capazes de converter citrulina em arginina, via argininosuccinato sintase e liase (WU et al.; 2009)

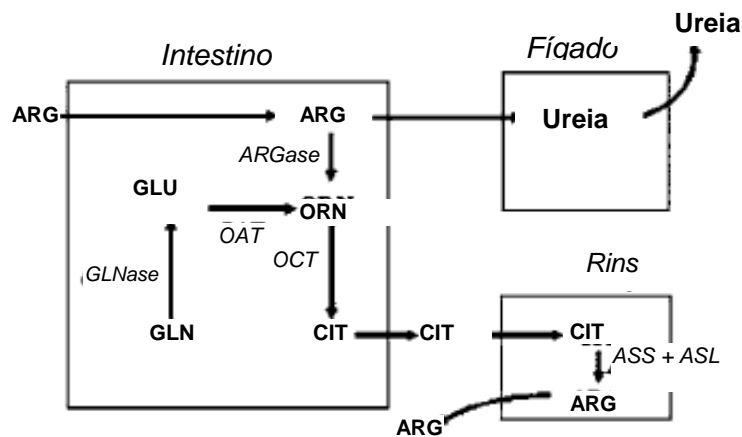


Figura 3: Síntese de arginina. ARG: Arginina; CIT: Citrulina; ARGase: Arginase; ASS: argininosuccinato sintase; ASL: argininosuccinato liase; GLNase: Glutaminase; GLU: Glutamato; OAT: ornitina aminotransferase; OCT: ornitina carbamoiltransferase (OSOWSKA et al.; 2008).

3.1.3.2. Catabolismo

Aproximadamente 40% da arginina dietética é degradada durante a absorção no intestino e o restante segue via circulação porta. A arginina absorvida pode passar por diversas vias de degradação (Figura 4). A via clássica inicia-se no citosol dos hepatócitos com a remoção do grupo guanidino e formação de ureia e ornitina, por meio da enzima arginase. Há dois tipos de arginase: arginase-I e arginase-II. A arginase-I é uma enzima citosólica presente principalmente no fígado, relacionada com a detoxificação da amônia e síntese de ureia. A arginase-II encontra-se nas mitocôndrias de células extra-hepáticas, como macrófagos, células renais, intestinais, endoteliais e está envolvida na regulação da síntese de ornitina, prolina e glutamato. Aumento da expressão da arginase é observado em condições de trauma e septicemia. Esta enzima pode ser estimulada por citocinas do tipo TH2 (ZALOGA et al., 2004; WU et al.; 2009).

A degradação da arginina pela arginase gera ureia e ornitina. A primeira é transportada via corrente sanguínea para os rins, através dos quais é eliminada. A ornitina é utilizada na regeneração da arginina. No interior da mitocôndria, a ornitina se associa ao carbomil-fosfato, formando citrulina. A citrulina associa-se ao ácido aspártico no citosol, formando argininosuccinato, que em seguida é clivado em arginina e succinato. À medida que a arginina completa o ciclo, dois átomos de

nitrogênio são desviados para a formação da ureia (NIEVES JR & LANGKAMP-HENKEN, 2002; SHILS et al., 2003).

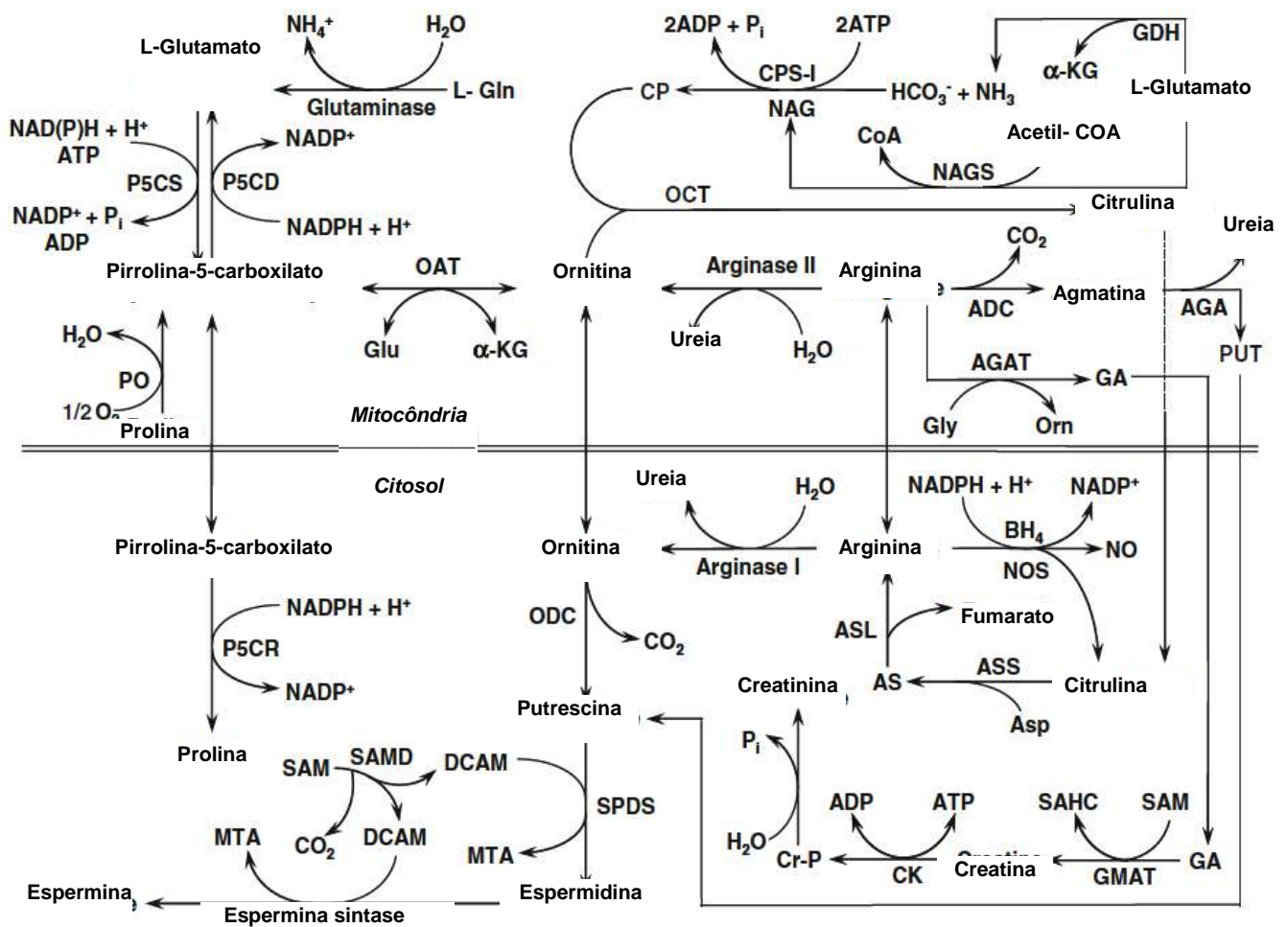


Figura 4: Metabolismo da arginina. ADC= arginina descarboxilase; AGA= agmatinase; AGT= Arginina:glicina amidinotransferase; ASL= argininosuccinato liase; ASS= argininosuccinato sintase; AS= argininosuccinato; Asp= aspartato; BH₄= tetrahydro-L-biopterina; CP= carbamoyl fosfato; CPS-I= carbamoyl fosfato sintase-I; DCAM=S- adenosilmetionina descarboxilada; Glu= glutamato; Gln= glutamina; GDH= glutamato desidrogenase; GA= guanidino-acetato; GMAT= ganidino acetato N-metiltransferase; CK= creatinaquinase; Cr-p= creatinafosfatase, α-KG= α -cetoglutarato; MTA= metiltioadenosina, NAG= N-acetilglutamato; NAGS= N-acetilglutamato sintase; ON= óxido nítri^{TP}, NOS= óxido nítrico sintase; OAT= ornitina aminotransferase; OCT= ornitina carbamoyltransferase; ODC= ornitina descarboxilase; PO= prolina oxidase; P5CD= pirrolina-5-carboxilato desidrogenase; P5CR= pirrolina-5-carboxilase redutase; P5CS= pirrolina-5-5 carbolixato sintase; PUT= putrescina; SAM= S-adenosilmetionina; SAMD= s-adenosilmetionina descarboxilase; SAHC= S-adenosilhomocisteína; SPDS] espermidina síntese (WU et al.; 2009)

A arginina também é substrato na síntese proteica, podendo ser convertida em prolina, glutamato e glutamina, aminoácidos comuns na maioria das proteínas. A síntese desses aminoácidos inicia-se com a conversão da arginina em ornitina que, em seguida, é convertida à pirrolina-5-carboxilato pela ornitina aminotransferase. A pirrolina-5-carboxilato pode ser transformada em prolina, por meio da pirrolina-5-carboxilato redutase, ou em glutamil-γ-semialdeído. Essa reação é espontânea. O

glutamil- γ -semialdeído é, por sua vez, convertido a glutamato pela pirrolina-5-carboxilato desidrogenase. A síntese de glutamina a partir de glutamato é catalisada pela glutamina sintase e utiliza amônia, prevenindo o acúmulo dessa substância nos tecidos extra-hepáticos (NIEVES JR & LANGKAMP-HENKEN, 2002).

O metabolismo da arginina também gera compostos nitrogenados essenciais como creatina, poliaminas, agmatina e ON. A arginina pode ser convertida no fígado em creatina pela arginina-glicina-amidotransferase. A creatina é transportada ao tecido muscular, onde funciona como carreadora de fosfato e regeneradora de adenosina trifosfato (ATP) (NIEVES JR & LANGKAMP-HENKEN, 2002).

A síntese de poliaminas também faz parte da via metabólica da arginina. Poliaminas como putrescina, espermina e espermidina possuem função no transporte, crescimento, proliferação e diferenciação celular. As poliaminas atuam durante a transcrição do RNA (ácido ribonucléico). A agmatina, outro metabólito da arginina, regula a concentração intracelular de poliaminas, já que elevada concentração destas substâncias apresenta efeitos tóxicos (YEH, 2004).

O ON é outro produto do metabolismo da arginina. O ON é um agente antimicrobiano efetivo contra antígenos intracelulares, parasitas e bactérias extracelulares. O ON também é vasodilatador e neurotransmissor. A síntese é catalisada pelas óxido nítrico sintases (NOSs), presentes em diversos tecidos (NIEVES JR & LANGKAMP-HENKEN, 2002). A NOS também pode ser ativada por citocinas IL-1 (interleucina-1), IL-2 (interleucina-2), TNF- α (fator de necrose tumoral- α) e INF- γ (interferon- γ) durante quadros de septicemia (ZALOGA et al., 2004).

3.1.4. Propriedades fisiológicas e funcionais

Em estados de estresse (operações, trauma, desnutrição e septicemia), a arginina pode tornar-se nutriente condicionalmente essencial (OCHOA et al., 2004). A deficiência de arginina ocorre devido à taxa de degradação mais intensa pela arginase, redução da ingestão alimentar e da absorção e diminuição da síntese de citrulina (KOBAYASHI et al., 1998; SHILS et al.; 2003; OCHOA et al., 2004; WU et al.; 2009; PREISER et al.; 2011). Estudo clínico desenvolvido por LUIKING et al. (2009) ilustram claramente estas alterações nos níveis plasmáticos de citrulina e arginina em condições de septicemia. Pacientes sépticos apresentaram menores níveis de citrulina, arginina e ON. A hipótese proposta foi a de que uma menor síntese de citrulina no intestino levaria a uma redução na síntese renal de arginina, por redução do substrato.

Maior ativação da arginase também foi observada e considerada outro fator para diminuição da concentração plasmática de arginina. Nessas condições, sugere-se a suplementação de arginina (OCHOA et al., 2004). Estudos com pacientes gravemente enfermos indicaram que a suplementação de arginina melhorou o balanço nitrogenado, a cicatrização e diminuiu as taxas de infecção, o período de internação, com concomitante aumento da competência imunológica destes pacientes (OCHOA et al., 2004; ZALOGA et al., 2004; KALIL et al.; 2006).

Arginina possui papel central no sistema imunológico e o metabolismo é importante na função de macrófagos e linfócitos T. A arginina participa na resposta inflamatória sistêmica por meio de dois mecanismos principais: produção de ON (via iNOS) por macrófagos e utilização de arginina para ativação e proliferação de linfócitos T. Na predominância de resposta imunológica TH2, a arginina pode, ainda, seguir a via da arginase. Por esta via, a modulação da resposta inflamatória se dá pela produção de ornitina, precursora de prolina e poliaminas, e pela regulação da disponibilidade de arginina, modulando, desse modo, a síntese de ON e a proliferação de linfócitos T (BANSAL & OCHOA, 2003).

Operação e trauma estão associados à grande diminuição do número de linfócitos T, principalmente linfócitos T CD4⁺. Pacientes nessas situações normalmente apresentam queda na síntese de IL-2, de fator de crescimento para linfócitos T, e INF- γ , citocinas essenciais no processo inflamatório. Pacientes que receberam dietas suplementadas com imunonutrientes, dentre esses a arginina, recuperaram a contagem de CD4⁺ em menores períodos de tempo do que pacientes que receberam dietas convencionais. Notou-se também maior produção de IL-2 e INF- γ (OCHOA et al., 2004). A arginina é essencial para diversas funções de órgãos linfóides e de células como macrófagos, linfócitos T, células NK e para a produção de citocinas como IFN- γ e IL-2 (OCHOA et al., 2004; ZALOGA et al., 2004). Esse aminoácido aumentou o peso e o número de células do timo, dos nódulos linfáticos mesentéricos (NLM) e das placas de Peyer em ratos com enterite como consequência de melhor resposta imunológica (GURBUZ et al., 1998). A arginina parece, também, incrementar a resposta de linfócitos à estimulação mitogênica e a função de células mielóides, promovendo a capacidade bactericida de macrófagos em modelo experimental de septicemia (SHANG et al., 2004). RODRIGUEZ et al. (2002, 2003) observaram que linfócitos T CD4⁺ desenvolvidos em meio deficiente de arginina exibiram menor expressão de receptores específicos (CD3) e deficiente diferenciação fenotípica. Demonstrou-se que a arginina é essencial para expressão da cadeia ζ do CD3, um componente essencial do

complexo de receptores de linfócitos T (TCR) e da via de transdução de sinal responsável pela ativação destas células. A função da arginina para o CD3 se dá por meio da estabilização do mRNA deste complexo de receptores (RODRIGUEZ et al. 2002, 2003).

Trabalho desenvolvido por Makarenkova et al. (2006) também ilustra a ação da arginina sobre linfócitos T de ratos, via arginase. A disfunção de linfócitos T é mediada pela depleção de arginina pela arginase I expressa por células mielóides supressoras (GR-1⁺ /CD11b⁺). Estas células correspondem a população heterogênea de células precursoras de macrófagos, granulócitos, células dendríticas e células mielóides em estágios iniciais de diferenciação. Geralmente, localizam-se na medula (HAILE et al.; 2008). Atualmente, sabe-se que em situações de trauma, ocorre elevação das células mielóides supressoras ao redor de centros germinativos da polpa branca do baço. Estas células expressam altos níveis de arginase com grande consumo de arginina, por meio do transporte via CAT-2B (MAKARENKOVA et al.; 2006). Além de serem responsáveis pelo aumento do consumo de arginina, as células mielóides supressoras inibem a proliferação de linfócitos T reduzindo a produção de IFN- γ e IL-2, importantes fatores de crescimento para estas células. Ainda, sintetizam ON e espécies reativas de oxigênio que reduzem a expressão da cadeia ζ do CD3 e induzem a apoptose das células T CD4⁺ e CD8⁺ (RODRIGUEZ & OCHOA, 2008; NAUSCH et al.; 2008).

Alguns estudos também ilustraram a importância da arginina na resposta imunológica humoral. Suplementação enteral de arginina, antes e após quadro de septicemia, tendeu a aumentar a proliferação de linfócitos nas placas de Peyer e a síntese de sIg-A, resultando em melhor função imunológica intestinal (SHANG et al., 2004). A suplementação com este aminoácido também elevou a síntese de anticorpos contra *P.aeruginosa*, a resposta de macrófagos ao LPS e a atividade do sistema enzimático antioxidante em modelos experimentais de queimadura (TSAI et al., 2002; SHANG et al., 2003). DE JONGE et al. (2002) avaliaram o papel da arginina sobre linfócitos B em animais que apresentaram aumento da expressão da arginase, simulando deficiência de arginina. Os resultados encontrados foram deficiência na maturação dos linfócitos B na medula, redução do número de linfócitos B no baço e linfonodos, reduzidos níveis de IgM no soro, além de alterações no desenvolvimento das placas de Peyer.

A arginina apresenta efeitos sobre a função e o reparo intestinal após trauma, isquemia ou ressecção do intestino (SHANG et al., 2004). Este aminoácido atua na síntese de colágeno, assim como na cicatrização, síntese da matriz extra-celular,

retenção de nitrogênio e remodelação de tecidos, uma vez que é convertida em prolina, um aminoácido presente na estrutura do colágeno (ZALOGA et al., 2004). A síntese de ON também parece ter papel positivo na cicatrização, uma vez que mantém fluxo sanguíneo e suprimento local de nutrientes na área lesada (WU et al.; 2009). Outro mecanismo que justifica esta ação trófica da arginina é a síntese de poliaminas envolvidas na proliferação, diferenciação, função celular, cicatrização e regeneração de tecidos (GRIMBLE & GRIMBLE, 1998; ZALOGA et al., 2004). A ação da arginina sobre a mucosa intestinal também pode ser explicada pelo aumento da secreção de hormônio do crescimento, prolactina, insulina, somatostatina e polipeptídeos pancreáticos. Estes hormônios podem apresentar efeitos tróficos sobre a mucosa intestinal (ADAWI et al., 1996; CHANCE et al.; 2006). OSOWKA et al. (2008) avaliaram os efeitos da pré administração parenteral de arginina em modelo de ressecção intestinal. Os animais que receberam arginina apresentaram maior peso e conteúdo de proteína na porção do intestino remanescente. Em modelos de enterite induzida por radiação, observaram-se melhores parâmetros morfológicos e recuperação da mucosa após suplementação de dieta com arginina. O número de animais que apresentaram culturas positivas e o número de bactérias presentes nos NLM's foi menor, principalmente quando a arginina foi administrada após radiação (GURBUZ et al., 1998; ERSIN et al., 2000). CHANG et al. (2001) observaram que a suplementação deste aminoácido elevou o número de vilosidades e atenuou a intensidade das lesões na mucosa intestinal em modelo de obstrução. A arginina também apresentou ação protetora sobre a mucosa intestinal durante endotoxemia causada por LPS por meio do aumento da proliferação de enterócitos e manutenção das vilosidades (SUKHOTNIK et al., 2004).

A manutenção do fluxo sanguíneo gastrintestinal, mediada pela arginina via ON também apresenta papel protetor sobre a mucosa intestinal. Estudo experimental com uso, durante cinco dias, da fórmula suplementada com arginina, mostrou aumento do fluxo sanguíneo no íleo (MATHESON et al., 2003). RHODEN et al. (2002) também demonstraram que esta fórmula enteral elevou o fluxo sanguíneo na região do jejuno terminal e íleo. Sugere-se que nutrientes específicos da fórmula enteral iniciam a dilatação de vasos intestinais a fim de otimizar o fluxo sanguíneo e a oferta de nutrientes e oxigênio à porção final do intestino delgado.

Estudo desenvolvido por POEZE et al. (2011) teve como objetivo avaliar os efeitos da administração parenteral de arginina sobre a perfusão hepato-esplâncica em modelo de septicemia. Observou-se melhor perfusão e aumento do fluxo sanguíneo na

veia porta, além de manutenção dos níveis da pressão arterial e pulmonar. Estes efeitos benéficos da suplementação de arginina foram atribuídos à síntese de ON.

3.2. Óxido Nítrico

3.2.1. Considerações Gerais

O óxido nítrico (ON) é um radical livre gasoso sintetizado a partir da arginina, precursor único. Livremente solúvel em água e lipídeos, esta pequena molécula atravessa membranas celulares ou se difunde entre as células. Em solução, o ON possui meia vida de 0,1 a 10 segundos, transformando-se em nitrito (NO_2^-) e nitrato (NO_3^-). Como resultado destas características, o ON funciona como importante sinalizador intra e intercelular nas áreas próximas onde foi sintetizado. Atua como mediador biológico similar a neurotransmissores no sistema nervoso, pode regular o tônus vascular e funciona como importante mecanismo de defesa inespecífico por meio da ação citotóxica (AKTAN, 2004; LEVY et al.; 2005). O ON, identificado na década de 80, foi inicialmente denominado “fator de relaxamento derivado do endotélio”. Posteriormente, emergiu como molécula sinalizadora com relevante papel na manutenção da homeostase, participando diretamente na patogênese de doenças agudas e crônicas (LEVY et al.; 2005).

3.2.2. Síntese

O ON é sintetizado a partir da oxidação da arginina em citrulina pela NOS em duas etapas. A reação consome 1,5 mol de NADPH e 2 mols de oxigênio por mol de citrulina formada. O mecanismo inicial envolve a hidroxilação da arginina, formando N^G -hidroxiarginina, que também pode funcionar como substrato para NOS. Em seguida, este intermediário é oxidado, formando citrulina e ON, com uso de um elétron do NADPH. NADPH, BH_4 (tetrahydro-L-biopterina) e cálcio funcionam como co-fatores para a síntese de ON (CYNOBER et al., 1995). A citrulina gerada pode ser utilizada na síntese de arginina nos rins, células endoteliais, macrófagos e células do sistema nervoso periférico (HALLEMEESCH et al.; 2002). Após a síntese, o ON se difunde pelas células adjacentes ativando a guanilato ciclase solúvel com formação de cGMP, responsável em grande parte pelo efeito vasodilatador (WU et al.; 1996).

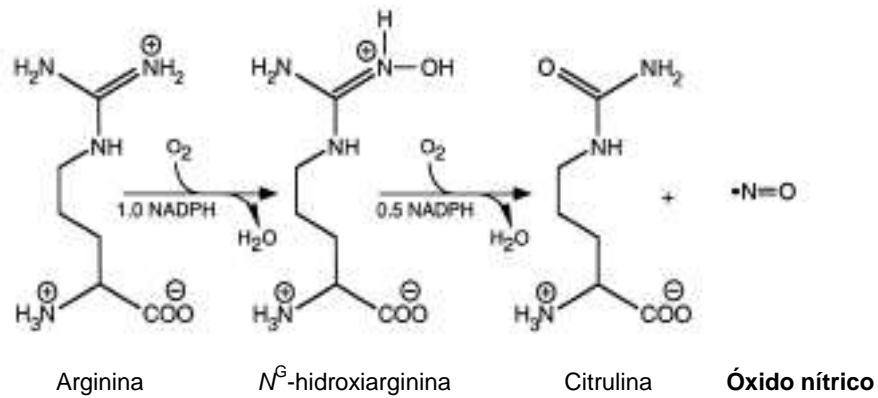


Figura 5: Síntese de óxido nítrico a partir da arginina (ANDREW & MAYER, 1999)

Há três formas de NOS (1) NOS-1 ou nNOS, enzima constitutiva encontrada no sistema nervoso; (2) NOS-2 ou iNOS, enzima indutiva produtora de grandes quantidades de ON e (3) NOS-3 ou eNOS, enzima constitutiva presente normalmente no endotélio e células cardíacas (NIEVES JR & LANGKAMP-HENKEN, 2002; AKTAN, 2004). De uma forma geral, as NOSs são dímeros compostos por dois monômeros idênticos. Cada monômero possui dois domínios: domínio C- terminal redutase e domínio N-terminal oxigenase. O primeiro contém sítios de ligação para uma molécula de NADPH, de FAD e de FMN. Esta região é responsável pela transferência de elétrons do NADPH ao citocromo *c*, evento dependente da calmodulina. O domínio oxigenase liga-se ao grupo heme, BH_4 e seu substrato arginina e converte N^{\ominus} -hidroxiarginina em ON e citrulina. Entre as duas regiões, está localizado o domínio de ligação da calmodulina, que possui papel chave na estrutura e função da enzima. O grupo heme é necessário para dimerização das NOSs, ou seja, a ligação entre o monômeros. O BH_4 atua estabilizando a dimerização, principalmente no caso da iNOS. (ANDREW & MAYER, 1999).

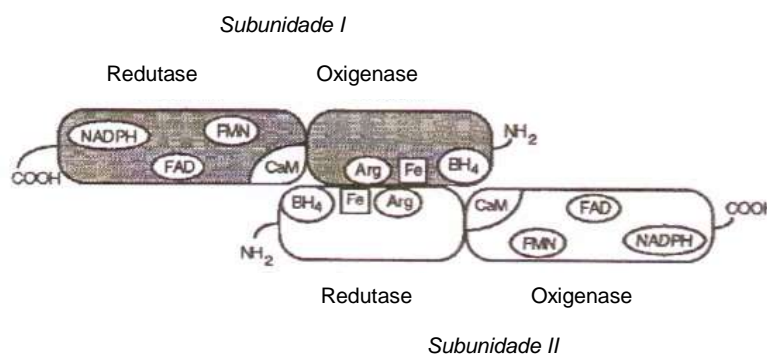


Figura 6: Estrutura básica das NOSs (ANDREW & MAYER, 1999).

As isoformas nNOS e eNOS funcionam em condições fisiológicas gerando pequenas concentrações de ON. Estas isoformas são ativadas pela elevação do cálcio intracelular (ou liberação dos estoques intracelulares) e ligação à calmodulina (ANDREW & MAYER, 1999; AKTAN, 2004; Wu et al.; 2009). A ativação dos receptores presentes no endotélio vascular por catecolaminas, vasopressinas, bradicinina, acetilcolina, histaminas, serotonina e forças hemodinâmicas resulta no influxo de cálcio, ativando a síntese de ON via eNOS (GARCIA & STEIN, 2006). Embora eNOS seja frequentemente referida como isoforma constitutiva, co-fatores como hipóxia, estrógenos e exercício físico podem alterar a expressão (ANDREW & MAYER, 1999). O ON sintetizado se difunde entre as células musculares lisas resultando em aumento da síntese de cGMP (guanosina monofosfato cíclica). O aumento da concentração de cGMP promove o relaxamento das células musculares lisas (GARCIA & STEIN, 2006). Tanto eNOS quanto nNOS são inibidas pela associação com caveolina (ANDREW & MAYER, 1999).

A síntese de ON por meio da iNOS independe do cálcio intracelular. A iNOS não é expressa em condições basais, exceto nas células epiteliais intestinais, nas brônquicas e células do túbulo renal. Endotoxinas e lipopolissacárides (LPS) ligam-se a receptores CD14 expressos na superfície de macrófagos, resultando na liberação de citocinas TH1 (IL-1, IL-2, IL-6, TNF- α e INF- γ). A ligação destas citocinas aos receptores específicos resulta na ativação de proteínas kinases e do fator de transcrição NF κ B, que por sua vez liga-se à região promotora do gene da iNOS, ativando a transcrição. Posteriormente, ocorrem a translação do mRNA da iNOS e a subsequente reunião das proteínas constituintes (THIEMERMANN, 1997; CHEN et al., 1998; BANSAL & OCHOA, 2003; ZALOGA et al., 2004). Uma vez induzida, a iNOS produz ON continuamente, resultando na ativação da guanilato ciclase solúvel e levando ao relaxamento prolongado das células endoteliais. A produção de ON pode durar até cinco dias após o estímulo da iNOS (MAÑÉ et al., 2001; KOLIOS et al.; 2004; LEVY et al.; 2005; GARCIA & STEIN, 2006).

A expressão da iNOS é bloqueada por glicocorticóides, poliaminas (espermina) e citocinas TH2 como IL-4, IL-10 e IL-13. A arginase, competidora da iNOS pelo substrato arginina, também pode inibir a síntese do ON. Do mesmo modo, produtos análogos à arginina podem inibir a atividade da iNOS. Estes inibidores competitivos possuem ação seletiva ou não. Os inibidores não seletivos incluem N^G-monometil-L-arginina (L-NMA), N ^{ω} -nitro-L-arginina (L-NNA), N ^{ω} -nitro-L-arginina metil ester (L-NAME), dimetil-arginina assimétrica (ADMA) e outros análogos competitivos da

arginina. Embora o L-NAME seja considerado bloqueador não seletivo, a afinidade é maior para eNOS do que para a iNOS. Aminoguanidina foi a primeira classe de inibidores específico para iNOS, embora não seja potente inibidor. Além da aminoguanidina, outras guanidinas também são inibidores da iNOS, sendo a hidroxiaminoguanidina o inibidor de maior ação seletiva. N-iminoetil- L- lisina (L-NIL) também representa outro inibidor específicos para *i*-NOS (WU et al.; 1996; THIEMERMANN, 1997; SUNDRANI et al., 2000; STRUNK et al.; 2001; LUIKING et al.; 2005; PETERSOSON et al.; 2007; WELLS & HOLIAN, 2007; WU et al.; 2009). Na década de 90, foi descoberta uma nova classe de inibidores, as aminoalquilisotiureias, com ação em torno de 10 vezes mais potência do que a aminoguanidina (THIEMERMANN, 1997; KUBES et al.; 2000).

3.2.3. Funções

O ON possui papel importante em diversos processos fisiológicos sendo responsável pelo tônus vascular e pela regulação da pressão e fluxo sanguíneo. O principal efeito é vasodilatação. O ON neuronal atua como neurotransmissor no sistema nervoso. A produção de ON pela eNOS mantém perfusão tissular adequada e regula a permeabilidade microvascular por meio de mecanismos dependentes do cGMP. Em condições basais, o ON protege a integridade do endotélio por meio de efeitos antiinflamatórios. Estes incluem modulação da expressão gênica, prevenção da apoptose induzida por estresse, inibição da agregação e ativação plaquetária e redução da adesão leucocitária. ON modula o processo de adesão por reduzir a expressão de moléculas de adesão endoteliais (VCAM-1, ICAM-1, E-selectina, P-selectina) induzidas por citocinas, assim como as moléculas de adesão presentes nos leucócitos (β -2 integrinas). A etapa inicial da cascata de eventos relacionados à septicemia é a adesão de polimorfonucleares (PMN), principalmente neutrófilos, às células endoteliais (SUNDRANI et al.; 2000). Estudos experimentais revelaram que ON reduz a expressão de moléculas de adesão endoteliais e a ligação a leucócitos. Contrariamente, a inibição da síntese de ON elevou a adesão leucocitária por meio do aumento da concentração de IL-6 e TNF- α . O ON inibe ainda a expressão do MHC-II e a proliferação de células musculares lisas. ON também funciona como antioxidante, reagindo com intermediários tóxicos reativos do oxigênio, reduzindo lesões ao endotélio e a inflamação vascular (SUNDRANI et al.; 2000; SASAKI et al.; 2003; LEVY et al.; 2005).

O ON possui papel na imunidade não-específica (inata). A síntese via iNOS é o mecanismo primário pelo qual macrófagos eliminam microrganismos intra e extracelulares. Estudos *in vitro* demonstraram que ON inibe o crescimento de fungos, helmintos, protozoários e bactérias como *Escherichia coli*, *Salmonella* e *Shigella*. Ação antiviral também foi atribuída ao ON (KOLIOS et al.; 2004; GARCIA & STEIN, 2006). O efeito antimicrobiano do ON dá-se pela ligação ao ferro presente em enzimas microbianas envolvidas na respiração celular e na síntese de DNA. O ON também possui ação oxidante e pode reagir com peróxido de hidrogênio (H₂O₂), formando peroxinitrito (ONOO⁻) que em seguida é protonado, originando o ácido peroxinitroso (ONOOH). Este ácido se decompõe no radical hidroxil (OH⁻) e dióxido de nitrogênio (NO₂). Esses sub-produtos do ON possuem ação oxidante e antimicrobiana (CYNOBER et al., 1995; BANSAL & OCHOA, 2003; YEH, 2004; ZALOGA et al., 2004; HARDY et al.; 2006).

Tem-se observado que o ON possui papel fundamental na regulação da fisiologia do trato gastrointestinal (TGI) em situações de estresse como septicemia, choque e isquemia mesentérica. A produção basal de ON (via eNOS) mantém a perfusão intestinal, minimiza a disfunção das barreiras mucosa e microvascular, prevenindo o aumento da permeabilidade intestinal (CHEN et al., 1998; SUCHNER et al.; 2002; KOLIOS et al.; 2004; LEVY et al.; 2005). Observou-se que a inibição da síntese de ON aumenta a permeabilidade intestinal a substâncias de baixo peso molecular, sendo que este efeito foi revertido após administração de ON. A redução de cGMP tem sido apontada como causa da contração das células epiteliais e lesões nas junções inter-epiteliais. Ainda, o ON aumenta a secreção de muco, modula o transporte e a secreção de cloreto e fluídos, mantém o fluxo sanguíneo, inibe a agregação de neutrófilos, inativa metabólitos reativos do oxigênio e modula o reparo da mucosa, controlando a permeabilidade (WIEST & RATH, 2003; KOLIOS et al.; 2004).

3.2.4. Óxido nítrico e inflamação / septicemia

A função do ON durante a septicemia é controvertida. Endotoxinas e citocinas TH1 iniciam a cascata de eventos que causam aumento da expressão das NOSs, especialmente da iNOS, em diversos tecidos (pulmão, fígado, intestino) culminando em hipotensão sistêmica. Como a queda da pressão associa-se ao aumento da mortalidade em pacientes sépticos, a reversão da hipotensão tem sido um dos focos de tratamento durante septicemia. Desse modo, é grande o interesse sobre os possíveis

benefícios da inibição da síntese do ON neste quadro. Estudos experimentais e clínicos baseados na inibição das NOSs têm avaliado o papel do ON embora apresentem resultados contraditórios (DAHM et al. 1998; PEDOTO et al.; 1998; SUNDRANI et al.; 2000; LOPEZ et al.; 2004; LUIKING et al.; 2005; UCHIDA et al.; 2007).

Estudo realizado por SUNDRANI et al. (2000) em modelo de septicemia demonstrou que a inibição não seletiva da NOS com emprego de L-NMA realmente reverte a hipotensão, mas aumenta o rolamento e a adesão leucocitária. PETERSSON et al (2007) utilizaram o mesmo inibidor em modelo de colite. A inibição não seletiva da NOS provocou redução do fluxo sanguíneo durante a inflamação. DAHM et al. (1998) observaram que a administração de L-NAME também provocou redução do fluxo mesentérico em modelo experimental de endotoxemia. Nestes trabalhos, o ON foi considerado fundamental para perfusão tissular durante o processo inflamatório. A vasodilatação, a redução da adesão leucocitária e a inativação do anion superóxido sugerem que o aumento da síntese de ON durante septicemia contribua para a manutenção do fluxo microvascular, oferta adequada de oxigênio e nutrientes e proteção do endotélio contra estresse oxidativo. Muitos autores acreditam que a síntese faz parte da resposta inflamatória, no sentido de minimizar a isquemia, coagulação exacerbada e, concomitantemente, eliminar a infecção. As lesões conseqüentes à inibição da síntese de ON podem ser mais acentuadas do que as provocadas pelo próprio ON e respectivos metabólitos, como pensado anteriormente (SUCHNER et al. 2002; HARDY et al.; 2006; PETERSSON et al.; 2007).

Por outro lado, SAMEL et al (2003) concluíram que a inibição não seletiva da NOS (uso de L-NAME) e a inibição específica da iNOS (uso de aminoguanidina) foram positivas, uma vez que reduziram a translocação bacteriana para camadas mais profundas da parede intestinal (submucosa e muscular). A síntese de ON via iNOS foi relacionada a lesões da mucosa intestinal. Os efeitos positivos do L-NAME também foram relacionado à inibição da iNOS, uma vez que este é não seletivo.

Estudos clínicos também foram realizados para avaliação da ação do ON. Em estudo conduzido por LUIKING et al. (2009), pacientes sépticos apresentaram redução da síntese de ON uma vez que grande parte da arginina foi desviada para síntese de ureia. AVONTUR et al. (1998) observaram manutenção do tônus vascular e da pressão sanguínea em pacientes sépticos submetidos à inibição não seletiva (uso de L-NAME), porém contínua, da NOS. Contudo, não houve melhora clínica ou redução da mortalidade em tais pacientes quando comparados ao grupo controle. Em estudo randomizado, duplo cego e placebo-controlado, LOPEZ et al. (2004) avaliaram os

efeitos do inibidor 546C88, não seletivo da NOS. Pacientes sépticos tratados com este inibidor apresentaram maior taxa de mortalidade do que pacientes do grupo placebo. Já a suplementação contínua de arginina (precursor do ON) em pacientes sépticos não provocou alterações nos parâmetros hemodinâmico, cardíaco ou pulmonar (LUIKING et al.; 2005). Neste contexto, deve-se considerar que o aumento da síntese de ON é apenas um dos diversos fatores que contribuem para o processo de septicemia. A inibição isolada da síntese de ON não foi suficiente para bloquear ou reduzir a cascata de eventos que levam à ativação exacerbada do sistema imunológico.

Animais *knockout* para iNOS (iNOS^{-/-}) ou eNOS (eNOS^{-/-}) também têm sido utilizados para avaliação da ação do ON. Em modelo de colite aguda induzida por ácido acético, animais iNOS^{-/-} apresentaram mais lesões (hemorragia e ulcerações), persistência da inflamação, além de cicatrização menos efetiva do que os animais WT. Aumento da expressão de moléculas de adesão (endoteliais e leucocitárias) foi apontado como causa da intensificação do processo inflamatório (McCAFFERTY et al.; 1997). A eNOS também se mostrou eficaz em regular a expressão das moléculas de adesão. SASAKI et al (2003) avaliaram o papel desta enzima em modelo experimental de colite, utilizando animais eNOS^{-/-}. Os resultados incluíram lesões à mucosa mais extensas, aumento da expressão de moléculas de adesão e processo inflamatório mais intenso nos animais que não expressaram a eNOS.

Além das modificações hemodinâmicas, o excesso de ON pode ser responsável por lesões tissulares devido à formação de peroxinitrito. O intestino é alvo da ação tóxica do peroxinitrito sofrendo danos da barreira epitelial por meio da dilatação das junções oclusivas, alteração do citoesqueleto e inibição da síntese de ATP. O resultado é o aumento da permeabilidade intestinal. Estudos mostraram que infusão de altas concentrações de ON provoca lesões à mucosa e diminui a viabilidade de células epiteliais do cólon de ratos (WIEST & RATH, 2003). SIMSEK et al. (2001) avaliaram a ação da S-metil-isotiureia, um inibidor específico da iNOS, em modelo experimental de pancreatite e observaram menor taxa de translocação bacteriana para os NLM. A inibição iNOS, também por meio da S-metil-isotiureia, em modelo de queimadura reduziu a translocação bacteriana e melhorou a função da barreira intestinal devido a menor produção de peroxinitrito (CHEN et al. 1998). Em modelo de choque hemorrágico, a inibição não seletiva (emprego de L-NAME) e a inibição específica para iNOS (uso de aminoguanidina) provocaram melhor integridade da mucosa e menores taxas de mortalidade e de translocação bacteriana (HUA & MOOCHHALA, 2000). UCHIDA et al. (2007) avaliaram os efeitos da inibição da iNOS (uso de

aminoguanidina) sobre a função pulmonar, em modelo de isquemia e, seguida de reperfusão. A inibição da iNOS reduziu o edema e a concentração de ON nos pulmões e no plasma. Contudo, quando foram avaliadas a translocação bacteriana e a morfologia da mucosa intestinal, não foram observadas diferenças significativas entre o grupo que recebeu aminoguanidina e o grupo controle.

Alguns estudos têm comparado os diferentes efeitos produzidos pela inibição seletiva e não seletiva da NOS. WU et al. (1996) utilizaram aminoguanidina (inibidor específico para iNOS) e L-NAME (inibidor da eNOS) em modelo de endotoxemia. A administração de aminoguanidina e L-NAME atenuou a hipotensão causada pela inflamação. Entretanto, a inibição da iNOS reduziu as disfunções renal, hepática e pancreática decorrentes da endotoxemia. A inibição da eNOS não afetou estes parâmetros. Estes resultados mostram que a iNOS está associada à falência múltipla orgânica observada em quadros de septicemia devido aos efeitos citotóxicos, à ativação de neutrófilos, à vasodilatação, à redução do tônus vascular e ao aumento da produção de nitrosaminas, derivadas do ON de ação citotóxica (KOLIOS et al.; 2004). STRUNK et al. (2001) desenvolveram estudo similar. A inibição da iNOS (uso de L-NIL) e eNOS (uso de L-NAME) também foi igualmente eficaz em restaurar o nível da pressão arterial em animais sépticos. Entretanto, a inibição da iNOS manteve a glicemia e impediu a acidose e a redução da concentração de HCO_3^- , eventos frequentemente observados durante septicemia. Estes estudos apóiam a idéia de que ON sintetizado via eNOS é imprescindível e a inibição desta enzima pode ser potencialmente nociva. Já o bloqueio específico da iNOS pode trazer alguns benefícios em situações de septicemia. Contudo, VALLANCE et al. (2004) mostraram que a síntese de ON via iNOS não está associada a lesões intestinais. Após estímulo inflamatório intestinal, animais iNOS^{-/-} e eNOS^{-/-} desenvolveram colite exagerada e prolongada. A ausência da eNOS provocou maior fragilidade da mucosa, uma vez que a colite foi induzida com menores doses do fármaco. Este grupo também apresentou redução do muco, do número das células globulares e elevação da translocação bacteriana. Os animais iNOS^{-/-} não apresentaram atenuação das lesões, mostrando que o ON via iNOS não está associado a danos intestinais. Ainda, os animais iNOS^{-/-} apresentaram incapacidade em controlar a inflamação crônica. Os autores não atribuíram papel significativo da nNOS na progressão da inflamação. A discrepância dos resultados encontrados nos trabalhos supracitados deve-se a diferentes modelos experimentais e, principalmente, ao tipo, à concentração e ao período de administração do inibidor utilizado (PEDOTO et al, 1998; UCHIDA et al. 2007).

O papel do ON sobre a inflamação também tem sido investigado. Há evidências de que o ON seja capaz de controlar a inflamação induzindo a resposta TH2 e inibindo a proliferação de linfócitos TH1 (VAN DER VEE, 2001; MIKI et al.; 2005). Estudo realizado por MIKI et al. (2005) mostrou que animais iNOS^{-/-} apresentaram supressão na síntese de IL-4 e aumento da concentração de IFN após tratamento com LPS. A inibição genética da síntese de ON também foi responsável pelo aumento da mortalidade após o estímulo inflamatório, sugerindo que ON pode ter ação protetora contra lesões sistêmicas induzidas pelas citocinas pró-inflamatórias.

3.3. Poliaminas

3.3.1. Considerações Gerais

As poliaminas são aminas alifáticas pertencentes à grande família das aminas biogênicas. Inicialmente identificadas no líquido seminal, as poliaminas estão presentes em todas as células eucariotas e são formadas *in situ* à medida que são demandadas (NOGUCHI et al.; 1996; LIMA & GLÓRIA, 1999; LARQUÉ et al.; 2007). O termo poliamina é utilizado para designar três compostos derivados da ornitina após a descarboxilação: putrescina, espermidina e espermina. Recentemente, a agmatina, amina derivada da arginina, foi identificada como poliamina (MOINARD et al.; 2005; LARQUÉ et al.; 2007).

Poliaminas possuem baixo peso molecular, são solúveis em água e apresentam valores de pK em torno de 10. Em pH fisiológico, apresentam-se na forma protonada, como cátions. Esta característica físico-química permite fortes interações tipo cátion-ânion com diferentes macromoléculas aniônicas como DNA e RNA. Estas interações relacionam-se, em parte, com os diversos efeitos biológicos atribuídos às poliaminas (MOINARD et al.; 2005).

As poliaminas são componentes indispensáveis às células vivas, sendo importantes na regulação das funções dos ácidos nucleicos, na síntese de proteína e, provavelmente, na síntese de membranas (LARQUÉ et al.; 2007). Poliaminas também estão associadas com modulação da ativação de macrófagos e da produção de ON (BANSAL & OCHOA, 2003).

A dieta ocidental usual fornece suprimento diário adequado de poliaminas. A concentração na dieta é variável, dependendo do tipo de alimentos consumidos. Carnes são ricas em espermina, enquanto alimentos de origem vegetal possuem alto

teor de putrescina e espermidina. Poliaminas utilizadas pelo organismo humano também podem ser provenientes de secreções do trato gastrintestinal, da descamação de enterócitos ou da síntese bacteriana. As poliaminas, tanto exógenas quanto endógenas, são completamente absorvidas e direcionadas preferencialmente para tecidos em crescimento ou reparo (MOINARD et al.; 2005).

3.3.2. Metabolismo

3.3.2.1. Síntese

A síntese das poliaminas (Figura 7) se inicia com a utilização da arginina pela arginase, gerando ornitina, principal precursora destas aminas (OCHOA et al.; 2001). A atividade da arginase é aumentada por citocinas TH2 como IL-4, IL-10 e TGF- β . Ornitina pode sofrer descarboxilação, numa reação catalisada pela ornitina descarboxilase (ODC), formando putrescina. ODC é enzima limitante na síntese das poliaminas (MOINARD et al.; 2005; LARQUÉ et al.; 2007). A IL-1 seria uma das citocinas envolvidas na regulação da atividade da ODC intestinal durante quadro de septicemia (NOGUCHI et al.; 1996).

Espermina e espermidina derivam-se da putrescina por meio de sucessivas agregações de grupos propilamino – S-adenosil-S-metilhomocisteamino (SAMHC) pela ação das aminopropil-transferases. Os grupos propilaminos são derivados do S-adenosilmetionina (SAM), sendo que esta reação é catalisada pela enzima s-adenosilmetionina descarboxilase (SAMDC). Observa-se que a síntese de espermina e espermidina é condicionada pela disponibilidade de metionina (MOINARD et al.; 2005; LARQUÉ et al.; 2007).

3.3.2.2. Absorção e sistemas de transporte

A absorção de poliaminas provenientes da dieta ocorre no duodeno e na porção inicial do jejuno. Os mecanismos de transporte são bem caracterizados apenas em bactérias. Em mamíferos, sabe-se que as poliaminas são captadas pelos enterócitos por mecanismos de saturação tempo/temperatura - dependentes. Este sistema de transporte não é específico para diferentes poliaminas. Em membranas de células intestinais de ratos, sugere-se que existam sistemas independentes de sódio para espermina, espermidina e putrescina (LARQUÉ et al.; 2007). Em células humanas, a

agmatina é transportada ativamente, sendo este mecanismo o inibidor de transporte de outras poliaminas (MOINARD et al.; 2005).

O transporte de poliaminas é um dos meios de regulação dos níveis intracelulares. A homeostase ocorre por meio do balanço entre síntese, degradação e captação. Este transporte é estimulado pela redução da concentração intracelular de poliaminas, como ocorre durante inibição da ODC. Nestas condições, o suprimento exógeno de poliaminas leva ao rápido aumento do conteúdo intracelular (NIKOLIC et al.; 2006).

3.3.2.3. Catabolismo

Poliaminas que alcançam a circulação são utilizadas por diversos tecidos como intestino, timo e fígado. Nestes locais, as poliaminas sofrem reações de interconversão e acetilação (LARQUÉ et al.; 2007).

Embora as reações catalisadas pela aminopropil-transferase sejam irreversíveis, espermina e espermidina podem ser recicladas em espermidina e putrescina respectivamente por meio de reações de acetilações. Posteriormente, poliaminas são oxidadas pelas poliamino-oxidases (PAO) presentes nos peroxissomos ou diamino-oxidases (DAO), presentes principalmente na mucosa intestinal, fígado e rins. (MOINARD et al.; 2005; NIKOLIC et al.; 2006). Na urina, é possível detectar diversos metabólitos da putrescina, espermidina, espermina (LARQUÉ et al.; 2007).

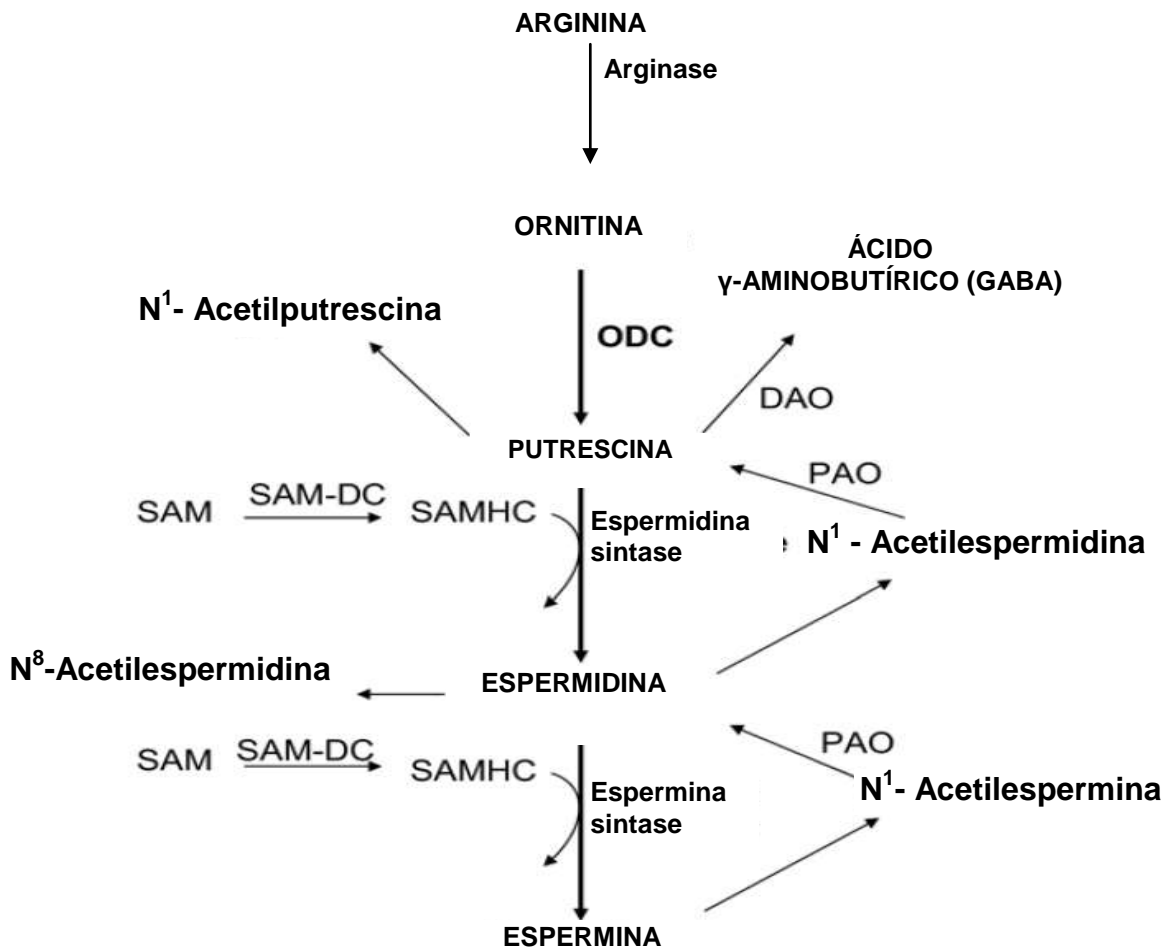


Figura 7: Metabolismo das poliaminas. ODC: ornitina-descarboxilase; SAM: S-adenosil-metionina; SAMDC: SAM-descarboxilase; SAMHC: S-adenosilmetil-homocisteína; DAO: diamino-oxidase ; PAO: poliamino-oxidase espermidina-sintase (LARQUÉ et al.; 2007).

3.3.3. Propriedades funcionais e efeitos biológicos

As poliaminas regulam a expressão gênica, o processo de transdução de sinal, a função de canais iônicos, a síntese de DNA e de proteínas e a apoptose. Assim, são essenciais na proliferação, diferenciação e função celular. Sabe-se que em condições de estimulação celular por fatores de crescimento, um dos primeiros eventos cruciais é a indução da síntese de poliaminas, que precede a replicação do DNA e a síntese proteica (FLYNN et al.; 2002; MOINARD et al.; 2005). Observa-se que durante as fases G1 e G2 da mitose, ocorre elevação da concentração intracelular de ODC e poliaminas. (CHANCE et al.; 2006). As poliaminas também apresentam ação sobre fibroblastos, relacionando-se aos processos de cicatrização e proliferação da matriz extra-celular. Ainda, as poliaminas funcionam como substrato para transglutaminases, enzimas envolvidas em diversas etapas do processo de cicatrização: apoptose, osteogênese,

sinalização e adesão celular. Poliaminas também são necessárias para a expressão de TGF- β (MOINARD et al.; 2005).

Propõe-se que poliaminas induzam a proliferação e a maturação do trato gastrointestinal de ratos recém-nascidos e apresentam efeitos tróficos sobre a mucosa intestinal de ratos adultos (LARQUÉ et al.; 2007). Estudo desenvolvido por DELOYER et al. (2005) demonstrou que a suplementação de espermina em ratos recém-nascidos promoveu aumento do peso do jejuno e íleo, indicando hiperplasia ou hipertrofia dos enterócitos. Observaram-se também elevações dos níveis de sucrase e maltase nestas porções, indicando atuação da espermina sobre a maturação intestinal, principalmente nos primeiros dias de suplementação. Sugere-se que a maturação induzida especificamente pela espermina ocorra em duas fases. A primeira, transitória, corresponde à indução da apoptose de enterócitos imaturos localizados no topo das vilosidades. A segunda fase, mais longa, é a substituição dos enterócitos imaturos por células intestinais típicas.

NOGUCHI et al. (1996) avaliaram a síntese de poliaminas pela mucosa intestinal em condições de septicemia e observaram aumento na atividade da ODC e SAMDC, assim como elevação da níveis de putrescina. Em culturas de células epiteliais intestinais, observou-se que o processo de migração celular é dependente da formação de filamentos de actina, etapa condicionada à presença de poliaminas (MOINARD et al.; 2005).

Diversos estudos têm mostrado que a síntese de poliaminas ou a captação intestinal induz hiperplasia adaptativa na porção intestinal remanescente após ressecção (CZERNICHOW et al.; 1997; DE OCA et al.; 1997; DURANTON et al.; 1998; LARDY et al.; 2004). Nesta linha de estudo, LARDY et al. (2004) observaram aumento da síntese de ornitina e poliaminas pelos enterócitos de ratos após tal procedimento. CZERNICHOW et al. (1997) verificaram que suplementação da dieta de animais com ornitina α -cetogluturato, precursor da síntese de poliaminas assim como arginina, aumentou a altura das vilosidades e a concentração de putrescina na mucosa intestinal após ressecção. O fornecimento de poliaminas induziu ainda o aumento da atividade das hidrolases na borda em escova, sugerindo preservação da funcionalidade dos enterócitos. Animais que receberam dieta suplementada com ornitina α -cetogluturato apresentaram maior conteúdo proteico da mucosa intestinal após transplante intestinal. Os autores observaram ainda menores taxas de translocação bacteriana nestes animais (DE OCA et al.; 1997). Em modelo de isquemia intestinal, o fornecimento de

ornitina α -cetogluturato também acelerou o reparo da mucosa intestinal e elevou o conteúdo intestinal de poliaminas (DURANTON et al.; 1998).

O papel trófico das poliaminas pode ser explicado, em parte, pela capacidade em regular a transcrição de genes promotores do crescimento celular como c-fos, c-jun e c-myc e a inibição de genes inibidores do crescimento com p53 e JunD (WANG et al. 2007). Estudo realizado por LI et al. (2001) ilustra esta atividade regulatória das poliaminas. A inibição da síntese de poliaminas proporcionou meia vida de dezoito horas do mRNA do gene p53, gen envolvido na inibição do crescimento celular. Já na cultura em que foi acrescentada a espermidina, a meia vida do gene p53 caiu para quarenta e oito minutos, indicando que poliaminas regulam negativamente a expressão deste gene.

A inibição da síntese de poliaminas também tem sido utilizada para elucidação das referidas propriedades. O principal inibidor empregado é o difluor-metil-ornitina (DMFO), um competidor da ornitina que depleta a ODC (CHANCE et al.; 2006). CHANCE et al. (2006) avaliaram se a administração de DMFO associado ao peptídeo GLP-2 reduziria os efeitos hiperplásicos sobre a mucosa intestinal em modelo de NPT. A ação trófica do GLP-2 estaria relacionada à síntese de poliaminas. A administração do DMFO associada ao GLP-2 inibiu a síntese de poliaminas intestinais, reduziu significativamente o peso e o conteúdo de proteína no duodeno e jejuno, além de provocar alterações morfológicas na mucosa. Desse modo, a inibição da síntese de poliaminas bloqueou os efeitos protetores do GLP-2, observados nos animais que receberam GLP-2 e não foram submetidos à inibição da ODC.

3.4. Translocação bacteriana

3.4.1. Considerações gerais

O termo translocação bacteriana é definido como a passagem de microrganismos viáveis ou não e de respectivos produtos, como endotoxinas e peptídeos glicanos, do lúmen intestinal para os nódulos linfáticos mesentéricos (NLM), e possivelmente, para outros órgãos sem bactérias, como fígado e baço, causando infecção ou estimulando o sistema imunológico (DE OCA et al., 1993; STEINBERG, 2003; WIEST & RATH, 2003; GATT et al.; 2007). Diversas condições clínicas como obstrução intestinal, icterícia, doença inflamatória intestinal, uso de nutrição parenteral total e jejum concomitante assim como operações de emergência podem afetar o

equilíbrio homeostático entre os microrganismos luminiais e a barreira intestinal, promovendo a passagem destes microrganismos por essa barreira. Supõe-se que o cólon, devido à grande concentração de bactérias, seja o local mais provável de ocorrência da translocação bacteriana (GATT et al.; 2007). *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae*, *Enterococcus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, bactérias anaeróbicas facultativas presentes no intestino humano, podem causar infecção extra-intestinal via translocação bacteriana (RAYES et al., 2002; SILVA et al., 2002; SEEHOFER et al., 2003; STALLION et al., 2005). Organismos aeróbicos translocam mais facilmente uma vez que o oxigênio sanguíneo inibe o crescimento de bactérias entéricas anaeróbicas (LICHTMAN, 2001).

A translocação bacteriana também ocorre, em baixos níveis, em indivíduos saudáveis e acredita-se que seja um evento fisiológico e necessário para a geração de células imunocompetentes pelo tecido linfóide associado à mucosa gastrintestinal (GALT) (MACFIE, 2000; LICHTMAN, 2001).

Tem sido proposto que estas bactérias intestinais, potencialmente patogênicas, ou respectivas endotoxinas possam iniciar ou perpetuar o estado de septicemia em pacientes imunossuprimidos, que não apresentam outros focos de infecção, levando ao desenvolvimento de falência múltipla orgânica (Figura 8). A translocação de bactérias ou endotoxinas induz a ativação de células imunológicas e a liberação de mediadores inflamatórios, levando à síndrome da resposta inflamatória sistêmica, falência múltipla dos órgãos e morte. Embora estes mediadores tenham efeitos benéficos após a lesão, a produção exagerada ou prolongada é prejudicial. Essas moléculas são responsáveis por lesões tissulares e favorecem o catabolismo, inibindo a síntese hepática de albumina e disponibilizando proteínas e aminoácidos para manutenção das respostas imunológica e inflamatória (O'BOYLE et al., 1998; SUGIURA et al., 1999; RUIZ-SILVA et al., 2002; SAMEL et al., 2002; GATT et al.; 2007).

A cultura de microrganismos nos NLM e órgãos sem bactérias (fígado, baço e pulmão) é um método direto para determinação da translocação bacteriana. Um marcador indireto é a cultura ou a presença de endotoxina no sangue periférico (LICHTMAN, 2001; GATT et al.; 2007). Estudos recentes realizados no Laboratório de Radioisótopos da Faculdade de Farmácia / UFMG também foram capazes de evidenciar o fenômeno da translocação bacteriana por meio de bactérias marcadas com isótopos radioativos. Dentre estes, destacam-se os trabalhos desenvolvidos por DINIZ et al. (2005), OLIVEIRA et al. (2006) e QUIRINO et al. (2007) que avaliaram a

translocação bacteriana em modelos de obstrução intestinal e icterícia obstrutiva respectivamente, utilizando *E.coli* marcada com $^{99m}\text{Tecnécio}$.

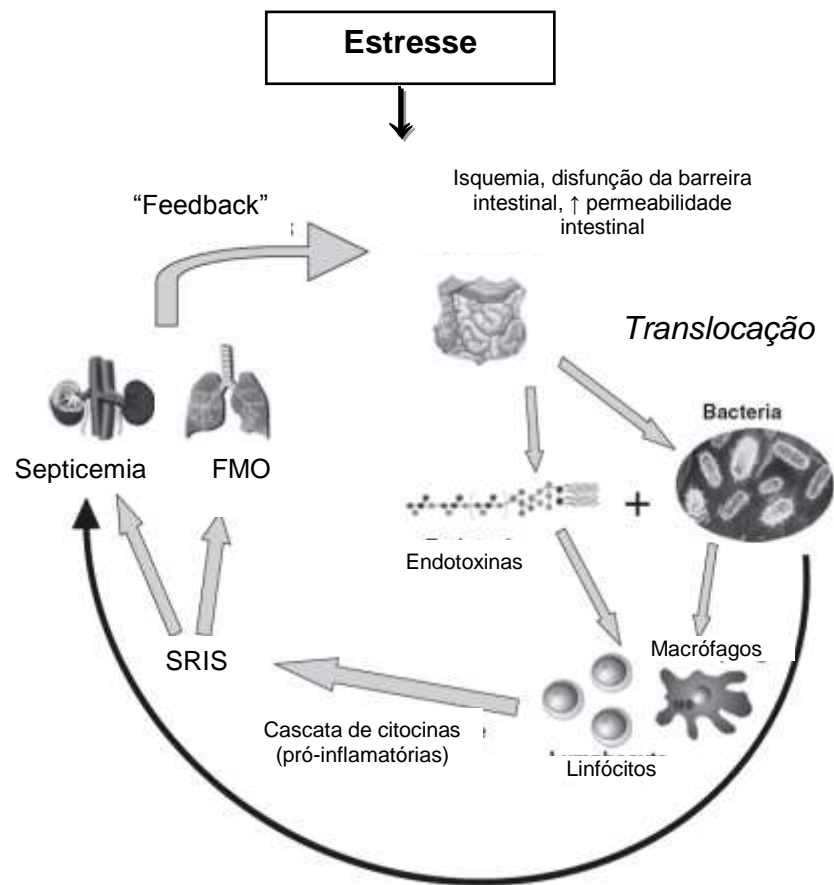


Figura 8: Translocação bacteriana e falência múltipla de órgãos. SRIS =síndrome da resposta inflamatória sistêmica; FMO= falência múltipla orgânica (GATT et al; 2007).

3.4.2. Etiologia

Os três principais mecanismos envolvidos na translocação bacteriana são (a) alteração da microbiota gastrointestinal, resultando em crescimento bacteriano exagerado; (b) alterações físicas da barreira intestinal; (c) deficiência do sistema imunológico do hospedeiro, sendo esse o principal fator relacionado com a translocação bacteriana (Figura 9) (BERG, 1995; WIEST & RATH, 2003).

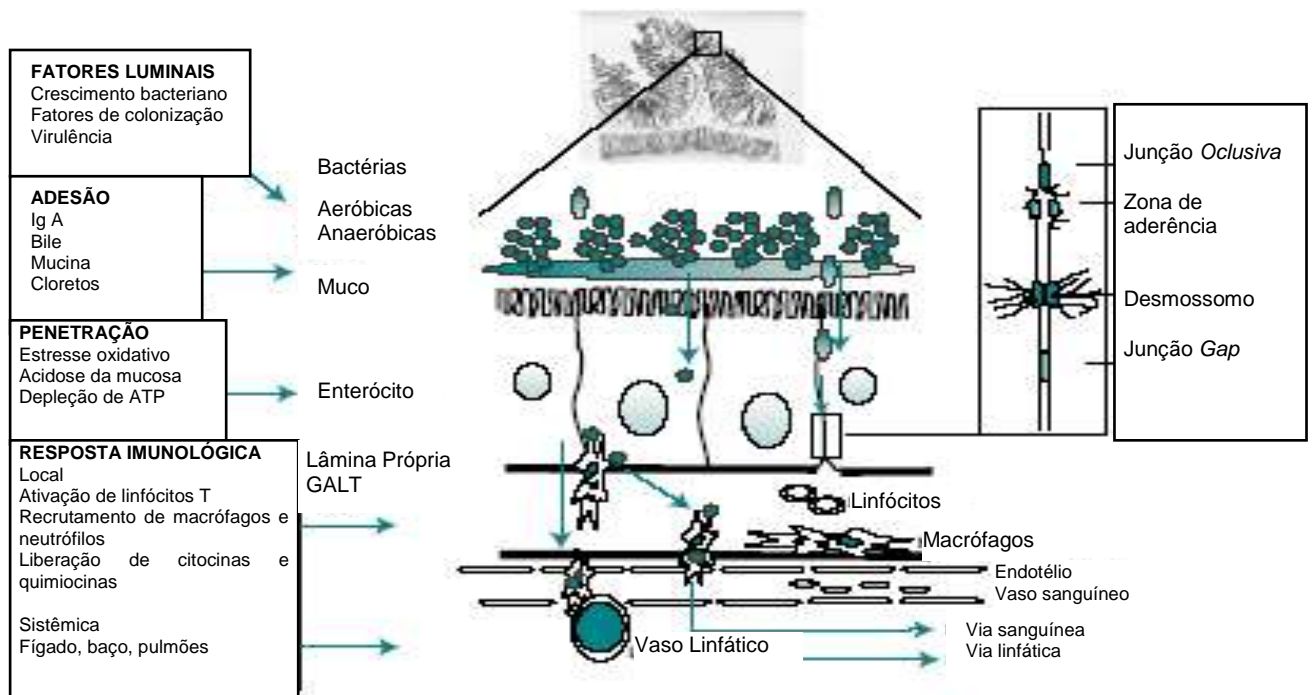


Figura 9: Mecanismos e componentes envolvidos no processo de translocação bacteriana. (WIEST & RATH, 2003).

3.4.2.1. Alteração da microbiota gastrintestinal

O primeiro componente de defesa da barreira intestinal é a microbiota, formada por bactérias anaeróbicas, principalmente as dos gêneros *Bacteroides*, *Peptostreptococcus*, *Clostridium*, *Eubacterium*, *Bifidobacterium* e *Fusobacterium* (WIEST & RATH, 2003). Essas bactérias limitam adesão e crescimento de bactérias aeróbicas patogênicas, também naturalmente presentes no intestino humano. Alteração desse equilíbrio, por meio da redução da população de bactérias anaeróbicas, permite crescimento e adesão das bactérias patogênicas e, possivelmente, a translocação bacteriana (BERG, 1995; SWANK & DEITCH, 1996).

3.4.2.2. Alterações da barreira intestinal

A mucosa intestinal possui tanto a função de absorver os nutrientes como a função protetora (SAWAI et al., 2001). Essa camada possui como componente principal a mucina, glicoproteína de alto peso molecular secretada por células globulares, que forma gel viscoso protetor, desviando a aderência de bactérias e prevenindo associação às células epiteliais (PITMAN & BLUMBERG, 2000). A mucosa contém ainda imunoglobulina A (Ig A), secretada por linfócitos B presentes na submucosa

(SWANK & DEITCH, 1996; WU et al., 1999). SAWAI et al. (2001), em estudo sobre os efeitos da slg A no processo de translocação bacteriana, sugeriram que essa imunoglobulina se liga diretamente à *E. coli*, impedindo a adesão à superfície epitelial. Baixas concentrações de slg A intestinal estão associadas com aumento da adesão bacteriana à mucosa (SWANK & DEITCH, 1996).

A camada celular da barreira intestinal é composta por células epiteliais, células especializadas como as globulares, os linfócitos e as células M (ALBILLOS & DE LA HERA, 2002). As células epiteliais intestinais possuem microvilosidades no ápice e filamentos em borda de escova no topo. Essa anatomia também auxilia na prevenção de adesão de patógenos (ACHESON & LUCCIOLI, 2004). A união entre os enterócitos ocorre por meio dos desmossomos, junções *oclusiva* e *gap*, que permitem a comunicação intercelular e a passagem somente de pequenas moléculas (< 11,5 Å). Estas junções excluem o transporte passivo de macromoléculas hidrofílicas não carregadas como bactérias, lipopolissacarídeos (LPS) e peptídeoglicanos (WIEST & RATH, 2003; BALZAN et al.; 2007). Essas células epiteliais desenvolveram a habilidade de comunicação com células imunológicas regionais, influenciando o crescimento, a migração e a resposta ao estímulo antigênico (PITMAN & BLUBERG, 2000).

A integridade da barreira intestinal é fundamental para a prevenção da translocação bacteriana. Em modelos experimentais de choque hemorrágico, toxinas ou lesões térmicas, ou seja, em situações de estresse, observaram-se alterações nas junções oclusivas (BERG, 1995). Danos às junções epiteliais permitem que microorganismos utilizem essas áreas afetadas como via alternativa de acesso à corrente sanguínea ou NLM (ACHESON & LUCCIOLI, 2004). Condições clínicas críticas como queimaduras, infecções bacterianas, desnutrição, redução do fluxo esplâncnico e obstrução intestinal associam-se com aumento da permeabilidade intestinal. Nessas condições, também se observam alterações nas junções intercelulares e há evidências de que dilatações nas junções oclusivas permitam maior penetração bacteriana (MACFIE, 2000).

A atrofia da barreira intestinal, observada em casos de nutrição parenteral com concomitante desuso do TGI, também tem sido apontada como um dos fatores envolvidos na translocação bacteriana (ULUSOY et al., 2003). Estudos indicam que a presença de alimento no tubo digestivo é estimulador para a manutenção da mucosa gastrintestinal. Glutamina, butirato e fibras exercem este efeito sob a mucosa (MACFIE, 2000).

O balanço entre a proliferação celular e a apoptose representa outro fator que mantém a mucosa intestinal. Se esse balanço for rompido a favor da apoptose, o resultado será atrofia intestinal e possível translocação de bactérias e endotoxinas. Desnutrição e isquemia podem acelerar a apoptose intestinal, enquanto imunonutrientes podem agir como supressores deste processo (ULUSOY et al., 2003).

3.4.2.3. Deficiência do sistema imunológico

O GALT (tecido linfóide associado à mucosa gastrintestinal) é o maior órgão imunológico do organismo, representando 25% das células da mucosa gastrintestinal. O GALT consiste em quatro compartimentos linfóides: (1) placas de Peyer e outros tecidos linfóides associados ao epitélio folicular (FAE); (2) lâmina própria; (3) linfócitos intraepiteliais e (4) NLM. Este tecido localiza-se no interior da submucosa, da lâmina própria e do epitélio (WIEST & RATH, 2003; ACHESON & LUCCIOLI, 2004).

Um importante componente do GALT é o epitélio folicular associado, cujas principais células são representadas pelas células M. Estas células não apresentam microvilosidades ou glicocálix e possuem citoplasma prolongado com extensões para o interior da lâmina própria, formando um compartimento, onde antígenos são fagocitados por macrófagos, e então penetram nas placas de Peyer (SAWAI et al., 2001). As placas de Peyer são folículos linfóides que liberam linfócitos após o processamento de antígenos (SHILS et al., 2003). Estas placas estão localizadas na porção distal do intestino delgado (KUDSK, 2002).

A lâmina própria localiza-se abaixo do epitélio folicular associado e contém grande número de linfócitos B diferenciados, linfócitos T, células dendríticas, macrófagos, mastócitos e outros leucócitos. Embora ocorra apresentação de antígeno na lâmina própria, esse compartimento é importante na prevenção da entrada e disseminação de patógenos ao longo da barreira celular (ACHESON & LUCCIOLI, 2004).

Os linfócitos intraepiteliais são representados principalmente pelos linfócitos T CD8⁺, possuindo papel importante na imunidade inata e vigilância da presença de células tumorais intestinais (PITMAN & BLUMBERG, 2000; ACHESON & LUCCIOLI, 2004).

Os NLM's e o endotélio vascular também executam importantes funções no GALT. Nesses locais, ocorrem apresentação de antígeno e articulação da resposta imunológica. Os antígenos (vírus, bactérias e macromoléculas) são transportados,

através das células M, até às células apresentadoras de antígenos (macrófagos e células dendríticas) presentes nos NLM (KUDSK, 2002). Macrófagos, células inespecíficas da resposta imunológica inata, funcionam como primeira linha de defesa contra patógenos presentes no trato gastrointestinal (TANAKA et al., 2004). Ocorre fagocitose seguida do processamento e apresentação dos antígenos aos linfócitos T. Os linfócitos T induzem a produção de citocinas TH1 e TH2. Citocinas TH1 (IL-2, INF- γ e TNF- α) estimulam a imunidade celular, resultando em ativação de macrófagos, neutrófilos e linfócitos T, principalmente linfócitos T CD8⁺. Já interleucina-4 (IL-4), interleucina-5 (IL-5), interleucina-6 (IL-6), interleucina-10 (IL-10) e interleucina-13 (IL-13), citocinas TH2, são responsáveis pela ativação de linfócitos B, e desse modo, regulam a produção de anticorpos. A Ig-A, principal imunoglobulina presente no trato gastrointestinal, é sintetizada na lâmina própria pela interação de linfócitos T e B. Citocinas TH1 inibem a síntese de Ig-A, enquanto citocinas TH2 estimulam a produção (KUDSK, 2002; SHANG et al., 2004).

A translocação bacteriana relaciona-se com diminuição da função do sistema imunológico intestinal. Estudos com pacientes sépticos demonstraram menores números de plasmócitos, Ig-A⁺ e Ig-M⁺ (imunoglobulina M⁺) na lâmina própria. Assim, propõe-se que a resposta ao estresse induzido pela septicemia resulta em queda na síntese de imunoglobulinas, reduzindo a competência imunológica e facilitando a adesão de bactérias à superfície de enterócitos, etapa inicial do processo de translocação bacteriana (MACFIE, 2000; WOODCOCK et al., 2001).

A barreira intestinal é, então, composta por mecanismos de defesa não imunológicos, como muco, células epiteliais, vilosidades e junções inter-celulares e componentes imunológicos representados essencialmente pelo GALT e síntese de IgA (BALZAN et al.; 2007).

3.4.2.4. Outros fatores envolvidos na translocação bacteriana

Tem sido demonstrado que diminuição do peristaltismo (dismotilidade), evento no estágio avançado da obstrução intestinal, está associada a translocação bacteriana em humanos e ratos (SWANK & DEITCH, 1996). Alterações nas secreções gástrica, biliar e pancreática também são fatores que podem levar à translocação bacteriana (BERG, 1995; ALBILLOS & DE LA HERA, 2002). Sais biliares inibem o crescimento bacteriano e ligam-se às endotoxinas, diminuindo desse modo a translocação (OGATA et al., 2002).

3.4.3. Mecanismos e patogênese

A translocação bacteriana ocorre em três estágios, segundo BERG (1995). No primeiro estágio, a bactéria normalmente não atinge outros órgãos permanecendo restrita aos NLM. A migração transcelular ocorre por meio da captação bacteriana pelos enterócitos apicais, seguida de internalização por vacúolos citoplasmáticos. (MACFIE, 2000). A translocação da *E. coli* e de endotoxinas ocorre através dos enterócitos, mesmo estas células estando intactas. A via paracelular representa outra via de translocação, sendo observada quando ocorrem lesões nas junções epiteliais (BALZAN et al.; 2007). Macrófagos, sIgA, linfócitos T (CD4⁺ e CD8⁺) e outros leucócitos estão posicionados estrategicamente para reduzir a translocação. Em situações de translocação bacteriana em níveis fisiológicos, o hospedeiro não apresenta sinais e sintomas clínicos de infecção. Contudo, as conseqüências podem ser mais graves quando ocorre colonização por formas mais virulentas de bactérias exógenas. No segundo estágio, a bactéria alcança outros órgãos como fígado, baço e rins. Esse estágio relaciona-se principalmente com o grau de eficiência do sistema imunológico do hospedeiro. A combinação dos mecanismos da translocação bacteriana leva ao terceiro estágio, no qual a bactéria atinge a cavidade peritoneal e a corrente sanguínea. Nesse estágio, a recuperação do individuo dependerá do nível do crescimento e da virulência bacteriana, eficiência do sistema imunológico e extensão da lesão à mucosa intestinal.

3.4.4. Prevenção e terapia

Uma diversidade de estratégias tem sido investigada para o tratamento da translocação bacteriana. Estudos recentes compararam o uso de dietas enterais enriquecidas com imunonutrientes (ω -3, glutamina e arginina), probióticos e fibras, como forma de manutenção da integridade da mucosa e prevenção da translocação bacteriana (ULUSOY et al., 2003, WIEST & RATH, 2003). ZULFIKAROGLU et al. (2003) relataram menor atrofia das vilosidades intestinais e redução da translocação bacteriana em modelo de icterícia obstrutiva. Segundo esses autores, o fator que contribuiu para esses resultados foi a suplementação da dieta com glutamina, arginina, ω -3 e RNA, durante os períodos pré e pós-operatório. Dietas enriquecidas com óleo de peixe preservaram fluxo sanguíneo intestinal e aumentaram a capacidade de defesa em modelos de translocação bacteriana (WIEST & RATH, 2003).

Dietas enterais que possuíam glutamina na formulação resultaram em lesões intestinais e perda de peso menos intensas, melhoraram balanço nitrogenado e reduziram translocação bacteriana em modelo de colite (YAMAUCHI et al., 2002).

Probióticos, como *Bifidobacteria* reduziram a translocação bacteriana em modelo de choque hemorrágico (RUAN et al.; 2007). SEEHOFER et al. (2003) observaram menor taxa de translocação bacteriana em modelos de ressecção hepática parcial e anastomose de cólon, cuja dieta foi enriquecida com probióticos. A administração prévia do *Saccharomyces cerevisiae* também reduziu a translocação em animais submetidos à obstrução intestinal (GENEROSO et al.; 2011).

Fibras como pectina e inulina, não absorvidas pela mucosa intestinal, são fermentadas pela microbiota do cólon, produzindo ácidos graxos de cadeia curta, como ácidos acético, butírico e propiônico. Estes ácidos graxos, em especial o ácido butírico, estimulam o crescimento da mucosa intestinal, reduzem a translocação e estimulam o sistema imunológico intestinal em pacientes cirúrgicos (RAYES et al., 2002).

Suplementação de arginina levou à produção de IL-2 e estimulação de mitoses em linfócitos, macrófagos e células NK, estimulando a função imunológica após a indução de septicemia (YAMAUCHI et al., 2002). Em outro modelo experimental de septicemia, a arginina elevou o número de placas de Peyer e a secreção de IgA (SHANG et al., 2004). Após radiação, o uso deste aminoácido apresentou efeitos protetores sob mucosa intestinal, prevenindo a translocação bacteriana e a perda de peso (CHAN et al., 2003).

Entretanto, tratamento da doença de base é a estratégia mais efetiva contra a translocação bacteriana (WIEST & RATH, 2003).

3.5. Obstrução intestinal

3.5.1. Considerações gerais

Obstrução intestinal é interrupção total ou parcial do fluxo do conteúdo intestinal devida a obstáculo mecânico ou à interferência de mecanismo funcional, podendo ocorrer súbita ou progressivamente (DANI & CASTRO, 1993). Pode ocorrer em qualquer nível intestinal, embora seja mais freqüente no intestino delgado, principalmente no íleo distal, em virtude da luz mais estreita (DANI & CASTRO, 1993; COTRAN et al., 1999).

A obstrução intestinal mecânica, também denominada íleo mecânico (DANI & CASTRO, 1993), é provocada por barreira física que impede a progressão do conteúdo intestinal (FILHO, 2000). As principais causas são: aderências consequentes a operações ou inflamações prévias; vôlvulo; hérnias; tumores benignos ou malignos e; inflamações como enterite regional, diverticulite e doença de Crohn (FAUCI et al., 1998; COTRAN et al., 1999; FILHO, 2000). A obstrução intestinal funcional caracteriza-se por parada da atividade neuromuscular da parede intestinal, levando a distensão acentuada do intestino por acúmulo de fezes e líquidos (FAUCI et al., 1998). As alças tornam-se distendidas e edemaciadas, dificultando o retorno venoso (FILHO, 2000).

As manifestações clínicas variam de acordo com a causa, o modo de instalação, o local e o grau da obstrução. As mais comuns são dor, vômitos, constipação, fraqueza, desidratação e distensão abdominal (DANI & CASTRO, 1993; FAUCI et al., 1998; FILHO, 2000).

3.5.2. Fisiopatologia

A distensão intestinal é causada pelo acúmulo de líquidos e gases deglutidos e produzidos próximo ao segmento obstruído e por todo o intestino, dependendo da duração desse fenômeno. O ar deglutido é rico em N_2 , gás não absorvido pela mucosa intestinal, e H_2 . O metano (CH_4) é produzido por bactérias do cólon e, possivelmente, pela microbiota alterada do delgado, devida à obstrução. O acúmulo de líquido deve-se ao líquido ingerido, à saliva deglutida, ao suco gástrico, às secreções biliar e pancreática e à secreção aumentada de água e eletrólitos, principalmente sódio. A pressão intraluminal se eleva, causando danos à vascularização (DANI & CASTRO, 1993). A diminuição da perfusão resulta em menor oferta de O_2 à mucosa intestinal. Conseqüentemente, ocorre isquemia que pode evoluir com necrose da alça intestinal, dependendo do período e do grau da hipoperfusão. Observa-se também aumento da permeabilidade intestinal que pode levar à invasão bacteriana e peritonite (SWANK & DEITCH, 1996; FAUCI et al., 1998). Ainda, durante a hipoperfusão, ocorre acidose da mucosa devido ao aumento da concentração de CO_2 . A acidose também se relaciona positivamente com aumento da permeabilidade intestinal (WIEST & RATH, 2003). A Figura 10 ilustra a fisiopatologia da obstrução intestinal.

DEITCH (1989) demonstrou que a obstrução intestinal promove aumento da translocação para os NLM, mesmo na ausência de focos de infecção intra-abdominais. A incidência da translocação bacteriana em pacientes que apresentaram obstrução

intestinal (59%) foi significativamente maior do que a incidência entre pacientes que não apresentavam tal enfermidade (4%). Crescimento bacteriano, aumento da permeabilidade intestinal e/ou alteração da barreira mucosa foram relacionados com a translocação bacteriana.

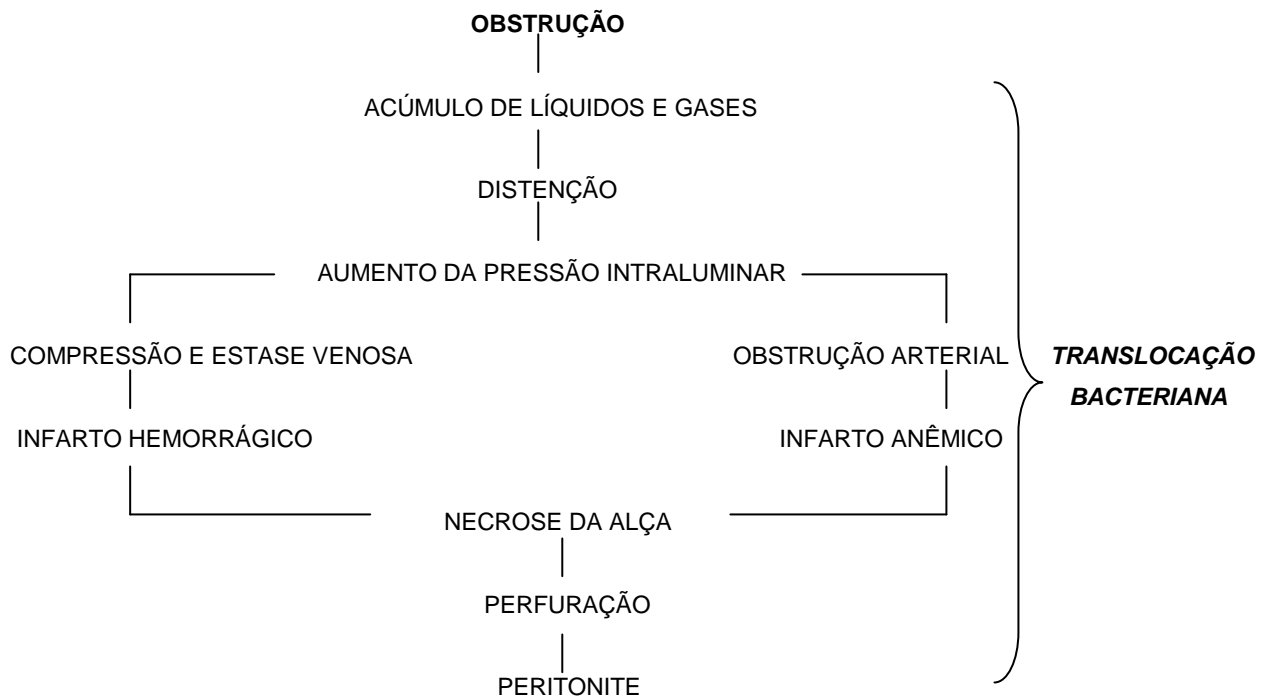


Figura 10: Fisiopatologia da obstrução intestinal. Alterações locais (DANI & CASTRO, 1993).

3.6. Isótopo radioativo

O ^{99m}Tc (tecnécio-99m) é um radionúcleo artificial originado da desintegração radioativa de um elemento radioativo (99molibdênio), isótopo proveniente da fissão nuclear do urânio (DINIZ et al., 2005).

O, ^{99m}Tc reage principalmente com grupos doadores de elétrons como aminas, amidas, tióis, sulfidrilas e isonitrilas, por ser metal deficiente em elétrons. Na marcação de bactérias, o mais provável é que o ^{99m}Tc reaja principalmente com estruturas proteicas, já que estas possuem grupos doadores de elétrons. Esta reação pode ocorrer com proteínas que constituem a parede celular bacteriana e/ou com proteínas citoplasmáticas (DINIZ et al., 2005).

Observou-se que após o procedimento de marcação, a célula bacteriana permanece preservada. Estudos relacionados à viabilidade da bactéria não indicaram diferenças significativas no crescimento em meio de cultura e nas unidades formadoras de colônias da ^{99m}Tc - *E.coli* e *E. coli* controle (DINIZ et al., 2005).

CAPÍTULO I

O PAPEL DA ARGININA E DA ÓXIDO NÍTRICO SINTASE SOBRE A PERMEABILIDADE INTESTINAL E A TRANSLOCAÇÃO BACTERIANA EM MODELO EXPERIMENTAL DE OBSTRUÇÃO INTESTINAL

RESUMO

Introdução: A arginina tem importante papel imunológico e trófico em condições de estresse. Os metabólitos óxido nítrico (ON) e poliaminas estão envolvidos nestas atividades da arginina. Assim, o objetivo deste trabalho foi determinar os efeitos da arginina, um precursor da síntese de ON, e da óxido nítrico sintase induzida (iNOS) sobre a permeabilidade intestinal e a translocação bacteriana em modelo experimental de obstrução intestinal (OI) induzida por ligadura simples.

Material e Métodos: Animais machos C57BL6/J *wild-type* (WT) e C57BL6/J iNOS *knockout* (iNOS^{-/-}) foram separados aleatoriamente em seis grupos. Grupos Sham e Sham^{-/-} (ração comum e ausência de obstrução intestinal), OI e OI^{-/-} (ração convencional + OI), Arg e Arg^{-/-} (ração suplementada com arginina + OI). Após sete dias de tratamento com ração convencional ou suplementada, OI foi induzida e a permeabilidade intestinal e translocação bacteriana foram avaliadas. Porções do intestino delgado e fluido intestinal foram recolhidos para análises histopatológica e morfométrica e determinação da concentração de poliaminas, respectivamente.

Resultados: Pré-tratamento com arginina manteve a permeabilidade intestinal ($p > 0,05$; grupos Arg e Arg^{-/-} versus grupos Sham e Sham^{-/-}), elevou a concentração de poliaminas no fluido intestinal ($p < 0,05$; grupo Arg versus grupo OI) e reduziu a translocação bacteriana em animais WT (grupo Arg versus OI). A ausência da iNOS também esteve associada a papel protetor em relação à permeabilidade intestinal, o que não foi observado em relação à translocação bacteriana.

Conclusões: A suplementação de arginina e a síntese de ON pela iNOS são importantes fatores em reduzir a translocação bacteriana. Contudo quando a permeabilidade intestinal é considerada, ON via iNOS possui efeito danoso.

Palavras chaves: Arginina, óxido nítrico sintase induzida, poliaminas, translocação bacteriana, permeabilidade intestinal, obstrução intestinal.

ABSTRACT

Background: Arginine has been shown to have several immunological and trophic properties under stressful situations. Its metabolites, NO and polyamines, are related to role of arginine. Thus, the aim of this study was to determine the effects of the NO donor L-Arginine, and the role of inducible NO synthase (iNOS) on intestinal permeability and bacterial translocation in a model of intestinal obstruction (IO) induced by a simple knot in the terminal ileum.

Material and Methods: Male C57BL6/J *wild-type* (WT) and iNOS *knockout* (iNOS^{-/-}) mice were randomized into 6 groups: Sham and Sham^{-/-} (standard chow), IO and IO^{-/-} (standard chow +IO) and Arg and Arg^{-/-} (standard chow supplemented with arginine + IO). After seven days of treatment with standard or supplemented chows, IO was induced and intestinal permeability and bacterial translocation were evaluated. The small intestine and its contents were harvested for histopathological and morphometric analysis and the determination of polyamine concentration.

Results: Pre-treatment with arginine maintained intestinal permeability ($p>0.05$; Arg and Arg^{-/-} groups versus Sham and Sham^{-/-} groups), increased polyamine concentration in intestinal content ($p<0.05$; Arg versus IO group) and decreased bacterial translocation in WT animals (Arg group versus IO group). Absence of iNOS also presented a protective effect on permeability, but not on bacterial translocation.

Conclusions: Arginine supplementation and synthesis of NO by iNOS are important factors in decreasing bacterial translocation. However, when intestinal permeability was considered, NO had a detrimental role.

Key words: Arginine, inducible nitric oxide, polyamines, bacterial translocation, intestinal permeability, intestinal obstruction.

1. INTRODUÇÃO

Arginina, aminoácido condicionalmente essencial, tem ganhado importante interesse devido às propriedades fisiológicas, funcionais e imunológicas. Arginina estimula a secreção de hormônios anabólicos como hormônio do crescimento, prolactina e insulina, que possuem como atividade comum o estímulo à síntese proteica e o processo de cicatrização (FAN et al.; 2010). Estudos experimentais demonstraram que a arginina também atua na imunidade celular e humoral, especialmente em condições catabólicas (TAN, 2009; De JONGE et al.; 2002).

Arginina proveniente de proteínas da dieta é metabolizada pelos enterócitos e é responsável por diversas funções no intestino em situações de estresse e trauma. Em modelos de enterocolite necrosante, arginina minimizou lesões intestinais. Arginina também apresentou papel protetor sobre a mucosa intestinal em modelo de endotoxemia, por meio da elevação da proliferação dos enterócitos e preservação das vilosidades (SUKHOTNIK ET al. 2004). Ainda, dieta enriquecida com arginina protegeu a mucosa em modelo de enterite induzida por radiação, reduzindo a translocação bacteriana (ERSIN et al. 2000; GURBUZ et al. 1998).

Muitos destes efeitos da arginina estão associados aos metabólitos ON e poliaminas. O ON é uma pequena molécula sintetizada a partir da arginina por família de óxido nítrico sintases (NOS). As isoformas endotelial (eNOS) e neuronal (nNOS) são continuamente expressas, enquanto a isoforma induzida (iNOS) é expressa principalmente em resposta a estímulos inflamatórios como citocinas e LPS (XIE et al., 2008). ON é importante sinalizador intra e intercelular envolvido na regulação de mecanismos fisiológicos e patológicos (AKTAN, 2004). A síntese basal de óxido nítrico mantém a perfusão, regula a permeabilidade intestinal e minimiza a disfunção da barreira intestinal após isquemia (KUBES & McCAFFERTY, 2000; NAITO et al. 2004). Entretanto, apesar de ter os efeitos biológicos bem estabelecidos, a função do óxido nítrico durante septicemia e estresse é controversa. A indução da iNOS por citocinas pró-inflamatórias resulta em elevação da síntese de óxido nítrico que pode contribuir para hipotensão e ausência de resposta a constritores vasculares (JIA et al.; 2006). Assim, uma variedade de estudos experimentais envolvendo tanto animais *knockout*, como com inibidores seletivos e não seletivos têm sido realizados para avaliação da função do óxido nítrico nestas condições. Alguns indicaram benefícios em inibir a iNOS (UNNO et al.; 1997; Strunk et al.; 2001; HERHOLZER et al., 2003; BAROCELLI et al., 2006; KATADA et al.; 2009). Contudo, resultados negativos também foram obtidos

(DAHM et al; 1999; SASAKI et al.; 2003; VALLANCE et al.; 2004; PETERSSON et al.; 2007). Tratamento de animais endotoxêmicos com inibidor específico para iNOS preveniu a acidose, restaurou a pressão arterial e impediu disfunção da mucosa intestinal (UNNO et al.; 1997; STRUNK et al.; 2001). Em modelo de isquemia/reperfusão, a inibição seletiva da iNOS também mostrou efeitos positivos como redução do edema, do rolamento e da adesão leucocitárias e resultou em atenuação da lesão à mucosa intestinal (HERHOLZER et al., 2003; BAROCELLI et al., 2006; KATADA et al., 2009). Por outro lado, animais iNOS^{-/-} apresentaram aumento da inflamação e de lesões da mucosa intestinal em modelo de colite (SASAKI et al.; 2003; VALLANCE et al.; 2004). Já a inibição não seletiva da NOS foi associada à redução do fluxo sanguíneo mesentérico em modelos de colite e septicemia (DAHM et al; 1999; PETERSSON et al.; 2007). A discrepância dos resultados pode ser explicada pelos diferentes modelos experimentais, tipo, concentração e período de uso do inibidor utilizado (PEDOTO et al.; 1999).

Outro grupo de metabólitos oriundos do metabolismo da arginina são as poliaminas. As poliaminas são compostos alifáticos com grupos aminos distribuídos ao longo da estrutura. Putrescina, espermidina e espermina são alguns exemplos. As poliaminas são sintetizadas a partir da ornitina em reação catalizada pela ornitina-decarboxilase. A arginina é um dos aminoácidos que origina a ornitina por meio da arginase. Há evidências de que as poliaminas são necessárias para o crescimento e reparo da mucosa gastrintestinal (LARQUÉ et al.; 2007).

Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos da arginina e da iNOS, por meio de animais iNOS^{-/-}, sobre a permeabilidade intestinal, translocação bacteriana e síntese de poliaminas em modelo de obstrução intestinal. A obstrução intestinal leva a infiltração de células mononucleares, edema e síntese de citocinas, mediadores inflamatórios e ON, elevando a permeabilidade intestinal. Para evitar os efeitos da inibição não seletiva das NOSs, foram utilizados animais iNOS^{-/-} para avaliação da síntese de ON via iNOS.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Animais

Camundongos da linhagem C57BL6/J *wild type* (WT) e iNOS *knockout/J* (iNOS^{-/-}) foram fornecidos pelo biotério do ICB (Instituto de Ciências Biológicas) da UFMG (Universidade Federal de Minas Gerais). Animais machos de 4 a 5 semanas com peso

entre 16g e 20g foram usados neste estudo. Todos os animais foram mantidos em caixas plásticas em ambiente com temperatura, ciclo claro/escuro e umidade controlados. Este estudo foi aprovado pelo Comitê Ético de Experimentação Animal da universidade Federal de Minas Gerais (Anexo 1)

2.2. Protocolo Experimental

Os animais foram distribuídos aleatoriamente em 6 grupos: Grupos Sham e Sham-/-: Animais C57BL6/J WT ou C57BL6/J iNOS-/- que receberam ração convencional e não foram submetidos à obstrução intestinal. Grupos OI e OI-/-: Animais C57BL6/J WT ou C57BL6/J iNOS-/- que receberam ração convencional e foram submetidos à obstrução intestinal. Grupos Arg e Arg-/-: Animais C57BL6/J WT ou C57BL6/J iNOS-/- que receberam diariamente ração suplementada com arginina na dose de 100mg/dia e que foram submetidos à obstrução intestinal. As rações convencional e suplementadas foram isocalóricas e isoproteicas. Água foi ofertada *ad libitum*. Os animais receberam ração convencional ou suplementada durante sete dias antes da indução da obstrução intestinal. Ingestão calórica, proteica e peso corporal foram monitorados e calculados diariamente a partir do consumo das rações convencional e suplementada com arginina. A distribuição dos grupos é apresentada na figura abaixo:

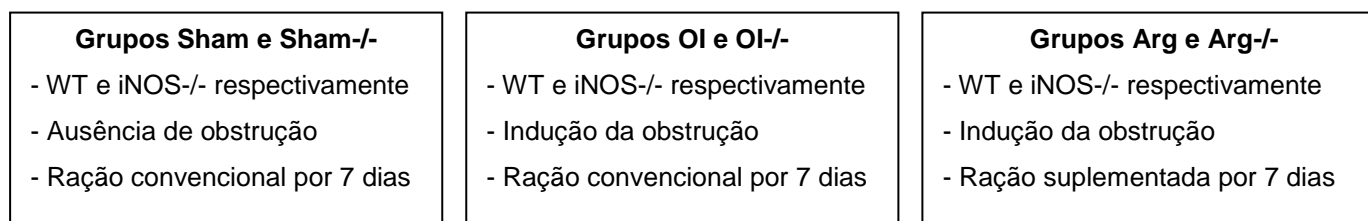


Figura 11: Esquema do delineamento experimental (Capítulo I).

2.3. Preparo da dieta suplementada com arginina

Foram utilizados os seguintes ingredientes nas respectivas proporções, para o preparo da dieta suplementada com arginina:

- Ração convencional triturada – 74,00%
- Arginina – 3,50%
- Gelatina em pó incolor (a base de colágeno) – 3,50%
- Amido – 16,00%
- Óleo de soja – 3,00%

- Água – qsp (quantidade suficiente para)

Inicialmente, a ração triturada e peneirada foi homogeneizada à arginina. Em seguida, foram acrescentados gelatina em pó incolor (dissolvida em água destilada previamente aquecida), amido (dissolvido em água destilada à temperatura ambiente) e óleo de soja. O acréscimo de amido de milho e óleo de soja não tinha como objetivo nenhuma função nutricional específica. Apenas garantiu que as rações convencional e suplementada se mantivessem isocalóricas e isoproteicas. Todos os ingredientes foram intensamente homogeneizados até formação de massa uniforme. Água destilada foi acrescentada conforme necessidade. A massa obtida foi subdividida em pequenos cilindros, similares à forma da ração tradicional. Estes cilindros sofreram secagem em estufa a 45°C por oito horas (Série D, Nova Ética, SP, BR) (ABREU, 2005). Após secagem, a ração obtida foi pesada e ofertada aos animais, de modo que o consumo diário de arginina fosse de 100 mg. Esta dosagem de arginina corresponde a 3,5% na ingestão calórica diária (VIANA et al. 2010). Diariamente, a ração suplementada contendo 100mg de arginina era colocada para os animais no início da manhã. Após seu consumo, a ração convencional era liberada *ad libitum*.

2.4. Procedimento cirúrgico e indução da obstrução intestinal

Durante 7 dias, os animais dos grupos Sham, Sham-/-, OI e OI-/- receberam ração convencional, enquanto os grupos Arg e Arg-/- foram alimentados com ração suplementada com arginina + ração convencional. Após este período, os animais foram pesados e anestesiados intraperitonealmente com solução de cloridrato de xilazina (Dopaser®) e cloridrato de ketamina (Dopalen®) nas concentrações de 8 mg/Kg e 60mg/kg, respectivamente. A operação para promoção da obstrução intestinal foi realizada conforme proposto por SALVALLAGIO et al. (2002). Incisão mediana de aproximadamente 2cm foi feita no abdome, com exposição do íleo terminal e ceco. Em seguida, o íleo terminal sofreu ligadura com ligadura simples (fio de nylon 5.0, BRASURE, São Paulo, Brasil) a 0,5 cm da válvula íleo-cecal. Finalizando o procedimento, foi realizada a sutura da camada muscular abdominal (ponto simples contínuo) com fio de sutura catgut 4.0 e da pele (ponto simples separado) com fio de nylon. Todos os grupos passaram pelo mesmo processo. Deve-se ressaltar que os grupos Sham e Sham-/- não sofreram ligadura do íleo terminal, sendo submetidos apenas ao estresse cirúrgico da abertura do abdome e manipulação das alças.

2.5. Permeabilidade intestinal

O experimento de avaliação da permeabilidade intestinal contemplou animais que foram separados em 6 grupos de 15 animais como descrito anteriormente. Cada grupo foi posteriormente subdividido em 3 grupos de 5 animais cada.

Marcação do ácido dietilenotriaminopentacético (DTPA) com ^{99m}Tc -Tecnécio: Atividade correspondente a 5mCi foi adicionada a 10g de DTPA previamente liofilizado. Em seguida, a solução foi incubada a 37°C por 15 minutos. Para avaliação do rendimento de marcação do fármaco, foi realizada radio-cromatografia em papel filtro, com uso de acetona como solvente. Após migração do solvente para a porção superior, a fita foi dividida em 2 partes, uma superior e uma inferior. Foi realizada contagem de ambas as partes e o rendimento de marcação do DTPA foi calculado por meio da seguinte relação:

$$\% \text{ Marcação} = \frac{\text{Contagem parte superior (cpm)}}{\text{Contagem parte superior (cpm)} + \text{contagem parte inferior (cpm)}} \times 100$$

Avaliação da permeabilidade intestinal: Após sete dias de tratamento com rações convencional ou suplementada com arginina, volume de 0,1 mL de ^{99m}Tc -DTPA foi administrado por gavagem a todos os grupos. Após 90 minutos, os animais foram submetidos a obstrução intestinal, conforme item 2.4. Este período entre a gavagem e a indução da obstrução corresponde ao tempo de esvaziamento gástrico. Após 90 minutos, observou-se que o ^{99m}Tc -DTPA deixa o estômago e alcança a porção intestinal. Após 4, 8 e 18 horas da operação, os animais foram anestesiados e 500 µL de sangue foram coletados para determinação da radioatividade. Amostra da dose administrada aos animais foi considerada com padrão de dose. Os resultados foram expressos em % dose (DINIZ, 1999), conforme a relação abaixo:

$$\% \text{ Dose} = \frac{\text{Contagem amostra (cpm)}}{\text{Contagem do Padrão (cpm)}} \times 100$$

2.6. Translocação bacteriana

Cultivo e preparação da Escherichia coli: Bactéria *Escherichia coli* (ATCC-10536), não patogênica, fornecida pelo Laboratório de controle de Qualidade Biológico da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais foi cultivada. De uma cultura-mãe de *E. coli* foi feito o repique em agar tripticaseína (Merck). Após 18 a 20 horas de crescimento a 37°C, a bactéria foi transferida, com auxílio de alça de platina, para solução salina esterilizada. A concentração bacteriana foi ajustada espectrofotometricamente em 31% de transmitância a 580nm (espectrofotômetro COLEMAN JUNIOR II) correspondente a 10⁸ unidades formadoras de colônia por mL (UFC/mL) (DINIZ et al., 2005).

Marcação da E.coli com 99m Tc: Alíquotas de 2,0mL da suspensão bacteriana, foram incubadas a 37 °C com 1,0mL de solução de cloreto estânico a 580µM (1,3mg/mL), pH 7,0, por 10 minutos (SnCl₂ – Sigma). Após este período, 37MBq a 55,5MBq de ^{99m}tecnécio na forma de Na^{99m}TcO₄ (pertecnato de sódio), obtidos de gerador de ⁹⁹molibdênio/^{99m}tecnécio (IPEN/CNEM, São Paulo, Brasil) foram adicionados a cada preparação e mantidos a 37 °C por mais 10 minutos. Os tubos foram centrifugados a 3000 rpm durante 25 minutos (centrífuga FANEN, São Paulo, Brasil) e alíquota de 100µL do sobrenadante foi retirada para a determinação da radioatividade. O precipitado foi re-suspenso em 3,0mL de salina esterilizada e, em seguida, foi retirada alíquota de 100µL para contagem da radioatividade em cintilador de poço automático (ANSR, Abbot, EUA). Este procedimento foi repetido por três vezes (DINIZ et al., 2005). A porcentagem de Na^{99m}TcO₄ incorporado às células bacterianas foi determinada do seguinte modo:

$$\% \text{ marcação} = \frac{\text{cpm (precipitado)}}{\text{cpm (precipitado + sobrenadante)}} \times 100$$

sendo cpm = contagem por minuto.

Avaliação da translocação bacteriana: os animais foram separados em 6 grupos de 8 animais como descrito. Após 7 dias de tratamento com as rações convencional e suplementada com arginina, 0,1 mL da suspensão contendo 1.8MBq de ^{99m}Tc-E. coli foi administrado por gavagem a todos os grupos. Decorridos 90 minutos, os animais foram operados como descrito anteriormente. Dezoito horas após, os animais foram

eutanasiados e sangue, nódulos linfáticos mesentéricos (NLM), fígado, baço e pulmão foram removidos e pesados para determinação da radioatividade em cintilador de poço (ANSR- Abbott, Chicago, IL, USA). Os resultados foram expressos em contagem por minuto/g de tecido (cpm/g)

2.7. Análises histológica e morfométrica

Foram examinadas as regiões intestinais de 4 cm correspondentes à área imediatamente proximal à intervenção associada à obstrução, 18 horas após o procedimento. As amostras foram acondicionadas em solução de formol a 4%. No momento da análise, as amostras foram embebidas em parafina, cortadas em fragmentos de 4-5 μm e coradas com hematoxilina e eosina. Os cortes foram então analisados em microscópico óptico em aumentos de 4, 10 e 20x.

Para a quantificação do edema, as imagens foram analisadas utilizando-se o programa "KS 300" (Zeiss, German). As áreas edemaciadas e a área total foram mensuradas (μm^2) e, em seguida, a porcentagem da área de edema foi calculada:

$$\% \text{Área edemaciada} = \text{Área edemaciada} (\mu\text{m}^2) \times 100 / \text{Área Total} (\mu\text{m}^2).$$

2.8. Determinação de poliaminas no fluido intestinal

A níveis de poliaminas putrescina, espermidina e espermina no fluido intestinal foi mensurada por cromatografia líquida de alta eficiência por pareamento de íons (HPLC) como descrito por VALE & GLÓRIA (1997). O intestino delgado dos diferentes grupos de animais foi removido, os conteúdos pesados e lavados com solução salina tamponada, pH 7,2, na proporção de 500 mg do conteúdo/ 2,0 mL de PSB (solução salina tampão fosfato). Depois de centrifugados a 2.000g por 30 minutos, os sobrenadantes foram recolhidos e congelados a -70°C , até à determinação da concentração de poliaminas. Foram utilizados cinco animais por grupo.

2.9. Análises estatísticas

Inicialmente, foi realizado teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov. Em seguida, procedeu-se à análise dos dados. Ganho de peso, ingestão calórica, proteica, concentração de poliaminas no fluido intestinal, permeabilidade intestinal e área de edema em relação à área total foram analisados por meio de ANOVA e Teste de

Tukey. Os resultados foram expressos como média \pm DP (desvio padrão). Os resultados obtidos referentes à translocação bacteriana foram analisados pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis e teste de Dunn. Os resultados foram expressos como mediana.

As comparações entre os grupos foram realizadas simultaneamente. As diferenças foram consideradas significativas se $p < 0,05$. Foi utilizado o programa “GraphPad Prism”, versão 5.

A metodologia deste trabalho está resumida na figura abaixo.

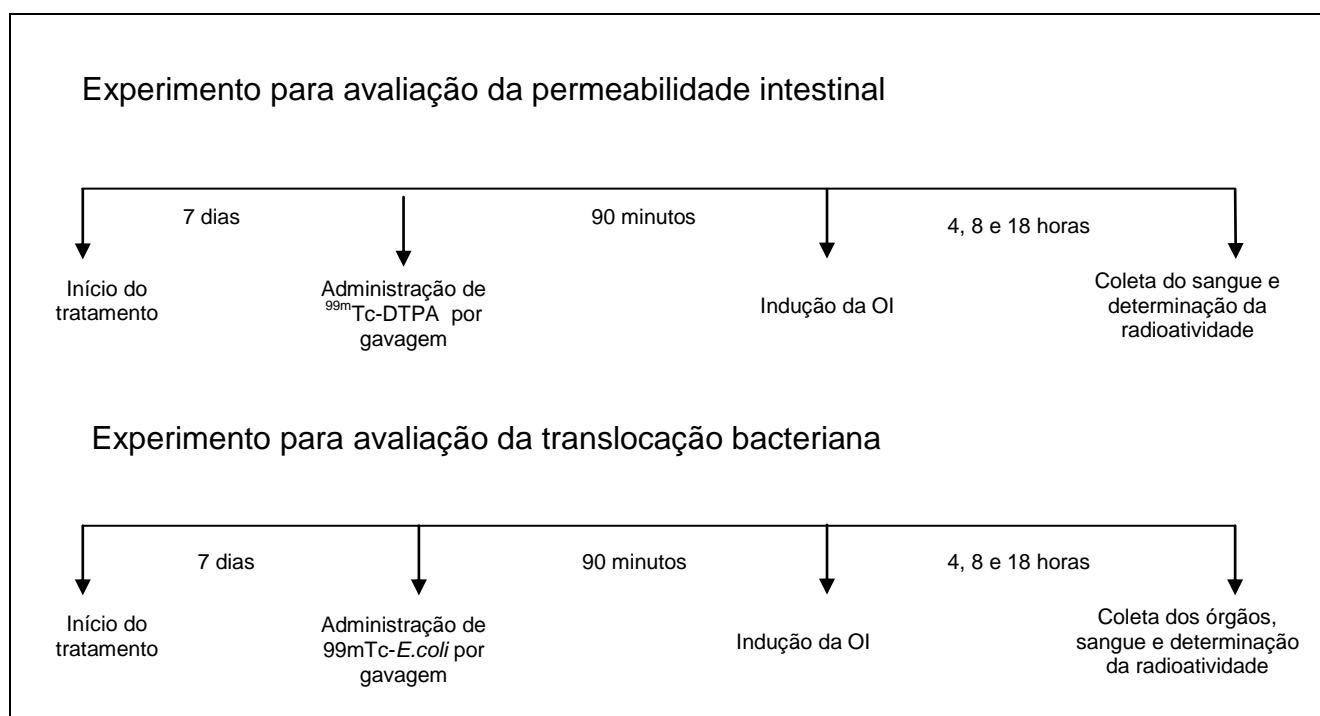


Figura 12: Resumo da metodologia experimental (Capítulo I).

3. RESULTADOS

3.1. Ganho de peso, ingestão calórica e proteica

Não houve diferenças significativas no ganho de peso, ingestão calórica e proteica entre os grupos (Tabela 1).

Tabela 1: Ganho de peso, ingestão calórica e proteica

	Sham	OI	Arg	Sham-/-	OI-/-	Arg-/-
Ganho de peso (g)	3,34± 0,95	3,36 ±1,17	2,43±0,87	2,88 ±0,35	3,09± 0,59	2,56 ±0,75
Ingestão calórica (cal)	10,65± 0,99	10,91± 1,40	11,53± 0,59	11,25± 0,56	11,10±0,75	11,73± 0,71
Ingestão proteica (g)	0,74± 0,07	0,76± 0,10	0,80 ±0,04	0,78 ±0,05	0,77±0,05	0,81± 0,05

Dados expressos como média ± desvio padrão; n=8. Não houve diferenças significativas entre os grupos ($p>0,05$).

3.2. Permeabilidade intestinal

O rendimento médio de marcação do DTPA com 99m tecnécio foi de 98,75% ± 0,58 sendo (n=6).

A Figura 13 mostra a dinâmica da permeabilidade intestinal 4, 8 e 18 horas após a indução da obstrução intestinal. Os grupos Sham, Sham-/- e Arg não apresentaram nenhuma alteração na permeabilidade intestinal ($p\geq 0,05$). Os grupos OI-/- e Arg-/- tiveram significativo aumento da permeabilidade. No grupo OI-/-, essa elevação inicia-se no tempo de 4 horas e permanece constante até o tempo de 8 horas. No grupo Arg-/-, o aumento da permeabilidade intestinal se inicia no tempo de 8 horas, embora o aumento não tenha sido estatisticamente significativo. Após 18 horas, a permeabilidade destes dois grupos retorna a patamares observados nos grupos Sham, Sham-/- e Arg. Finalmente, a permeabilidade intestinal do grupo OI se mostrou elevada após 4, 8 e 18 horas da indução da obstrução.

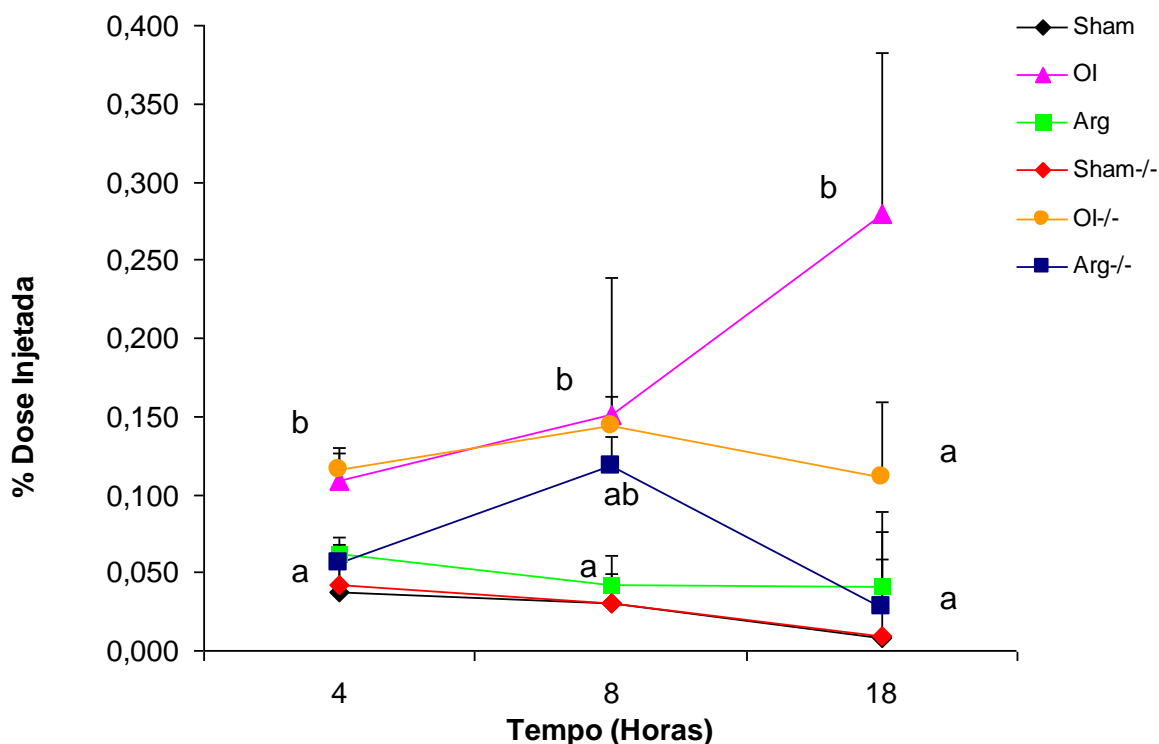


Figura 13: Comportamento dos animais em relação à permeabilidade intestinal 4, 8 e 18 horas após a indução da obstrução intestinal. Barras de erro mostram o desvio padrão (DP). Dados foram expressos como % dose injetada média \pm DP (n=5). Comparações entre os diferentes grupos foram realizadas simultaneamente. Diferentes letras, em cada tempo, significam diferença estatística (p<0,05).

3.3. Análises histológica e morfométrica

Os grupos Sham e Sham-/- (Figura 14 A e B) não apresentaram alterações morfológicas significativas entre si. Também não houve diferença estatisticamente significativa entre a porcentagem de área de edema entre estes grupos ($3,17 \pm 0,35\%$ e $4,16 \pm 1,30\%$ respectivamente; Tabela 2). Os grupos OI e OI-/- (Figura 14 C e D) apresentaram alterações na integridade da parede, principalmente na área adjacente à obstrução intestinal. Inflamação e aumento do número de células polimorfonucleares foram observados nesta proximidade. A porcentagem da área edemaciada foi significativamente mais elevada em ambos grupos ($39,12 \pm 3,21\%$ e $33,63 \pm 3,78\%$ respectivamente) em relação aos grupos Sham e Sham-/. Contudo, o grupo OI -/- exibiu melhor integridade da camada epitelial quando comparado ao grupo OI. A suplementação com arginina protegeu parcialmente a parede intestinal. Os grupos Arg e Arg-/- (Figura 14 E e F) exibiram sinais de redução da inflamação e da congestão das camadas submucosa e muscular, assim como apresentaram melhor regeneração. A porcentagem da área de edema também foi estatisticamente menor nos grupos tratados com arginina ($10,04 \pm 2,37\%$ no grupo Arg e $18,66 \pm 2,14\%$ no grupo Arg-/-). Contudo, edema e congestão foram mais visíveis no grupo Arg-/-.

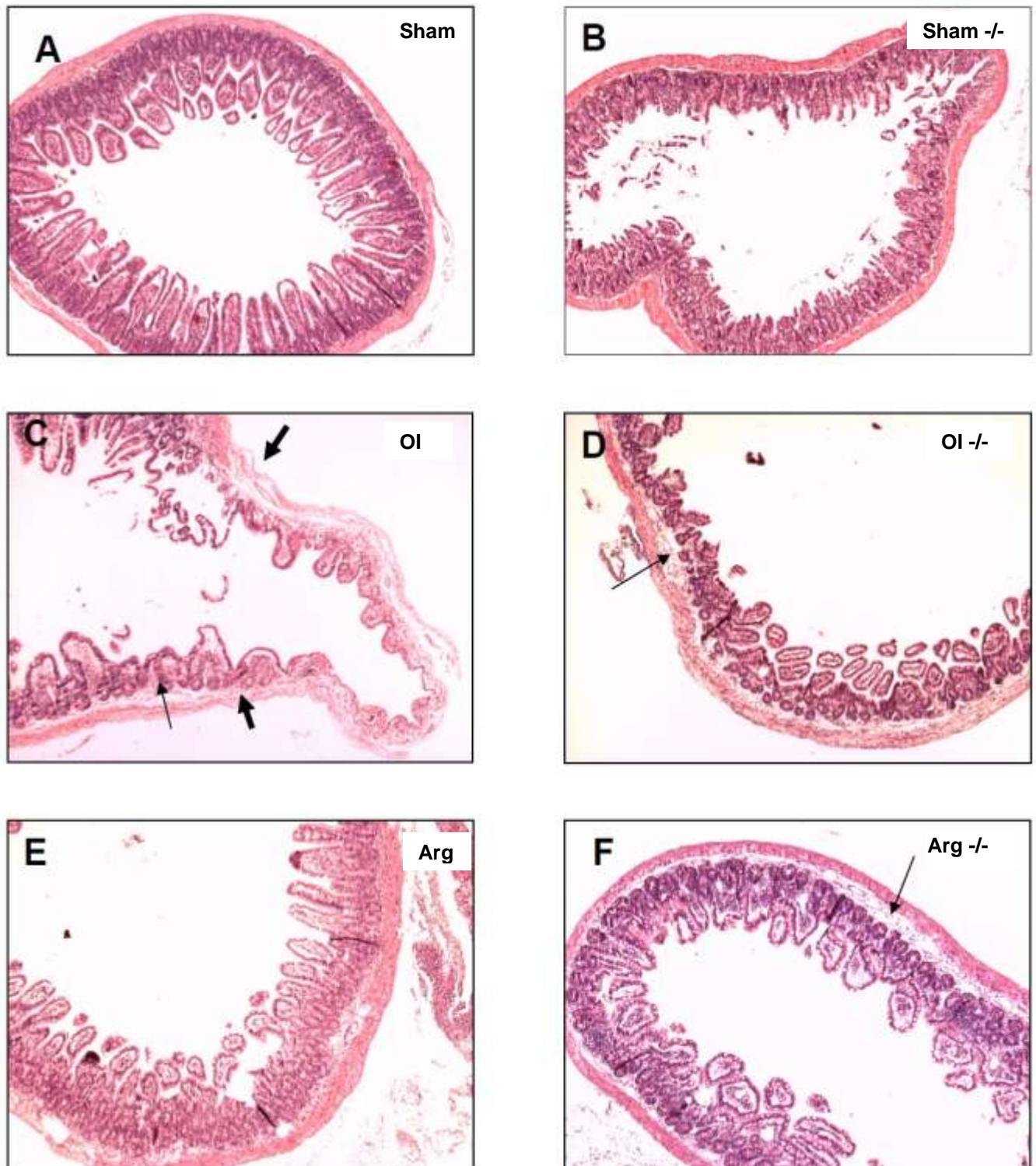


Figura 14: Aspectos histopatológicos representativos da parede da porção final do intestino delgado (íleo terminal) de animais WT e iNOS $-/-$. Letras A e B representam os grupos Sham e Sham $-/-$ respectivamente com integridade da parede intestinal. As letras C e D representam os grupos OI e OI $-/-$ respectivamente, mostrando edema e aumento de células mono e polimorfonucleares (setas em C). No grupo OI $-/-$, nota-se melhor integridade da camada epitelial. As letras E e F ilustram os grupos Arg e Arg $-/-$ respectivamente. Observa-se proteção parcial associada ao aumento da alterações relacionadas à regeneração epitelial. Edema e congestão (seta em F) foram mais visíveis no grupo Arg $-/-$. Aumento de 10X.

Tabela 2: Porcentagem da área edemaciada

	Sham	OI	Arg	Sham-/-	OI-/-	Arg-/-
% Área edemaciada	3,17 ± 0,35 ^a	39,12 ± 3,21 ^e	10,04 ± 2,7 ^b	4,16 ± 1,30 ^a	33,63 ± 3,78 ^d	18,66 ± 2,14 ^c

Dados expressos como média ± desvio padrão; n=5. Comparações entre os diferentes grupos foram realizadas simultaneamente. Diferentes letras significam diferenças estatísticas (p<0,05).

3.4. Concentração de poliaminas no fluido intestinal

Putrescina não foi identificada em nenhum grupo. Os grupos Arg e Arg-/- apresentaram maior concentração de espermidina e espermina quando comparados aos respectivos grupos OI e OI-/- (Figuras 15 e 16).

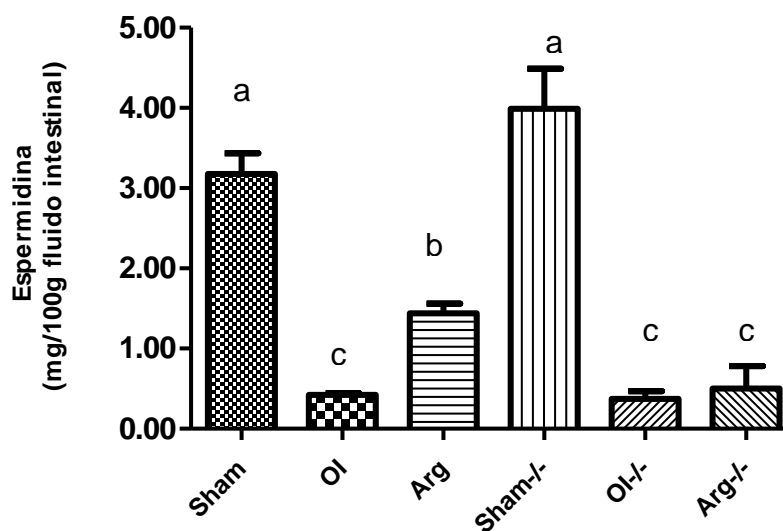


Figura 15: Concentração de espermidina no fluido intestinal. Barras de erro mostram o desvio padrão (DP). Dados foram expressos com média ± DP (n=5). Comparações simultâneas foram realizadas entre os diferentes grupos. Letras diferentes indicam diferença estatística significativa (p<0,05).

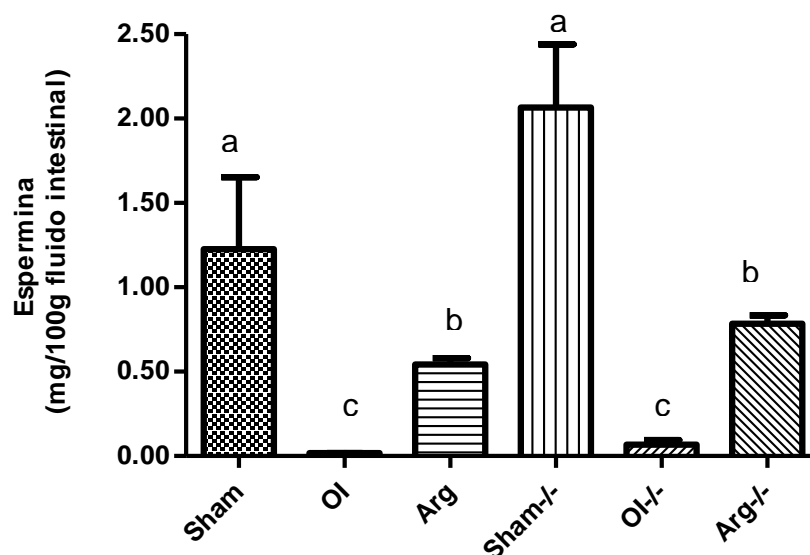


Figura 16: Concentração de espermina no fluido intestinal. Barras de erro mostram o desvio padrão (DP). Dados foram expressos com média \pm DP (n=5). Comparações simultâneas foram realizadas entre os diferentes grupos. Letras diferentes indicam diferença estatística significativa ($p < 0,05$).

3.5. Translocação Bacteriana

O rendimento médio de marcação da *E. coli* com 99m tecnécio foi de 97.08% \pm 1,44, sendo n=10.

A presença da 99m Tc-*E.coli* no sangue, NLM, fígado, baço e pulmões foi significativamente mais elevada nos grupos OI, Sham-/-, OI-/- e Arg-/- ($p < 0,05$). Não houve diferença significativa entre os grupos Sham e Arg ($p \geq 0,05$).

Tabela 3: Biodistribuição da 99m Tc-*E.coli* (cpm/g¹)

Orgão	Sham	OI	Arg	Sham-/-	OI-/-	Arg-/-
NLM	104,35 ^a	2.271,43 ^b	292,22 ^a	2.169,01 ^b	2.642,86 ^b	2.937,50 ^b
Sangue	58,33 ^a	450,72 ^b	93,08 ^a	234,29 ^b	778,00 ^b	409,38 ^b
Fígado	239,11 ^a	817,27 ^b	298,21 ^a	500,78 ^b	1.137,78 ^b	793,16 ^b
Pulmão	213,17 ^a	1.407,27 ^b	163,21 ^a	1.098,90 ^b	1.033,99 ^b	898,93 ^b
Baço	136,02 ^a	1.268,03 ^b	335,00 ^a	1.057,69 ^b	1.976,74 ^b	702,25 ^b

Comparações simultâneas foram realizadas entre os diferentes grupos. Dados foram expressos como mediana (n=8). ¹ cpm significa contagem por minuto. Letras diferentes em uma mesma linha indicam diferença estatística significativa ($p < 0,05$).

4. DISCUSSÃO

A arginina é um aminoácido condicionalmente essencial, tendo as necessidades aumentadas em condições catabólicas como septicemia, trauma e grandes operações (KALIL & DANNER, 2006; XIE et al.; 2008). Atualmente, este aminoácido é também considerado um imunonutriente, uma vez que pode modular o sistema imunológico alterando, desse modo, a evolução da doença (SUCHNER et al., 2002). Diversos estudos experimentais e clínicos demonstraram que ocorre redução da concentração plasmática de arginina em situações de estresse grave. Os fatores que contribuem para este decréscimo da concentração de arginina são redução na síntese endógena, aumento do consumo pelas óxido nítrico sintases e arginase, elevação da oxidação para fornecimento de energia e síntese proteica, além da redução da ingestão alimentar (KALIL & DANNER, 2006). MENG et al. (2005) demonstraram aumento da atividade dos transportadores de arginina presentes em células intestinais após estímulo com LPS. Desse modo, a suplementação de arginina nestas condições tem sido indicada a fim de se corrigir a concentração plasmática.

A técnica mais freqüentemente utilizada para avaliar a translocação bacteriana é a cultura de sangue e órgãos como NLM, fígado, baço, pulmão (WIEST & RATH, 2003; BALZAN et al. 2007). Esta técnica possui como características o dispêndio de tempo, além de subestimação de bactérias não viáveis e de respectivas toxinas que também podem translocar do lúmen intestinal. Aliás, as toxinas, estruturas da parede celular bacteriana, são os principais estímulos antigênicos que desencadeiam toda a resposta inflamatória e imunológica. A técnica do uso de bactérias radiomarcadas permite a detecção das bactérias viáveis, não viáveis e endotoxinas uma vez que, segundo DINIZ et al. (2005), o ^{99m}-tecnécio liga-se justamente a estruturas da parede celular.

O epitélio intestinal é barreira seletiva entre o ambiente do lúmen intestinal e a lâmina própria. É constituído por simples camada de células epiteliais que são especializadas na formação de complexos juncionais e que sofrem rápida e contínua renovação celular (CLAVEL e HALLER, 2007). Além disso, secreções (muco), imunoglobulina A (Ig-A), células imunológicas e fluxo sanguíneo compõem a barreira intestinal. Em condições patológicas como choque, trauma, estresse cirúrgico, esta barreira se torna vulnerável, podendo facilitar a ocorrência de fenômenos como aumento da permeabilidade intestinal, translocação bacteriana, síntese e liberação de toxinas para a circulação sistêmica (THOMAS et al.; 2001). Neste estudo, a permeabilidade intestinal dos grupos Sham e Sham-/- se manteve constante durante

todo o período avaliado. Os dados histológicos também não apontaram nenhuma alteração estrutural importante. Contudo, estes grupos apresentaram contagens, mesmo que em níveis bastante baixos, de $^{99m}\text{Tc-E.coli}$ em todos os órgãos e no sangue. Estes dados mostram que a translocação bacteriana ocorre durante condições de pequeno grau de estresse. Acredita-se que seja evento fisiológico que não acarreta conseqüências deletérias para o organismo. A translocação de endotoxinas e bactérias em pequeno grau constitui importante estímulo ao sistema reticuloendotelial, especialmente para as células de Kupffer no fígado (BALZAN et al. 2007). Por outro lado, os grupos OI e OI-/- exibiram elevação da permeabilidade intestinal e alterações estruturais, principalmente na área onde foi realizada a obstrução. A obstrução intestinal bloqueia a vascularização com conseqüente redução da oxigenação, acidose e lesão tecidual. A acidose resulta em aumento da permeabilidade mediada pela síntese e liberação de radicais livres que alteram o citoesqueleto de enterócitos (BALZAN et al.; 2007). Decorrente de ser estresse físico, a obstrução induz à inflamação, infiltração de células mononucleares, edema, síntese e liberação de citocinas, ON e mediadores inflamatórios. Todos esses fatores também contribuem para a elevação da permeabilidade intestinal (ZHANG et al. 2007). Em modelo de enterite, demonstrou-se que o processo inflamatório eleva a permeabilidade por meio de alterações em células e junções epiteliais (PORRAS et al.; 2006). Um terceiro elemento pode estar associado ao aumento da permeabilidade intestinal no grupo OI. Citocinas pro-inflamatórias (IL1-, IL-2, INF- γ , TNF- α), toxinas bacterianas e hipóxia induzem a iNOS. Uma vez ativada, esta enzima produz ON continuamente em elevada concentração. O excesso de ON pode levar a danos teciduais por meio de efeitos citotóxicos e da interação com radicais livres (HIERHOLZER et al.; 2003; HARDY et al. 2006). Esta hipótese explica alterações na permeabilidade intestinal menos intensas no grupo OI-/-. A elevação da permeabilidade ocorreu até oito horas após a obstrução. Após este período, se manteve em patamares inferiores. A permeabilidade intestinal permaneceu inalterada nos animais WT que receberam suplementação com arginina (grupo Arg). No grupo Arg-/-, houve significativa elevação da permeabilidade no tempo de oito horas, mas esta retornou a valores basais. Está bem estabelecido que a arginina pode melhorar os aspectos morfométricos, a proliferação de enterócitos e o número e a altura das vilosidades em condições de trauma, isquemia, ressecção e obstrução intestinal (ERSIN et al., 2000; SHANG et al., 2004, SUKHOTNIK et al., 2004; OSOWKA et al. 2008; VIANA et al. 2010). O pré-tratamento com arginina também

reduziu a inflamação e a depleção de muco em animais iNOS^{-/-} (GOBERT et al.; 2004).

No presente trabalho, a suplementação com arginina protegeu parcialmente a mucosa intestinal. Os grupos Arg e Arg^{-/-} apresentaram sinais de danos epiteliais já que também passaram pelo estresse da obstrução intestinal. Contudo, inflamação e congestão da camada submucosa foram reduzidas em comparação aos grupos OI e OI^{-/-}. Os efeitos tróficos da arginina podem ser explicados pelo aumento da síntese de poliaminas via arginase (ZALOGA et al., 2004; WU et al.; 2009). Já foi descrito que as poliaminas possuem efeitos relacionados à reconstituição do epitélio intestinal por meio da migração, proliferação celular e regulação da apoptose (MOINARD et al.; 2005). Neste estudo, os animais que receberam arginina apresentaram maior concentração de espermina e espermidina no conteúdo intestinal. A maior disponibilidade do substrato arginina para a arginase possivelmente explica a maior concentração de poliaminas nestes grupos. A suplementação dietética de precursores de poliaminas também exerce efeitos similares. Em modelo de septicemia e isquemia intestinal, a suplementação de ornitina, precursora para síntese de poliaminas, acelerou o reparo da mucosa (NOGUCHI et al. 1996; DURANTON et al.; 1998). Neste estudo foram observados resultados parecidos, já que após oito horas de obstrução, observou-se recuperação da permeabilidade intestinal no grupo Arg^{-/-}.

O pré-tratamento com arginina reduziu a translocação bacteriana em animais WT (grupo Arg). Estudos anteriores com camundongos *swiss* e ratos wistar também demonstraram essa capacidade da arginina (QUIRINO et al.; 2007, VIANA et al.; 2010). O papel da arginina em reduzir a translocação pode estar relacionado à melhora ou modulação da função imunológica, principalmente à imunidade inata. Arginina é essencial à macrófagos, linfócitos T e B, células NK e síntese de citocinas IL-2 e IFN- γ (OCHOA et al., 2004; ZALOGA et al., 2004). Ainda, a arginina é a única fonte de nitrogênio para a síntese de óxido nítrico. Esta molécula produzida por macrófagos é tóxica para patógenos sendo componente crucial da resposta imunológica inata (MORRIS, 2010). Por outro lado, os grupos OI^{-/-} e Arg^{-/-} exibiram significativo aumento da translocação bacteriana apesar da recuperação ou manutenção da permeabilidade intestinal. Provavelmente este evento não está necessariamente ligado ao aumento da permeabilidade. Existem duas vias para a translocação: transcelular, através dos enterócitos e a paracelular, na qual a translocação ocorre entre as junções *tight*. Contudo, a translocação geralmente ocorre pela via transcelular, mesmo em enterócitos morfologicamente preservados. A translocação transcelular ocorre em

canais específicos da membrana dos enterócitos. Há evidências da presença de bactérias viáveis como a *E. coli* no interior de enterócitos intactos, mostrando a passagem por meio do mecanismo de pinocitose e da invasão bacteriana à mucosa intestinal (BALZAN et al.; 2007). Outro fator envolvido na elevação da translocação nestes grupos seria a ausência da iNOS. A ausência de óxido nítrico sintetizado por esta via pode ter alterado mecanismos de defesa antibacterianos. No grupo Arg^{-/-}, os possíveis efeitos positivos da arginina em reduzir a translocação podem ter sido mascarados ou reduzidos pela ausência de óxido nítrico via iNOS.

Concluindo, este trabalho mostra que a suplementação com arginina e a síntese de ON via iNOS são importantes fatores para redução da translocação bacteriana em modelo de obstrução intestinal. Todavia, quando a permeabilidade intestinal é considerada, o ON apresenta papel deletério. Futuros estudos envolvendo arginina, óxido nítrico e parâmetros imunológicos são necessários para melhor esclarecimento dos resultados obtidos.

CAPÍTULO II

SUPLEMENTAÇÃO DE ARGININA MODULA A SÍNTESE DE CITOCINAS E A ATIVIDADE DA ARGINASE EM MACRÓFAGOS ESPLÊNICOS DE ANIMAIS SUBMETIDOS À OBSTRUÇÃO INTESTINAL - PAPEL DA ÓXIDO NÍTRICO SINTASE INDUZIDA

RESUMO

Introdução: Arginina é essencial para a função imunológica, especialmente para a proliferação de linfócitos T e para a imunomodulação, ou seja, modulação da síntese de mediadores inflamatórios como citocinas. Em situações de trauma, operações, câncer e infecção, ocorre aumento da atividade da enzima arginase com conseqüente captação e utilização deste aminoácido por macrófagos e células mielóides supressoras. O resultado é semelhante à imunossupressão que neste caso é causada por deficiência de arginina. A óxido nítrico sintase é uma enzima presente em macrófagos ativados que também utiliza a arginina como substrato para a síntese de óxido nítrico.

Material e Métodos : Animais machos C57BL6/J *wild-type* (WT) e C57BL6/J *iNOS knockout* (*iNOS*^{-/-}) foram separados aleatoriamente em seis grupos. Grupos Sham e Sham^{-/-} (ração comum e ausência de obstrução intestinal), OI e OI^{-/-} (ração convencional + OI), Arg e Arg^{-/-} (ração suplementada com arginina + OI). Após sete dias de tratamento com ração convencional ou suplementada, OI foi induzida. A atividade da arginase e concentração de citocinas TNF- α e IL-10 foram analisadas em cultura de macrófagos esplênicos.

Resultados: A suplementação de arginina e a ausência da *iNOS* elevaram a atividade da arginase em macrófagos esplênicos (grupos Arg, OI^{-/-} e Arg^{-/-} *versus* grupo Sham ; $p < 0,05$). A arginina esteve associada à diminuição da concentração de TNF (grupo Arg *versus* OI; $p < 0,05$) e manutenção da concentração de IL-10 (grupo Arg *versus* demais; $p > 0,05$). A inibição da *iNOS* não resultou em efeitos sobre a concentração de citocinas (grupos Sham^{-/-}, OI^{-/-} e Arg^{-/-} *versus* demais; $p > 0,05$) .

Conclusões: A arginina resultou em resposta imunomoduladora por meio da redução da concentração de TNF- α . Por outro lado, a concentração de IL-10 em macrófagos

esplênicos foi mantida. O ON derivado da arginina pode estar associado à diminuição da produção de citocinas pró-inflamatórias.

Palavras chaves: Arginina, óxido nítrico sintase induzida arginase, imunomodulação, obstrução intestinal.

ABSTRACT

Background: Arginine is a critical immune function amino acid, especially related to T lymphocyte proliferation and immunomodulation. In trauma, operation, cancer and infection situations, arginase is increased and the consequences are increased uptake of arginine by macrophages and myeloid suppressor cells. This is similar to immunosuppression due to arginine deficiency. Active macrophages also present nitric oxide sintase that uses arginine to promote nitric oxide synthesis.

Material and Methods: Male C57BL6/J *wild-type* (WT) and iNOS *knockout* (iNOS^{-/-}) mice were randomized into 6 groups: Sham and Sham^{-/-} (standard chow), IO and IO^{-/-} (standard chow +IO) and Arg and Arg^{-/-} (standard chow supplemented with arginine + IO). After 7 days of treatment with standard or supplemented chows, IO was induced. Arginase activity, TNF- α and IL-10 levels were analyzed in splenic macrophage culture.

Results: Arginine supplementation and the absence of iNOS increased arginase activity in splenic macrophage (Arg, IO^{-/-} and Arg^{-/-} groups versus Sham group; $p < 0,05$). Arginine was also related to TNF- α decrease and maintenance of IL-10 levels (Arg groups versus others; $p > 0,05$). Inhibition of iNOS did not affect cytokine levels (Sham^{-/-}; IO^{-/-} and Arg^{-/-} groups versus others; $p > 0,05$).

Conclusions: Arginine supplementation had an immunomodulator effect through TNF- α decreased levels and maintenance of IL-10 levels. Derived nitric oxide arginine may be related to decreased proinflammatory cytokine.

Key words: Arginine, nitric oxide sintase inducible, arginase, immune modulation, intestinal obstruction.

1. INTRODUÇÃO

Arginina é um aminoácido básico classificado como condicionalmente essencial, sintetizado nos rins a partir do aminoácido citrulina, podendo ser metabolizado em diversos produtos como óxido nítrico (ON), ornitina, ureia, poliaminas, prolina, glutamato, creatina e agmatina (WU et al.; 2009). Arginina é essencial para a função imunológica, especialmente para a proliferação de linfócitos T. Arginina modula a expressão da cadeia ζ do CD3 presente nos receptores TCR nas células T. O CD3 ζ é o principal transdutor de sinal do complexo TCR (ZEA et al.; 2004).

As células mielóides supressoras (CMS) representam grupo de células da linhagem mielóide imaturas e que expressam na membrana os marcadores CD11b e GR-1. Marcadores como CD14 e MHC-II que indicam grau de maturidade raramente são expressos por estas células. Após estímulo por citocinas e fatores de crescimento, as CMS podem se diferenciar em macrófagos, células dendríticas e granulócitos. Estas células foram inicialmente observadas em indivíduos com câncer. Atualmente, sabe-se que em condições de septicemia, inflamação aguda ou crônica, queimadura e trauma ocorre influxo destas células da medula óssea para baço, linfonodos, sangue e, posteriormente para o local da lesão (POPOVIC et al.; 2007; CUENCA et al.; 2011). Especificamente no baço, as CMS estão distribuídas nos centros germinativos das polpas branca, vermelha e no espaço subescapular do baço (MAKARENKOVA et al.; 2006; DELANO et al.; 2007). Elevação das CMS foi observada no baço em modelo de septicemia (CUENCA et al.; 2011). MAKARENKOVA et al. (2006) observaram o aumento do número destas células imaturas no baço de animais 12 horas após trauma.

Macrófagos e CMS são capazes de metabolizar arginina por meio da óxido nítrico sintase induzida (iNOS) e da arginase. A iNOS é induzida por LPS e citocinas pro-inflamatórias como TNF- α , IFN- γ . Por outro lado, a arginase é induzida por citocinas TH2, catecolaminas e prostaglandinas (CHOI et al.; 2009). Existem duas isoformas de arginase: arginase I e arginase II. Arginase I, presente do citosol das células, é encontrada abundantemente no fígado, eritrócitos e leucócitos. No fígado, arginase I catalisa a etapa final da síntese da ureia. A segunda forma da arginase, arginase II, é expressa em macrófagos, células dendríticas, próstata, rins, pulmão, trato gastrointestinal e glândulas mamárias (CEDERBAUM et al.; 2004).

Neste trabalho, o estudo dos macrófagos está relacionado à importante expressão de arginase e consequente consumo de arginina. Alguns estudos têm mostrado que arginase extra-hepática expressa-se em células pulmonares, macrófagos

peritoniais e CMS e, pode ter a atividade elevada em modelos de trauma, cirurgia, câncer e infecção (DELANO et al.; 2007). Nestas condições, ocorre maior captação da arginina devido ao aumento da expressão de transportadores com alta afinidade para aminoácidos catiônicos, os CAT's, seguida da ativação da arginase (POPOVIC et al.; 2007). O aumento da atividade da arginase nas CMS reduz a disponibilidade de arginina. Assim ocorre a inibição da proliferação das células T, além da redução da síntese de IFN- γ e IL-2, fatores de crescimento para LT.

A ausência de arginina no meio intracelular também mostra sua importância para estas células. Linfócitos mantidos em meio ausente de arginina apresentaram redução da proliferação, ativação e síntese de citocinas. A adição do aminoácido elevou nitidamente a capacidade de proliferação e a produção de INF- γ , IL-4 e IL-10 (CHOI et al.; 2009). Por isso, a suplementação dietética de arginina tem sido uma estratégia para elevação ou correção dos níveis de arginina. Neste trabalho, foi avaliado o efeito da suplementação com arginina sobre a atividade da arginase e a síntese de citocinas TNF- α e IL-10 em cultura de macrófagos esplênicos em modelo de obstrução intestinal. Os efeitos da inibição da iNOS também foram estudados.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Animais

Camundongos da linhagem C57BL6/J *wild type* (WT) e iNOS *knockout/J* (iNOS-/-) foram fornecidos pelo biotério do ICB (Instituto de Ciências Biológicas) da UFMG (Universidade Federal de Minas Gerais). Animais machos de 4 a 5 semanas com peso entre 16g e 20g foram usados neste estudo. Todos os animais foram mantidos em caixas plásticas em ambiente com temperatura, ciclo claro/escuro e umidade controlados. Este estudo foi aprovado pelo Comitê Ético de Experimentação Animal da universidade Federal de Minas Gerais (Anexo 1)

2.2. Protocolo Experimental

Os animais foram separados aleatoriamente em 6 grupos de 5 animais: Grupos Sham e Sham-/-: Animais C57BL6/J WT ou C57BL6/J iNOS-/- que receberam ração convencional e não foram submetidos à obstrução intestinal. Grupos OI e OI-/-: Animais C57BL6/J WT ou C57BL6/J iNOS-/- que receberam ração convencional e foram

submetidos à obstrução intestinal. Grupos Arg e Arg-/-: Animais C57BL6/J WT ou C57BL6/J iNOS-/- que receberam diariamente ração suplementada com arginina na dose de 100mg/dia e que foram submetidos à obstrução intestinal. As rações convencional e suplementadas foram isocalóricas e isoproteicas. Água foi ofertada *ad libitum*. Os animais receberam ração convencional ou suplementada durante sete dias antes da indução da obstrução intestinal. Ingestão calórica, proteica e peso corporal foram monitorados e calculados diariamente a partir do consumo das rações convencional e suplementada com arginina. A distribuição dos grupos é apresentada no diagrama abaixo:

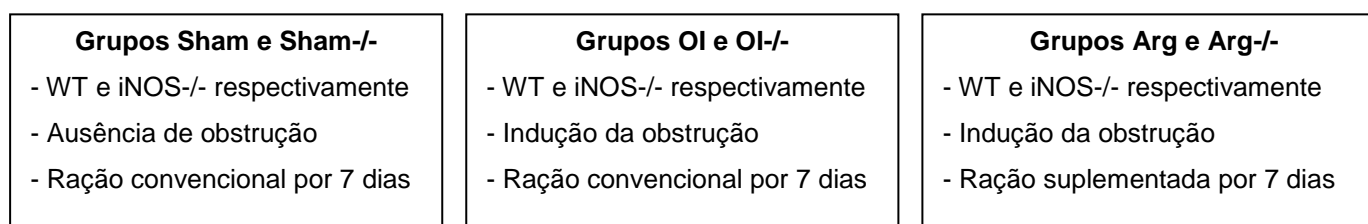


Figura 17: Esquema do delineamento experimental (Capítulo II)

2.3. Preparo da dieta suplementada

Foram utilizados os seguintes ingredientes nas respectivas proporções, para o preparo da dieta suplementada com arginina:

- Ração convencional triturada – 74,00%
- Arginina – 3,50%
- Gelatina em pó incolor (a base de colágeno) – 3,50%
- Amido – 16,00%
- Óleo de soja – 3,00%
- Água – qsp (quantidade suficiente para)

Inicialmente, a ração triturada e peneirada foi homogeneizada à arginina. Em seguida, foram acrescentados gelatina em pó incolor (dissolvida em água destilada previamente aquecida), amido (dissolvido em água destilada à temperatura ambiente) e óleo de soja. O acréscimo de amido de milho e óleo de soja não tinha como objetivo nenhuma função nutricional específica. Apenas garantiu que as rações convencional e suplementada se mantivessem isocalórica e isoproteicas. Todos os ingredientes foram intensamente homogeneizados até formação de massa uniforme. Água destilada foi acrescentada conforme necessidade. A massa obtida foi subdividida em pequenos cilindros, similares à forma da ração tradicional. Estes cilindros sofreram secagem em

estufa a 45°C por oito horas (Série D, Nova Ética, SP, BR) (ABREU, 2005). Após secagem, a ração obtida foi pesada e ofertada aos animais, de modo que o consumo diário de arginina fosse de 100 mg. Esta dosagem de arginina corresponde a 3,5% na ingestão calórica diária. Diariamente, a ração suplementada contendo 100mg de arginina era colocada para os animais no início da manhã. Após seu consumo, a ração convencional era liberada *ad libitum*.

2.4. Cultivo e preparação da *Escherichia coli*

Bactéria *Escherichia coli* (ATCC-10536), não patogênica, fornecida pelo Laboratório de controle de Qualidade Biológico da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais foi cultivada. De uma cultura-mãe de *E. coli* foi feito o repique em agar tripticaseína (Merck). Após 18 a 20 horas de crescimento a 37°C, a bactéria foi transferida, com auxílio de alça de platina, para solução salina esterilizada. A concentração bacteriana foi ajustada espectrofotometricamente em 31% de transmitância a 580nm (espectrofotômetro COLEMAN JUNIOR II) correspondente a 10⁸ unidades formadoras de colônia por mL (UFC/mL) (DINIZ et al., 2005). Após 7 dias de tratamento com as rações convencional e suplementada com arginina, 0,1 mL da suspensão de *E. coli* foi administrado por gavagem a todos os grupos.

2.5. Procedimento cirúrgico e indução da obstrução intestinal

Após 90 minutos da gavagem da *E. coli*, os animais foram pesados e anestesiados intraperitonealmente com solução de cloridrato de xilazina (Dopaser®) e cloridrato de ketamina (Dopalen®) nas concentrações de 8 mg/Kg e 60mg/kg, respectivamente. A operação para promoção da obstrução intestinal foi realizada conforme proposto por SALVALLAGIO et al. (2002). Incisão mediana de aproximadamente 2cm foi feita no abdome, com exposição do íleo terminal e ceco. Em seguida, o íleo terminal sofreu ligadura simples (fio de nylon 5.0, BRASTURE, São Paulo, Brasil) a 0,5 cm da válvula íleo-cecal. Finalizando o procedimento, foi realizada a sutura da camada muscular abdominal (ponto simples contínuo) com fio de sutura catagute 4.0 e da pele (ponto simples separado) com fio de nylon. Todos os grupos passaram pelo mesmo processo. Deve-se ressaltar que os grupos Sham e Sham-/- não

sofreram ligadura do íleo terminal, sendo submetido apenas à manipulação das alças e ao estresse da abertura do abdome.

2.6. Isolamento de macrófagos do baço

Decorridas 18 horas da obstrução intestinal, os animais foram eutanasiados e o baço foi recolhido. Os baços foram macerados e a suspensão obtida foi centrifugada a 300g por 10 minutos, a 4°C. Os esplenócitos foram ressuspensos em TRIS- ammonium chloride para lise de hemácias e as células remanescentes (leucócitos) foram colocadas em placas com meio RPMI completo, contendo 10% de soro bovino fetal (Sigma-Aldrich). As placas foram incubadas a 37°C por sete dias para a adesão de macrófagos. Após este período, os macrófagos foram separados pela exposição ao frio (4°C) por 10 minutos e recolhidos, sendo ressuspensos em meio RPMI completo, contendo 10% de soro bovino fetal. Em seguida, as células foram diluídas em azul de tripan, para posterior contagem na câmara de Neubauer (REZENDE et al.; 2007).

2.7. Cultura de células

As células foram utilizadas em concentração de 5×10^5 células/mL. Estas foram mantidas em 1mL de meio, em atmosfera contendo 5% de CO₂, a 37°C, por 24 horas. Após este período, o sobrenadante foi recolhido para determinação de citocinas. As células aderidas foram utilizadas para o ensaio de arginase (REZENDE et al.; 2007). (n=5 por grupo)

2.8. Determinação da concentração de citocinas

A concentração de IL-10 e TNF- α no sobrenadante da cultura de macrófagos foi mensurada por meio de ELISA, utilizando-se kits específicos, seguindo o protocolo do fabricante. Os resultados foram expressos em pg/mL (PeproTech, New Jersey, USA). (n=5 por grupo)

2.9. Avaliação da atividade da arginase

A atividade da arginase foi medida de acordo com Corraliza et al. (1994). Brevemente, macrófagos foram submetidos a lise com 50 μ L de Triton X-100 0,1%

(Sigma Chemicals Co.). Após 30 minutos no agitador, 50 μL de MnCl_2 10 mmol /L (Merck) e 50 μL Tris-HCl (Merck) foram adicionados e a enzima foi ativada pelo aquecimento a 55°C por 10 minutos. A hidrólise de arginina foi induzida pela incubação de 25 μL do lisado ativado com 25 μL of L-arginina 0.5 mol /L (Merck; pH 9,7) a 37°C por 60 minutos. A reação foi interrompida com solução de ácidos: 400 μL de H_2SO_4 (96%); H_3PO_4 (85%) e H_2O (1/3/7, v/v/v). Para avaliação da atividade da enzima, a concentração da uréia produzida foi mensurada. Foram adicionados 25 μL de solução composta de a-isonitrosopropiophenona (Sigma Chemical Co.) dissolvida em etanol 100%. Após incubação por 45 minutos a 95°C , foi realizada leitura em espectrofotômetro a 540 nm. Um unidade da atividade da arginase foi definida como a quantidade de enzima que catalisa a formação de 1 μmol de ureia /min. A curva padrão foi construída a partir de soluções de uréia (n=5 por grupo).

2.10. Análises estatísticas

Inicialmente, os dados relativos à concentração de citocinas e atividade da arginase foram analisados por meio do teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov. Em seguida, procedeu-se à análise por meio de ANOVA e *post hoc* pelo teste de Tukey, utilizando o programa “GraphPad Prism”, versão 5.0. Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão (DP). Diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$. As comparações entre os grupos foram realizadas simultaneamente.

A metodologia deste trabalho está resumidamente ilustrada na Figura 18.

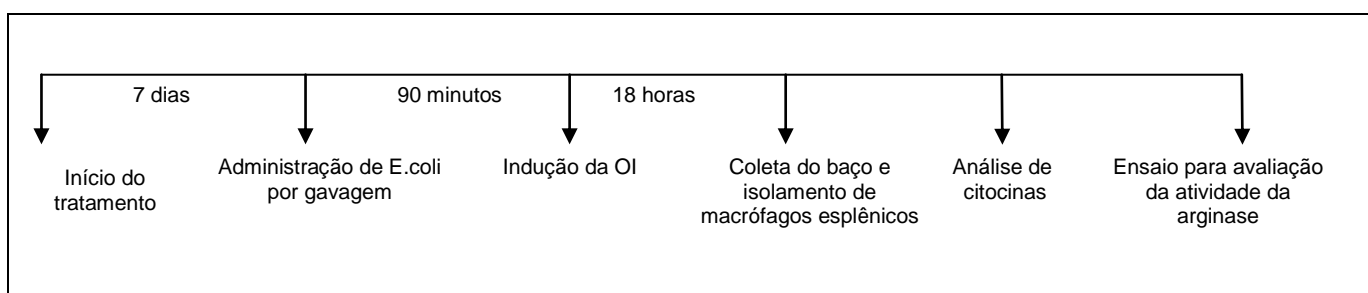


Figura 18: Resumo da metodologia experimental (Capítulo II)

3. RESULTADOS

3.1 Atividade da arginase

O grupo Sham apresentou valores considerados basais da atividade da arginase (1.406,39). Observou-se elevação significativa da arginase nos grupos OI (5.351,26) e Arg (14.147,10), entre os animais WT. Nos animais iNOS^{-/-}, a arginase também foi significativamente menor no grupo Sham^{-/-} (7.823,16). Contudo, não houve diferença significativa entre os grupos OI^{-/-} (15.728,40) e Arg^{-/-} (16.178,40) (Figura 19).

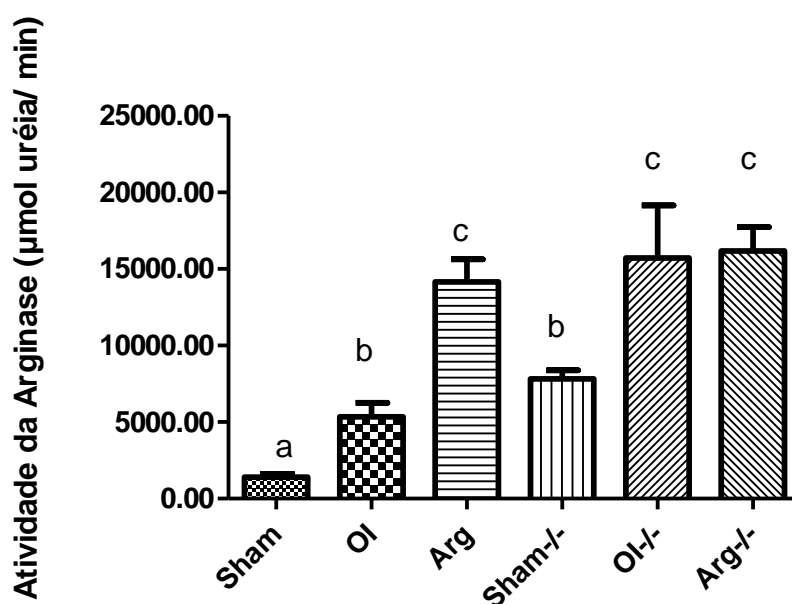


Figura 19: Atividade da arginase (µmol de ureia/minuto). Barras de erro mostram o desvio padrão (DP). Dados foram expressos como média ± DP (n=5). Comparações simultâneas foram realizadas entre os diferentes grupos. Letras diferentes indicam diferença estatística significativa (p<0,05).

3.2. Concentração de citocinas

Concentrações mais elevadas de TNF foram detectadas nos grupos OI (1.019,25 ± 141,07), Sham^{-/-} (914,57 ± 171,08), OI^{-/-} (1.035,42 ± 85,33) e Arg^{-/-} (963,94 ± 154,72) (p<0,05). O grupo Arg apresentou concentração reduzida de TNF. Ainda, não houve diferença significativa entre os grupos Arg (521,75 ± 41,55) e Sham (686,46 ± 144,8) (p>0,05) (Figura 20).

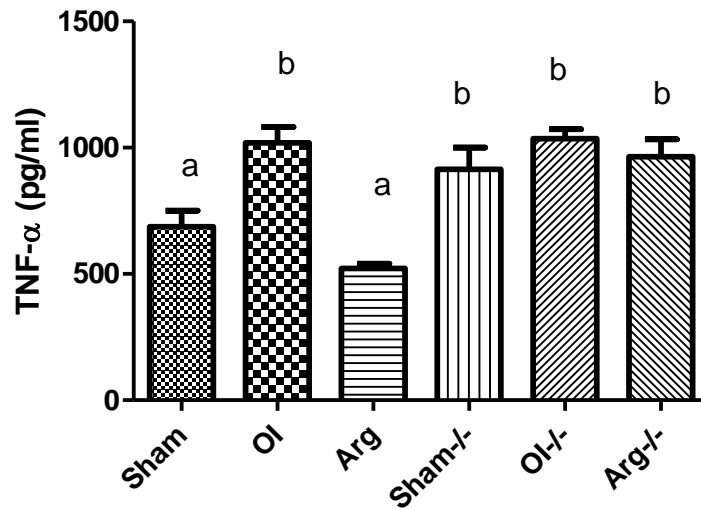


Figura 20: Concentração de TNF- α em cultura de macrófagos. Barras de erro mostram o desvio padrão (DP). Dados foram expressos como média \pm DP (n=5). Comparações simultâneas foram realizadas entre os diferentes grupos. Letras diferentes indicam diferença estatística significativa ($p < 0,05$).

A concentração de IL-10 não diferiu entre os grupos Sham (1.064,28 \pm 57,72), OI (1.035,19 \pm 200,23), Arg (1.031,97 \pm 180,52), Sham-/- (1.288,21 \pm 404,84), OI-/- (1.179,19 \pm 149,47) e Arg-/- (1.285,91 \pm 111,81) (Figura 21).

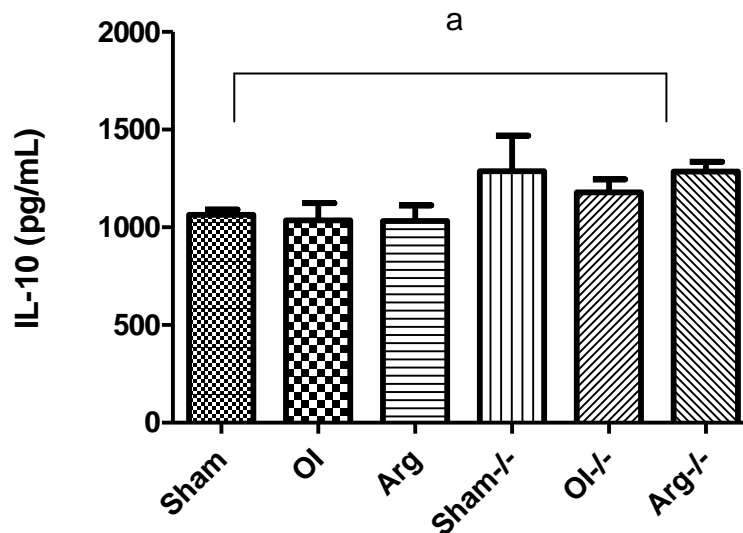


Figura 21: Concentração de IL-10 em cultura de macrófagos. Não houve diferença significativa entre os grupos. Barras de erro mostram o desvio padrão (DP). Dados foram expressos como média \pm DP (n=5). Comparações simultâneas foram realizadas entre os diferentes grupos.

A concentração de TNF- α em relação à de IL-10 (Figura 22) mostra que os animais dos grupos Sham (0,64) e Arginina (0,51) apresentaram relação de TNF- α /IL10 significativamente menor ($p < 0,05$) em comparação aos grupos OI (1,03), Sham-/- (0,80), OI-/- (0,89) e Arg -/- (0,75).

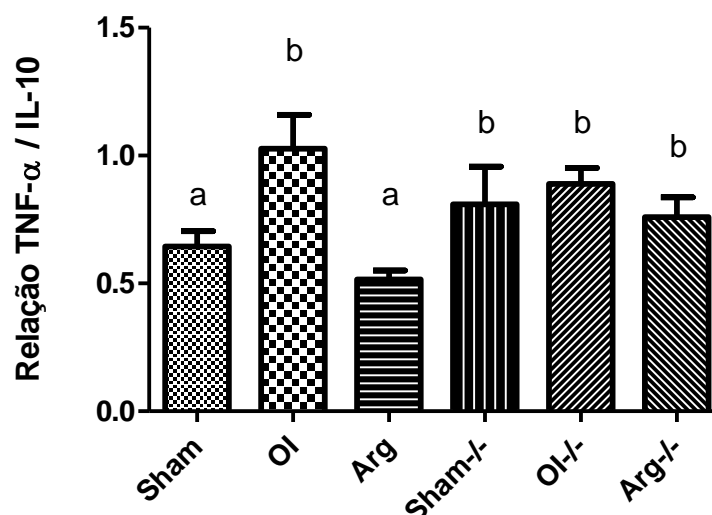


Figura 22: Relação concentração de TNF- α / concentração de IL-10. Barras de erro mostram o desvio padrão (DP). Dados foram expressos como média \pm DP (n=5). Comparações simultâneas foram realizadas entre os diferentes grupos.

4. DISCUSSÃO

Em situações de estresse ocorre ativação de células mielóides precursoras de macrófagos que expressam arginase capaz de utilizar a arginina necessária para processos fisiológicos como síntese de ON e função de linfócitos T. Sugere-se que o aumento do consumo da arginina pela arginase pode levar a possível imunossupressão. Estratégias como inibição ou prevenção da ativação dessas células mielóides, inibição da ativação da arginase ou suplementação com arginina têm sido estudadas com o objetivo de restaurar ou manter a concentração plasmática de arginina (OCHOA et al.; 2000; MAKARENKOVA et al.; 2006).

No presente estudo, animais que sofreram obstrução intestinal (grupos Arg, OI, Arg-/- e OI-/-) apresentaram atividade de arginase significativamente mais elevada quando comparados aos controles Sham e Sham-/- . Nosso modelo de obstrução intestinal representa situação de estresse agudo inflamatório e infeccioso de alta agressividade. Assim, este modelo experimental ilustra condições que propiciam o aumento da proliferação de CMS CD11b⁺/Gr-1⁺ e concomitante aumento da atividade da arginase. Neste trabalho, a atividade da arginase foi mensurada em macrófagos do baço tendo como referência trabalho desenvolvido por OCHOA et al. (2000) no qual observou-se aumento da atividade da arginase em macrófagos esplênicos após indução de trauma e infecção por LPS. Macrófagos são células maduras,

diferenciadas, derivadas da linhagem mielóide e apresentam a molécula CD11b+ como um dos marcadores de superfície (ELGERT, 1996).

A suplementação com arginina elevou significativamente a atividade da arginase. Os animais iNOS^{-/-} também apresentaram atividade da arginase mais intensa do que os pares WT. Em ambos os casos, o aumento da disponibilidade de arginina pode ser fator responsável pelo aumento da arginase. Nos animais iNOS^{-/-}, a ausência da iNOS, importante enzima consumidora de arginina, pode ter elevado a disponibilidade deste aminoácido para a arginase.

Está bem estabelecido que a produção contínua de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-1 α , IL-1 β , IL-12 e IL-18) pode ter papel mais deletério do que benéfico durante septicemia. Aumento da síntese de TNF- α está associado com elevação da mortalidade. Propõe-se que o bloqueio ou redução da síntese dessas citocinas seria alternativa para proteger o hospedeiro durante septicemia (NETEA et al.; 2003). Enquanto TNF- α representa típica citocina pró-inflamatória, estimulando a resposta imunológica inata, a IL-10 é citocina anti-inflamatória que apresenta efeitos inibitórios sobre as citocinas pró-inflamatórias. Desse modo, o balanço entre TNF- α e IL-10 é usado para avaliação do perfil pró/anti-inflamatório (NETEA et al.; 2003).

Os animais dos grupos Arg tiveram concentração da citocina pró-inflamatória TNF- α significativamente reduzida, significativamente similar ao controle *Sham*. A concentração de IL-10 manteve-se a mesma entre os grupos. Os efeitos da arginina sobre a resposta imunológica celular são bem conhecidos. Contudo, é igualmente importante avaliar os efeitos deste aminoácido sobre a síntese de citocinas pró e anti-inflamatórias, uma vez que estas moléculas são os principais agentes que direcionam o curso das respostas imunológica e inflamatória. Estudos ilustram este papel imunomodulador da arginina em nível local, sistêmico e *in vitro*. HURT et al. (2006) observaram redução de citocinas pro-inflamatórias, aumento das anti-inflamatórias e da Ig-A no tecido intestinal de animais sépticos após consumo de dieta imunomoduladora contendo diversos imunonutrientes, dentre esses a arginina. Trabalho desenvolvido por BATISTA et al. (2011) apresentou resultados semelhantes a este estudo com a prévia suplementação de citrulina, um aminoácido precursor da arginina. A oferta de citrulina reduziu a concentração sérica de INF- γ e manteve os níveis de IL-10 em modelo de obstrução intestinal. Em cultura de linfócitos e esplenócitos, a suplementação prévia, via parenteral de arginina, reduziu a concentração de TNF- α (CHEN et al.; 2012). A suplementação oral de arginina em modelo de queimadura reduziu a expressão de

mRNA das citocina pró-inflamatórias TNF- α , IFN- γ , IL-1 β e IL-6 em culturas de células do baço, pulmão, baço e fígado (CUI et al.; 2000).

Por outro lado, neste trabalho, a inibição da iNOS não acarretou em alterações na concentração de TNF- α , assim como a suplementação de arginina em animais iNOS $^{-/-}$. Acredita-se na hipótese de que o ON derivado da arginina possa ter ação supressora sobre a produção de citocinas TH1 por macrófagos e esplenócitos. Contrariamente, a ausência ou inibição da iNOS estimularia a resposta TH1. EUN et al. (2000) avaliaram este papel imunomodulador do óxido nítrico e observaram que a síntese de ON reduziu a síntese e das citocinas pró-inflamatórias IL-2 e INF- γ em cultura de esplenócitos (EUN et al.; 2000). Animais que receberam arginina apresentaram valores mais elevados de nitrato/nitrito (sub-produtos do ON) e menor expressão do mRNA destas citocinas pró-inflamatórias em células do baço, pulmão, baço e fígado (CUI et al.; 2000). O mecanismo pelo qual o ON reduz a síntese de citocinas pró-inflamatórias estaria relacionado à inibição do sinal transcricional fator NF κ B, necessário para a síntese destas citocinas (MELDRUM, et al.; 1998).

Outra hipótese para a manutenção de TNF- α em alta concentração nos animais iNOS $^{-/-}$ é a de que estes apresentam resposta imunológica diferente de animais WT. WEI et al (1995) observaram que animais iNOS $^{-/-}$ infectados com *Leishmania sp* desenvolveram resposta TH1 mais intensa do que animais WT.

Assim, no presente estudo, podemos concluir que a arginina apresentou atividade imunomoduladora, já que a suplementação reduziu a concentração de TNF- α e manteve a de IL-10 em macrófagos esplênicos. É necessário salientar que a concentração da IL-10 não deve ser avaliada de forma isolada, mas em relação à concentração de TNF. Os animais dos grupos Sham e Arg apresentaram os mesmos níveis de IL-10 do que os demais, mas níveis significativamente reduzidos de TNF- α . Outro achado importante é que o ON derivado da arginina é importante para reduzir a produção da citocina pró-inflamatória TNF. , A concentração desta citocina foi significativamente maior nos animais iNOS $^{-/-}$. Logo, outros estudos são necessários para avaliação dos mecanismos de ação responsáveis pelos efeitos imunomoduladores da arginina e ON.

4. CONCLUSÕES INTEGRADAS

A suplementação dietética de arginina por sete dias anteriores à OI manteve a permeabilidade, reduziu a TB e, elevou o nível de poliaminas intestinais. *In vitro*, em macrófagos esplênicos, a arginina elevou a atividade da arginase e apresentou papel imunomodulador, reduzindo a concentração de TNF α em relação à de IL-10. É possível que a arginina tenha ação local intestinal importante, apresentando ação trófica e protetora sobre a mucosa intestinal, pela produção de poliaminas. Estas atividades não foram observadas nos animais iNOS $^{-/-}$ independentemente da suplementação da arginina. Animais iNOS $^{-/-}$ apresentaram níveis mais altos de TB e menores concentrações de poliaminas. *In vitro*, apresentaram maiores níveis de TNF- α . Isso sugere que o óxido nítrico é necessário em situações de estresse e, a inibição pode apresentar mais efeitos deletérios do que benéficos. Os mecanismos de ação da função imunomoduladora da arginina e do ON em reduzir a síntese de TNF- α precisam ser melhor elucidados e compreendidos.

5. PERSPECTIVAS FUTURAS

Dando continuidade a este trabalho, propõe-se neste modelo experimental de obstrução intestinal:

- Investigar a concentração séria de arginina em animais em animais WT e iNOS-/-, tratados ou não
- Investigar a regulação, expressão ou atividade da eNOS em animais WT e iNOS-/-, tratados ou não com arginina
- Investigar a função ou atividade de linfócitos T em animais WT e iNOS-/-, tratados ou não com arginina.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, R.V. O sistema de biotransformação hepático, induzido pela desnutrição e pelo paracetamol, é modulado pela ingestão de café. Belo Horizonte: Faculdade de Farmácia da UFMG, 2005. 135 p. (Dissertação, Mestrado em Ciência de Alimentos).

ACHESON, D.W.K.; LUCCIOLI, S. Mucosal immune responses. *Best practice & Research Clinical Gastroenterology*, v. 18, p. 387-404, 2004.

ADAWI, D.; KASRAVI, F.B.; MOLIN, G.; JEPPSSON, B. Oral arginine supplementation in acute liver injury. *Nutrition*, v. 12, p.529-533, 1996.

AIRES, M.M. *Fisiologia*. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., 1999. 934p.

AKTAN, F. iNOS - mediated nitric oxide production and its regulation. *Life Sciences*, v. 75, p. 639 – 653, 2004.

ALBILLOS, A.; DE LA HERA, A. Multifactorial gut barrier failure in cirrhosis and translocation: working out the role of probiotics and antioxidants. *Journal of Hepatology*, v. 37, p. 523-526, 2002.

ANDREW, P.J.; MAYER, B. Enzymatic function of nitric oxide synthases. *Cardiovascular Research*, v. 43, p. 521-531, 1999.

AVONTUR, J.; Nolthenius, R.P.T.; Van Bodegom, J.W.; ; Bruining, H. A. Prolonged inhibition of nitric oxide synthesis in severe shock – A clinical study. *Critical Care Medicine*, v. 26, p. 660-667, 1998.

BALZAN, S.; QUADROS, C.A.; CLEVA, R.; ZIBERSTEIN, B.; CECCONELLO, I. Bacterial translocation: overview of mechanisms and clinical impact. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, v. 22, p. 464-471, 2007.

BANSAL, V & OCHOA, J.B. Arginine availability, arginase and the immune response. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*, v. 6, p. 223-228, 2003.

BATISTA, M.A.; NICOLI, J. MARTINS, F.S.; MACHADO, JAN; ARANTES, R.M.E.; QUIRINO, I.E.P.; CORREIA, M.I.T.D.; CARDOSO, V.N. Pretreatment With Citrulline

Improves Gut Barrier After Intestinal Obstruction in Mice. *J Parenter Enteral Nutr.* 2012; 36: 69-76.

BERG, R.D. Bacterial translocation from the gastrointestinal tract. *Trends in Microbiology*, v. 3, p. 149-154, 1995.

CHAN, D.C.; CHANG, T.M.; TSAO, T.Y.; TSOU, S.S.; LU, R.H.; TSAI, L.M. Effects of oral arginine and glutamine on radiation-induced injury in the rat. *Journal of Surgical Research*, v.199, p. 149-154, 2003.

CEDERBAUM, S.D.; YU, H.; GRODY, W.W.; KERN, R. M.; YOO, P.; IYER, R.K. Arginases I and II: do their functions overlap. *Molecular Genetics and Metabolism*, v. 81, p. S38-S44, 2004.

CHANCE, W.T.; SHERIFF, S.; DAYAL, R.; FRIEND, L.A.; THOMAS, I.; BALASUBRAMANIAM. The role of polyamines in glucagons-like peptide-2 prevention of TNP- induced gut hypoplasia. *Peptides*, v. 27, p. 883-892, 2006.

CHANG, T.M.; LU, R.H.; TSAI, L.M. Glutamine ameliorates mechanical obstruction-induced intestinal injury. *Journal of Surgical Research*, v.95, p. 133-140, 2001.

CHEN L.W.; HSU, C.M.; WANG, J.S.; CHEN, J.S.; CHEN, S.C. Specific inhibition of iNOS decreases the intestinal mucosal peroxynitrite level and improves the barrier function after thermal injury. *Burns*, v. 24, p. 699-705, 1998.

CHEN, Y.H.; LEE, C.H.; HSU, L.S.; HSIAO,C.C.; LO, H.C. Appropriate dose of parenteral arginine enhances immunity of peripheral blood cells and splenocytes in rats with subacute peritonitis. *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition*, v. xx, p. xx, 2012.

CLAVEL, T; HALLER, D. Molecular interactions between bacteria, the epithelium, and the mucosal immune system in the Intestinal tract: Implications for chronic inflammation. *Curr. Issues Intest. Microbiol.*, v. 8, p. 25–43, 2007.

CORRALIZA, I.M.; CAMPO, M.L.; SOLER, G.; M. Modolel. Determination of arginase activity in macrophages: a micromethod. *Journal of Immunological Methods*, v. 174, p. 231-235, 1994.

COTRAN, R.S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. Robbins - Pathologic Basis of Disease. 6. ed. Philadelphia: W.B.Saunders Company, 1999. 1425 p.

CUENCA, A.G.; DELANO, M.J.; KELLY-SCUMPIA, K.M.; MORENO, C.; SCUMPIA, P.O.; LA FACE, D.M. et al. A paradoxal role for myeloid derived suppressor cells in sepsis and trauma. *Molecular Medicine*, v. 17, p. 281-292, 2011.

CUI, L.X.; IWASA, M.; IWASA, Y.; OGOSHI, S. Arginine-supplemented diet decreases expression of inflammatory cytokines and improves survival in burned rats. *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition*, v. 24, p. 89-96, 2000.

CYNOBER, L.; LE BOUCHER, J.; VASSON, M.P. Arginine metabolism in mammals. *Nutritional Biochemistry*, v.6, p. 402-413, 1995.

CZERNICHOW, B.; NSI-EMVO, E.; GALLUSER, M.; GOSSE, F.; RAUL, F. Enteral supplementation with ornithine alpha ketoglutarate improves the early adaptive response to resection. *Gut*, v. 40, p. 67-72, 1997.

DAHM, P.L.; THORNE, J.; MYHRE, E.; GRINS, E.; MARTENSSON, L.; BLOMQUIST, S. Intestinal and hepatic perfusion and metabolism in hypodynamic endotoxic shock. Effects of nitric oxide synthase inhibition. *Intensive Care & Physiology*, 1998.

DANI, R.; CASTRO, L.P. *Gastroenterologia Clínica*. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., 1993. v.1, 579p.

DEITCH, E.A. Simple intestinal obstruction causes bacterial translocation in man. *Archives Surgery*, v. 124, p. 699-701, 1989.

DE JONGE WJ, KWIKKERS KL, TE VELDE AA, VAN DEVENTER SJ, NOLTE MA, MEBIUS RE, RUIJTER JM, LAMERS MC, LAMERS WH. Arginine deficiency affects early B cell maturation and lymphoid organ development in transgenic mice. *The Journal of Clinical Investigation*, v. 110, p. 1539-1548, 2002.

DELANO, M.J.; SCUMPIA, P.O.; WEINSTEIN, J.S.; COCO, D.; NAGARAJ, S.; KELLY-SCUMPIA, K.M. et al. MyD88-dependent expansion of an immature GR-1+CD11b+ populations induces t cell suppression and TH2 polarization in sepsis. JEM, v. 204, p. 1463-1474, 2007.

DELOYER, P.; PEULEN, O.; DANDRIFOSSE, G. Intestinal effects of long-lasting spermine ingestion by suckling rats. Experimental Physiology, v. p. 901-908, 2005.

DEMIRKIRAN, A.E.; BALKAYA, M.; TUNCYUREK, P. CEVIKEL, M.H.; CULHACI, N.; IYIGOR, M., et al. The effects of nitric oxide supplementation and inhibition on bacterial translocation in bile duct ligated rats. Acta Chirurgica Belgica , v. 106, p. 202-205, 2006.

DE OCA, J.; BETTONICA, C.; CUADRADO, S.; VALLET, J.; MARTIN, E.; GARCIA, A.; MONTANES, T.; JAURRIETA, E. Effects of oral supplementation of ornithine -[alfa]-ketoglutarate on the intestinal barrier after orthotopic small bowel transplantation. Transplantation, v. 63, p. 636-639, 1997.

DE OCA, J. MILLAT, E.; DOMINGUEZ, M.A.; ALDEANO, A. MARTIN, R. Selective bowel decontamination, nutritional therapy and bacterial translocation after burn injury. Clinical Nutrition, v. 12, p. 355-359, 1993.

DINIZ, S.O.F.; BARBOSA, A.J.A., DURVAL-ARAÚJO, I.; LEE-NELSON, D.; MACHADO, L.A.S.; CARDOSO, V.N. Assessment of bacterial translocation in obstructive jaundice using ^{99m}Tc-Escherichia coli. Brazilian Archives of Biology and Technology, v. 48, p. 45-49, 2005.

DINIZ, S.O.F.; RESENDE, B.M.; NUNAN, E.A.; SIMAL, C.J.R.; CARDOSO, V.N. ^{99m}Techetium labeled Escherichia coli. Applied Radiation and Isotopes, v. 51, p. 33-36, 1999.

DURANTON, B.; SCHLEIFFER, R.; GOSSE, F.; RAUL, F. Preventive administration of ornithine alpha-ketoglutarate improves mucosal repair after transient ischemia in rats. Critical Care Medicine, v. 26, p. 120-125, 1998.

ERSIN S.; TUNCYUREK, P.; ESASSOLAK, M.; ALKANAT, M.; BUKE, C.; YILMAZ, M.; TELEFONUC, A.; KOSE, T. The prophylactic and therapeutic effects of glutamine and arginine enriched diets on radiation induced enteritis in rats. *Journal of Surgical Research*, v. 89, p. 121-125, 2000.

EUN, J.S.; SUH, Y.H.; KIM, D.K.; JEON, H. regulation of cytokine production by exogenous nitric oxide in murine splenocyte and peritoneal macrophage. *Archives of Pharmacal Research*, v. 23, p. 531-534, 2000.

EVANS, R.W.; FERNSTROM, J.D.; THOMPSON J.; MORRIS, S.M.; KULLER, L.H. Biochemical responses in healthy subjects during dietary supplementation with L-arginine. *Journal of Nutritional Biochemistry*, v. 15, p. 534-539, 2004.

EVOY, D.; LIEBERMAN, M.D.; FAHEY, T.J.; DALY, J.M. Immunonutrition: The role of arginine. *Nutrition*, v. 14, p. 611-617, 1998.

FAUCI, A.S.; BRAUNWALD, E.; ISSELBACHER, K.J.; MARTIN, J.B.; KASPER, D.L.; HAUSER, S.; LONGO, D.L. *Harrison – Medicina interna*. 14. ed. Rio de Janeiro: McGraw Hill Interamericana do Brasil Ltda., 1998. 2967 p.

FILHO, G.B. Bogliolo – *Patologia*. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A, 2000. 1328 p.

FLYNN, N.E.; MEININGER, C.J.; HAYNES, T.E.; WU, G. The metabolic basis of arginine nutrition and pharmacotherapy. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, v. 56, p. 427-438, 2002.

GARCIA, X.; STEIN, F. Nitric oxide. *Seminars in Pediatric Infectious Diseases*, v. 17, p. 55-57, 2006.

GATT, M.; REDDY, B.S.; MACFIE, J. Bacterial translocation in the critically. *Alimentary Pharmacology Therapeutics*, v. 25, p. 741–757, 2007.

GENEROSO, S. V. ; VIANA, M. L. ; SANTOS, R. G. C. ; NOGUEIRA-MACHADO, J. A.; CORREIA, M. I. T. D. ; NICOLI, R. J. ; CARDOSO, V. N. . *Saccharomyces cerevisiae*

strain UFMG 905 protects against bacterial translocation, preserves gut barrier integrity and stimulates the immune system in a murine intestinal obstruction model. *Archives of Microbiology*, v. 192, p. 477-484, 2011.

GOBERT, A.P.; CHENG, Y.; AKHTAR, M.; MERSEY, B.D.; BLUMBERG, D.R.; CROSS, R.K. et al. Protective role of arginase in a mouse model of colitis. *The Journal of Immunology*, v. 173, p. 2109-2117, 2004.

GOMES, M.A.G. Influência da desnutrição energético-protéica no processo de translocação bacteriana em modelo experimental de obstrução intestinal. Faculdade de Farmácia da UFMG, 2005. 72 p. (Dissertação, Mestrado em Ciência de Alimentos).

GRIMBLE, R.F.; GRIMBLE, G.K. Immunonutrition: role of sulfur amino acids, related amino acids and polyamines. *Nutrition*, v. 14, p. 605-610, 1998.

GURBUZ, A.T.; KUNZELMAN, J.; RATZER, E.E. Supplemental dietary arginine accelerates intestinal mucosal regeneration and enhances bacterial clearance following radiation enteritis in rats. *Journal of Surgical Research*, v. 74, p. 149-154, 1998.

HAILE, L.A.; WASIELEWSK, R.V.; GAMREKELASHVILI, J.; KRÜGER, C.; BACHMANN, O.* WESTENDORF, A.M.; BUER, J.; ROLAND, L.; MANNS, M.P.; KORANGY, F.; GRETEN, T.F. Myeloid-Derived Suppressor Cells in Inflammatory Bowel Disease: A New Immunoregulatory Pathway. *Gastroenterology*, v. 135, p.871–881, 2008.

HALLEMEESCH, M.M.; LAMERS, W.H.; DEUTZ, N.E.P. Reduced arginine availability and nitric oxide production. *Clinical Nutrition*, v. 21, p. 273-279, 2002.

HARDY, I.; ALANY R, RUSSELL, B.; HARDY, G. Antimicrobial effects of arginine and nitrogen oxides and their potential role in septicemia. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*, v. 9, p. 22-232, 2006.

HUA, T.C; MOOCHHALA S.M. Role of nitric oxide in hemorrhagic shock-induced bacterial translocation. *Journal of Surgical Research*, v. 93. p. 247-256, 2000.

HURT, R.T.; MATHESON, P.J.; MAYS, M.P.; GARRISON, R.N. Immune-Enhancing Diet and Cytokine Expression During Chronic Sepsis: An Immune-Enhancing Diet Containing L-Arginine, Fish Oil, and RNA Fragments Promotes Intestinal Cytokine Expression During Chronic Sepsis in Rats. *Journal of Gastrointestinal Surgery*, v. 10, p. 46-53, 2006.

KALIL, A.C.; DANNER, R.L. L- arginina supplementation in sepsis: beneficial or harmful? *Current Opinion Critical Care*, v. 12. p. 303-308, 2006.

KOBAYASHI, T.; YAMAMOTO, M.; HIROI, T.; MCGHEE, J.; TAKESHITA, Y.; KIYONO, H. Arginine enhances induction of T Helper 1 and T Helper 2 cytokine synthesis by Peyer's Patch $\alpha\beta$ T cells and antigen – specific mucosal immune response. *Bioscience Biotechnology Biochemistry*, v. 62, p. 2334 – 2340, 1998.

KOLIOS, G.; VALATAS, V.; WARD, S. Nitric inflammatory bowel disease: a universal messenger in an unsolved puzzle. *Immunology*, v. 113, p. 427-437, 2004.

KUBES, P.; McCAFFERTY, D.M. Nitric oxide and intestinal inflammation. *The American Journal of Medicine*, v. 109, p. 150-158, 2000.

KUDSK, K.A. Current aspects of mucosal immunology and its influence by nutrition. *The American Journal of Surgery*, v. 183, p. 390-398, 2002.

LARDY, H.; MOUILLÈ, B.; THOMAS, M.; DARCY-VRILLON, B.; VAUGELADE, P.; BLACHIER, F.; BERNARD, F.; CHERBUY, C.; ROBERT, V.; CORRIOL, O.; RICOUR, C.; GOULET, O.; DUÉE, P; COLOMB, V. Enterocyte metabolism during early adaptation after extensive intestinal resection in a rat model. *Surgery*, v. 135, p. 649-656, 2004.

LARQUÉ E.; MOLINA-SABATER, M.; ZAMORA, S. Biological significance of dietary polyamines. *Nutrition*, v. 23, p. 87-95, 2007.

LECLEIRE, S.; HASSAN, A.; ANTONIETTI, M.; MARION, R.; SAVOYE, G.; LEREBOURS, E. et al. Glutamine combined with arginine decrease gut inflammation in

biopsies from patients with active colonic Crohn's disease. *Gastroenterology*, v. 134, p. A-229, 2008

LEVY, R.M.; PRINCE, J.M.; BILLIAR, T.R. Nitric oxide. A clinical primer. *Critical Care Medicine*, v. 33, p. S492-S495, 2005.

LI, L.; RAO, J.N.; GUO, X.; LIU, L.; SANTORA, R.; BASS, B.L.; WANG, J.Y. Polyamine depletion stabilizes p53 resulting in inhibition of normal intestinal epithelial cell proliferation. *American Journal of Cell Physiology*, v. 281, p. C941-C953, 2001.

LICHTMAN, S.M. Bacterial translocation in humans. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, v. 33, p. 1-10, 2001.

LIMA, A.S., GLÓRIA, M.B.A. Aminoácidos bioativos em alimentos. *Bol. Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v.33, p.70-79, 1999.

LÓPEZ, A.; LORENTE, J.A.; STEINGRUB, J.; BAKKER, J.; MCLUCKIE, A.; WILLATTS, S.; BROCKWAY, M; ANZUETO, A; HOLZAPFEL, L.; BREEN, D.; SILVERMAN, M.S.; TAKALA, J.; DONALDSON, J.; ARNESON, C.; GROVE, G; GROSSMAN, S.; GROVER, R. Multiple-center, randomized, placebo-controlled, double-blind study of the nitric oxide synthase inhibitor 546C88: Effect on survival in patients with septic shock. *Critical Care Medicine*, v. 32, p. 21-30, 2004.

LUIKING, Y.C.; POEZE, M.; RAMSAY, G.; DEUTZ, N.E.P. The role of arginine in infection and septicemia. *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition*, v. 29, p. S70-S74, 2005.

LUIKING, Y.C.; POEZE, M.; RAMSAY, G.; DEUTZ, N.E.P. Reduced citrulline production in sepsis is related to diminished de novo arginine and nitric oxide production. *The American Journal of Clinical Nutrition*, v. 89, p. 142-152, 2009

MACFIE, J. Enteral Versus Parenteral Nutrition: the significance of bacterial translocation and gut-barrier function. *Nutrition*, v. 16, p. 606-611, 2000.

MAKARENKOVA VP, BANSAL V, MATTA BM, PEREZ LA, OCHOA JB. CD11b+/Gr-1+ myeloid suppressor cells cause T cell dysfunction after traumatic stress, v. 176, p. 2085-2094; 2006.

MAÑÉ, J.; FERNÁNDEZ-BAÑARES, F.; OJANGUREN, I.; CASTELLÁ, E.; BERTRÁN, X.; BARTOLÍ, R.; ALVAREZ, M; GASSULL, M.A. Effect of L-arginine on the course of experimental colitis. *Clinical Nutrition*, v. 20, p. 415-422, 2001.

MATHESON, P.J.; HURT, R.T.; MITTEL, O.L., WILSON, M.A.; SPAIN, D.A.; GARRISON, N. Immune-enhancing enteral diet increase blood flow and proinflammatory cytokines in rat ileum. *Journal of Surgical Research*, v. 110, p. 360-370, 2003.

MCCAFFERTY, D.M.; MUDGETT, J.S.; SWAIN, M.G.; KUBES, P. Inducible nitric oxide synthase plays a critical role in resolving intestinal inflammation. *Gastroenterology*, v. 112, p. 1022–1027, 1997

MELDRUM, D.R.; SHAMES, B.D. ; MENG, X.; FULLERTON, D.A.; MCINTYRE JR, R.C.; GROVER, F.L.; HARKEN, A.H. Nitric oxide downregulates lung macrophage inflammatory cytokine production. *The Annals of Thoracic Surgery*, v. 66, p. 313-317, 1998.

MENG, Q. CHOUDRY, H.A.; SOUBA, W.W.; KARINCH, A.M.; HUANG, F.L.; LIN, C.M. et al. Regulation of amino acid arginina transport by lipopolysaccharide and nitric oxide in intestinal epithelial IEC-6 cell. *Journal of Gastrointestinal Surgery*, v. 9, p. 1276-1285; 2005.

MIKI, S.; TAKEYAMA, N.; TANAKA, T.; NAKATANI, T. Immune dysfunction in endotoxemia: Role of nitric oxide produced by inducible nitric oxide synthase. *Critical Care Medicine*, v. 33, p.716-720, 2005.

MOINARD C.; CYNOBER, L.; DE BANDT, J.P. Polyamines: metabolism and implications in human diseases. *Clinical Nutrition*, v. 24, p. 184-197, 2005.

MORI, M.; GOTOH, T. Arginine metabolic enzymes, nitric oxide and infection. *The Journal of Nutrition*, v.137, p. 2820S-2825S, 2004.

NAUSCH N.; GALANI I.E.; SCHLECKER, E.; CERWENKA, A. Mononuclear myeloid-derived "suppressor" cells express RAE-1 and activate natural killer cells. *Blood*, v. 112, p. 4080-4089, 2008.

NETEA, M.G.; VAN DER MEER, J.M.W.; VAN DEUREN, M.; KULLBERG, B.J. Proinflammatory cytokines and sepsis syndrome: not enough, or too much of a good thing? *TRENDS in Immunology*, v. 24, p. 254 – 258, 2003.

NIEVES JR, C.; LANGKAMP-HENKEN, B. Arginine and immunity: a unique perspective. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, v. 56, p. 471-482, 2002.

NIKOLIC, J.; STOJANOVIC, I.; PAVLOVIC, R.; SOKOLOVIC, D.; BJELAKOVIC, G.; BENINATI, S. The role of L-arginine in toxic liver failure: interrelation of arginase, polyamine catabolic enzymes and nitric oxide synthase. *Amino Acids*, v. 32, p.127-131, 2007.

NOGUCHI, Y.; MEYER, T.A.; TIAO, G.; FISCHER, J.E.; HASSELGREN, P.O. Influence of septicemia and endotoxemia on polyamines metabolism in mucosa of small intestine in rats. *Metabolism*, v. 45, p. 28-33, 1996.

NORMANA, K.; PICHARDB, C.; LOCHSA H.; PIRLICHA, M. Prognostic impact of disease-related malnutrition. *Clinical Nutrition* v. 27, p.5–15, 2008.

O'BOYLE, C.J.; MACFIE, J.; DAVE, K.; SAGAR, P.S.; POON, P.; MITCHELL, C.J. Alterations in intestinal barrier function do not predispose to translocation of enteric bacteria in gastroenterologic patients. *Nutrition*, v. 14, p. 358-362, 1998.

OCHOA, J.B.; ANDREW, C.B.; O'BRIEN, W.E.; GRIFFEN, M.M.; MALEY, M.E.; ROCKICH, A.K.; TSUEI, B.J.; BOULANGER, B.R.; KEARNEY, P.A.; MORRIS, S.M. Arginase I expression and activity in human mononuclear cells after injury. *Annals of Surgery*, v. 233, p. 393-399, 2001.

OCHOA, J.B.; MAKARENKOVA, V.; BANSAL, V. A rational use of immune enhancing diets: when should we use dietary arginine supplementation. *Nutrition in Clinical Practice*, v. 19, p. 216-225, 2004.

OGATA, Y.; NISHI, M.; NAKAYAMA, H. KUWAHARA, T. OHNISHI, Y.; TASHIRO, S. Role of bile in intestinal barrier function and its inhibitory effect on bacterial translocation in obstructive jaundice in rats. *Journal of Surgical Research*, v.115, p. 18-23, 2002.

OLIVEIRA, M.A.; LEMOS, D.S. DINIZ, S.O.F.; COELHO, J.V.; CARDOSO, V.N. Prevention of bacterial translocation using glutamine: a new strategy of investigation. *Nutrition*, v. 22, p. 419-424, 2006.

OSAOWSKA, S.; NEVEUX, N.; NAKIB, S.; LASSERRE, V.; CNOBER, L.; MOINARD, C. Impairment of arginina metabolism in rats after massive intestinal resection: effect of parenteral nutrition supplemented nutrition with citrulline compared with arginina. *Clinical Science*, v. 115, p. 159-166, 2008.

PEDOTO, A.; TASSIOPOULOS,A.; OLER, A.; McGRAW,D.; HOFFMANN,S.; CAMPORESI, E.; HAKIM, T. Treatment of septic shock in rats with nitric oxide synthase inhibitors and inhaled nitric oxide. *Critical Care Medicine*, v. 26, p. 2021-2028, 1998.

PERANZONI, E.; MARIGO, I.; DOCETTI, L.; UGEL. S.; SONDA, N.; TASCHIN, E.; MANTELLI, B.; BRONTE, V.; ZANOVELLO, P. Role of arginine metabolism in immunity and immunopathology. *Journal of Immunobiology*, v. 212, p. 795-812, 2007.

PETERSSON, J.; SCHREIBER, O.; STEEGE, A.; PATZAK, A.; HELLSTEN, A.; PHILLIPSON, M.; HOLM. L. eNOS involved in colitis-induced mucosal blood flow increase. *The American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*, v. 293, p. G1281–G1287, 2007.

PITMAN R.S.; BLUMBERG, R.S. Intestinal epithelial cells and mucosal immunity. *Journal of Gastroenterology*, v. 35, p. 805-814. 2000.

POEZE M, BRUINS MJ, KESSELS F, LUIKING YC, LAMERS WH, DEUTZ NE. Effects of L-arginine pretreatment on nitric oxide metabolism and hepatosplanchnic perfusion

during porcine endotoxemia. *American Journal of Clinical Nutrition*, v. 96, p. 1237 – 1247, 2011.

POPOVIC, P.J.; ZEH, H.J.; OCHOA, J.B. Arginine and Immunity. *The Journal of Nutrition*, 137: 1681S–1686S, 2007.

PORRAS M.; MARTÍN, MT.; YANG, P.C.; JURY, J.; PERDUE, M.H.; VERGARA, P. Correlation between cyclical epithelial barrier dysfunction on bacterial translocation in the relapses of intestinal inflammation. *Inflammatory Bowel Diseases*, v. 12, p. 843-852, 2006.

PREISER, J.C.; LUIKING, Y.; DEUTZ, N. Arginine and sepsis: a question of the right balance? *Critical Care Medicine*, v. 39, p. 1569-1570, 2011.

QUIRINO, I.E.P.; CORREIA, M.I.T.D.; CARDOSO, V.N. The impact of arginine on bacterial translocation in an intestinal obstruction model in rats. *Clinical Nutrition*, v. 26, p. 335-3450, 2007.

RAYES, N.; HANSEN, S.; SEEHOFER, D.; MULLER, A.R.; SERKE, S.; BENGMARK, S.; NEUHAUS, P. Early enteral supply of fiber and lactobacilli versus conventional nutrition: a controlled trial in patients with major abdominal surgery. *Nutrition*, v. 18, p. 609-615, 2002.

REZENDE, T. M. B.; VIEIRA, L. Q.; CARDOSO, F. P.; OLIVEIRA, R. R.; DE OLIVEIRA MENDES, S. T. JORGE, M. L. R.; RIBEIRO SOBRINHO, A. P. The effect of mineral trioxide aggregate on phagocytic activity and production of reactive oxygen, nitrogen species and arginase activity by M1 and M2 macrophages. *International Endodontic Journal*, v. 40, p. 603–611, 2007

RHODEN, D.; MATHESON, P.J.; CARRICATO, N.D.; SPAIN, D.A; GARRISON, R.N. Immune-enhancing enteral diet selectively augments ileal blood flow in the rat. *Journal of Surgical Research*, v. 106, p. 25-30, 2002.

RODRIGUEZ, P.C.; OCHOA, A. C. Arginine regulation by myeloid derived suppressor cells and tolerance in cancer: mechanisms and therapeutic perspectives. *Immunological Reviews*, v. 222, 180–191, 2008.

RODRIGUEZ, P.C.; ZEA, A., H.; CULOTTA, K.S.; ZABALETA, J.; OCHOA, J.B.; OCHOA, A.C. Regulation of T cells receptor CD3 ζ chain expression by L-arginine. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 277, p. 21123-21129, 2002.

RODRIGUEZ, P.C.; ZEA, A.H.; DESALVO, J.; CULOTTA, K.S.; ZABALETA, J.; QUICENO, D.G.; OCHOA, J.B.; OCHOA, A.C. L- arginine consumption by macrophages modulates the expression of CD3 ζ chain in T lymphocytes. *The Journal of Immunology*, v. 17, p. 1232-1239, 2003.

RUAN, X.; SHI, H.; XIA, G.; XIAO, Y.; DONG, J.; MING, F.; WANG, S. Encapsulated Bifidobacteria reduced bacterial translocation in rats following hemorrhagic shock and resuscitation. *Nutrition*, v. 23 p. 754–761, 2007

RUIZ-SILVA, M.; SILVA, R.M., MENCHACA -DIAZ, J.L.; SIQUEIRA, A.F.R.S BUZZUTTI, F.I.; SILIANO, P.R; TAJIKI, M.H.; SALOMÃO, R.; FAGUNDES-NETO, U.; MORAIS, M.B.; KOH, I.H.J. Substantial changes in the intestine-derived lymph during bacterial translocation. *Transplantation Proceedings*, v. 34, p. 1001-1002, 2002.

SALVALLAGIO, P. R. O., NETO, C. Z., TOLAZZI, A. R. D., GASPARETTO, E. L., COELHO, J. C. U., CAMPOS, A. C. L. Oral glutamine does not prevent bacterial translocation in rats subjected to intestinal obstruction and *Escherichia coli* challenge but reduces systemic bacteria spread. *Nutrition*, v.18, p. 334-337, 2002.

SAMEL, S.; KEESE, M.; KLECZKA, M.; LANIG, S.; GRETZ, N.; HANFNER, M.; STURM, J.; POST, S. Microscopy of bacterial translocation during small bowel obstruction and ischemia in vivo – a new animal model. *BMC Surgery*, v. 2, p. 6-11, 2002.

SAMEL, S.; KEESE, M.; KLECZKA, M.; LANIG, S.; GRETZ, N.; HANFNER, M.; STURM, J.; POST, S. Supplementation and inhibition of nitric oxide synthesis

influences bacterial transit time during bacterial translocation in rats. *Shock*, v. 19, p. 378-382, 2003.

SANTOS, R.G.C.; VIANA, M.L.; GENEROSO, S.V.; ARANTES, R.M.E.; CORREIA, M.I.T.D.; CARDOSO, V.N. Glutamine Supplementation Decreases Intestinal Permeability and Preserves Gut Mucosa Integrity in an Experimental Mouse Model. *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition*, v. 34, p. 408-413, 2010.

SASAKI, M; BHARWANI, S.; JORDAN, P.; ELROD, J.W.; GRISHAM, M.B.; JACKSON, T.H.; LEFER, D.J.; STEVEN ALEXANDER, J. Increased disease activity in eNOS-deficient mice in experimental colitis. *Free Radical Biology & Medicine*, v. 35, p. 1679-1687, 2003.

SAWAI, T.; GOLDSTONE, N.; DRONGOWSKI, R.A. Effect of secretory immunoglobulin A on bacterial translocation in an enterocyte-lymphocyte co-culture model. *Pediatric Surgery International*, v. 17, p. 275-279, 2001.

SCHLEIFFER, R.; RAUL, F. Prophylactic administration of L-arginina improves the intestinal barrier after mesenteric ischemia. *Gut*, v. 39, p. 194-198; 1996.

SEEHOFER, D.; RAYES, N.; SCHILLER, R.; STOCKMANN, M.; MULLER, A.R.; SCHIRMEIER, A.; SCHAEFER, F.; TULLIUS, S.G.; BENGMARK, S.; NEUHAUS, P. Probiotics partly reverse increase bacterial translocation after simultaneous liver resection and colonic anastomosis in rats. *Journal of Surgical Research*, v. 117, p. 262-271, 2003

SHANG, H.F.; TSAI, H.J; CHIU, W.C.; YEH, S.L. Effects of dietary arginine supplementation on antibody production and antioxidant enzyme activity in burned mice. *Burns*, v. 29, p. 43-48, 2003.

SHANG, H.F.; WANG, Y.Y.; LAI, Y.N.; CHIU, W.C.; YEH, S.L. Effects of arginine supplementation on mucosal immunity in rats with septic peritonitis. *Clinical Nutrition*, v. 23, p. 561-569, 2004.

SHANG, H.F.; HSU, C.S.; YEH, C.L.; PAI, M.H.; YEH, S.L. Effects of arginine supplementation on splenocyte cytokine mRNA expression in rats with gut-derived sepsis. *World Journal of Gastroenterology*, v. 11, p. 7091-7096, 2005.

SHILS, M.E.; OLSON, J.A.; SHIKE, M.; ROSS, A.C. Tratado de nutrição moderna na saúde e na doença. 9 ed. Barueri: Manole, 2003.

SILVA, R.M; BUZZUTTI, F.I.; SILIANO, P.R.; MENCHACA -DIAZ, J.L.; SIQUEIRA, A.F.R.S.; KOH, I.H.J. Bacterial translocation is dependent on bacterial plasmid-borne genetic determinants. *Transplantation Proceedings*, v. 34, p. 999-1000, 2002.

SIMSEK, I.; REFIK, M.; YASAR, M.; OZYURT, M.; SAGLAMKAYA, U.; DEVECI, S.; COMERT, B.; BASUSTAOGU, A.; KOCABALKAN, F. Inhibition of inducible nitric oxide synthase reduces bacterial translocation in a rat model of acute pancreatitis. *Pâncreas*, v. 23, p. 296-301, 2001.

STALLION, A.; KOU, T.D.; LATIFI, S.Q.; MILLER, K.A.; DAHMS, B.B.; DUDGEON, D.L.; LEVINE, A.D. Ischemia / reperfusion: a clinically relevant model of intestinal injury yielding systemic inflammation. *Journal of Pediatric Surgery*, v. 40, p. 470-477, 2005.

STEINBERG, S.M. Bacterial Translocation: what it is and what it is not. *The American Journal of Surgery*, v. 186, p. 301-305, 2003.

STRUNK, V.; HAHNENKAMP, K.; SCHNEUING, M.; FISCHER, L.G.; RICH, G.F. Selective iNOS inhibition prevents hypotension in septic rats while preserving endothelium-dependent vasodilation. *Anesthesia and Analgesia*, v. 92, p.681-687, 2001.

SUCHNER, U; HEYLAND, D.K.; PETER, K. Immune-modulatory actions of arginine in the critically ill. *British Journal of Nutrition*, v. 87, p. S121-S132, 2002.

SUGIURA, T.; TASHIRO, T.; YAMAMORI, H.; TAKAGI, K.; HAYASHI, N.; ITABASHI, T.; TOYODA, Y.; SANO, W.; NITTA, H.; HIRANO, J.; NAKAJIMA, N.; ITO, I. Effects of

total parenteral nutrition on endotoxin translocation and extent of the stress response in burned rats. *Nutrition*, v. 15, p. 570-575, 1999.

SUKHOTNIK, I.; MOGILNER, J.; KRAUSZ, M.M.; LURIE, M.; HIRSH, M.; CORAN, A.G.; SHILONI E. Oral arginine reduces gut mucosal injury caused by lipopolysaccharide in rat. *Journal of Surgical Research*, v. 122, p. 256-262, 2004.

SUNDRANI, R.; EASINGTON, C.R.; MATTOO, A.; PARRILLO, J.E., HOLLENBERG, S.M. Nitric oxide synthase inhibition increases venular leukocyte rolling and adhesion in septic rats. *Critical Care Medicine*, v. 28, p. 2898-2903, 2000.

SWANK, G.M.; DEITCH, E.A. Role of the gut in multiple organ failure: bacterial translocation and permeability changes. *World Journal of Surgery*, v. 20, p. 411-417, 1996.

TANAKA H.; MIYAZAKI S.; SUMIYAMA Y.; KAKIUCHI, T. Role of macrophages in a mouse of postoperative MRSA enteritis. *Journal of Surgical Research*, v. 118, p. 144-121, 2004.

THIEMERNANN, C. Nitric oxide and septic shock. *General Pharmacology: The Vascular System*, v. 29, p. 159-166, 1997.

TSAI, H.J.; SHANG, H.F; YEH, C.L.; YEH, S.L. Effects of arginine supplementation on antioxidant activity and macrophages response in burned mice. *Burns*, v. 28, p. 258-263, 2002.

UCHIDA, K.; MISHIMA, S.; OHTA, S.; YUKIOKA, T. Inhibition of inducible nitric oxide synthase ameliorates lung injury in rats after gut ischemia-reperfusion. *The Journal of Trauma*, v. 63, p. 603-607, 2007.

ULUSOY, H.; USUL, H.; AYDIN, S; KAKLIKKAYA, N.; COBANOGLU, U.; REIS, ABDULKADIR; AKYOL, A.; OZEN, I. Effects of immunonutrition on intestinal mucosal

apoptosis, mucosal atrophy and bacterial translocation in head injured rats. *Journal of Clinical Neuroscience*, v. 10, p. 596-601, 2003.

VALLANCE, B.A.; DIJKSTRA, G.; QIU, B.; VAN DER WAAIJ, L.A.; GOOR, H.V. JANSEN, P.L.M.; MASHIMO, H.; COLLINS, S.M. Relative contributions of NOS isoforms during experimental colitis: endothelial-derived NOS maintains mucosal integrity. *The American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*, v. 287, p. G865–G874, 2004.

VAN DER VEE, R. C. Nitric oxide and T helper cell immunity. *International Immunopharmacology*, v. 1, p. 1491-1500, 2001.

VIANA, M.L., SANTOS, R.G.C.; GENEROSO, S.V.; ARANTES, R.M.E.; CORREIA M.I.T.D.; CARDOSO, V.N. Pretreatment with arginine preserves intestinal barrier integrity and reduces bacterial translocation in mice. *Nutrition*, v. 26, p. 218-223, 2010.

WANG J.Y. Polyamines and mRNA stability in regulation of intestinal mucosal growth. *Amino acids*, v. 33, p. 241-252, 2007.

WELL, S.M.; HOLIAN, A. Asymmetric Dimethylarginine Induces Oxidative and Nitrosative Stress in Murine Lung Epithelial Cells. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, v. 36, p. 520-528, 2007

WIEST, R.; RATH, H.C. Bacterial translocation in the gut. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, v. 17, p. 397- 425, 2003.

WOODCOCK, N.P.; ROBERTSON, J.; MORGAN, D.R.; GREGG, K.L.; MITCHELL, C.J.; MACFIE, J. Bacterial translocation and immunohistochemical measurement of gut immune function. *Journal of Clinical Pathology*, v. 54. p. 619-623, 2001.

WU, C.C.; RUETTEN, H.; THIEMERMANN, C. Comparison of the effects of aminoguanidine and N^o -nitro-L-arginine methyl ester on the multiple organ dysfunction

caused by endotoxemia in the rat. *European Journal of Pharmacology*, v. 300, p. 99-104, 1996.

WU, G.; BAZER, F.W.; DAVIS, T.A.; KIM, S.W.; LI, P.; RHOADS, M.; SATTERFIELD, M. C.; SMITH, S.B.; SPENCER, T.E.; YIN, Y. Arginine metabolism and nutrition in growth, health and disease. *Amino Acids*, v. 37, p. 153-168; 2009.

WU, Y.; KUDSK, K.A.; DEWITT, R.C.; TOLLEY, E.A. LI, J. Route and type of nutrition influence IgA- mediating intestinal cytokines. *Annals of Surgery*, v. 229, p. 662-668, 1999.

YAMAUCHI, K; KOMATSU, T.; KULKARNI, A.D.; OHMORI, Y.; MINAMI, H.; USHIYAMA, Y.; NAKAYAMA, M.; YAMAMOTO, S. Glutamine and arginine affect Caco-2 cell proliferation by promotion of nucleotide synthesis. *Nutrition*, v. 18, p. 329-333, 2002.

YEH, C.L. Specific nutrient: role of arginine in septicemia. *Nutrition*, v. 20, p. 581-582, 2004.

ZALOGA, G.P.; SIDDIQUI, R.; TERRY C.; MARIK, P.E. Arginine: mediator or modulator of septicemia? *Nutrition in Clinical Practice*, v. 19, p. 201-215, 2004.

ZHANG, X.P.; ZHANG, J.; SONG, Q.; CHEN, H. Mechanism of acute pancreatitis complication with injury of intestinal barrier. *Journal of Zhejiang University Science B*, v. 12; p. 888-895; 2007.

ZULFIKAROGLU, B.; ZULFIKAROGLU, E.; OZMEN, M.M.; OZALP, N.; BERKEM, R.;ERDOGAN, S.; BESLER, H.T.; KOC, M.; KORKMAZ, A. The effect of immunonutrition on bacterial translocation and intestinal villus atrophy in experimental obstructive jaundice. *Clinical Nutrition*, v. 22, p. 277-281, 2003.

7. ANEXO



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL
- C E T E A -

CERTIFICADO

Certificamos que o **Protocolo nº 111/2008**, relativo ao projeto intitulado "**Ação da arginina sobre a resposta imunológica frente à translocação bacteriana em modelo de obstrução intestinal**", que tem como responsável(is) **Maria Isabel Toulson Davisson Correia**, está(ão) de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pelo **Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA/UFMG)**, tendo sido aprovado na reunião de **13/ 08/2008**.

Este certificado expira-se em **13/ 08/ 2013**.

CERTIFICATE

We hereby certify that the **Protocol nº 111/2008**, related to the project entitled "**Effects of arginine on immune response front of bacterial translocation in intestinal obstruction model**", under the supervisors of **Maria Isabel Toulson Davisson Correia**, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the **Ethics Committee in Animal Experimentation (CETEA/UFMG)**, and was approved in **August 13, 2008**.

This certificate expires in **August 13, 2013**.

Belo Horizonte, 18 de Agosto de 2008.

Prof. Humberto Pereira Oliveira
Coordenador do CETEA/UFMG

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 - Campus Pampulha
Unidade Administrativa II - 2º Andar, Sala 2005
31270-901 - Belo Horizonte, MG - Brasil
Telefone: (31) 3499-4516 - Fax: (31) 3499-4592
www.ufmg.br/bioetica/cetea - cetea@prpq.ufmg.br

