

**MARINA ANDRADE BATISTA**

**EFEITOS DA L-CITRULINA NO PROCESSO DE  
TRANSLOCAÇÃO BACTERIANA E NA  
PERMEABILIDADE INTESTINAL EM MODELO  
EXPERIMENTAL DE OBSTRUÇÃO INTESTINAL**

**Faculdade de Farmácia da UFMG  
Belo Horizonte, MG  
2010**

**MARINA ANDRADE BATISTA**

**EFEITOS DA L-CITRULINA NO PROCESSO DE  
TRANSLOCAÇÃO BACTERIANA E NA  
PERMEABILIDADE INTESTINAL EM MODELO  
EXPERIMENTAL DE OBSTRUÇÃO INTESTINAL**

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

Orientador: Prof. Dr. Valbert Nascimento Cardoso

Co-orientadora: Profa. Dra. Maria Isabel Toulson  
Davisson Correia

**Faculdade de Farmácia da UFMG  
Belo Horizonte, MG  
2010**



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS-  
FACULDADE DE FARMÁCIA  
DEPARTAMENTO DE ALIMENTOS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DE ALIMENTOS

**MARINA ANDRADE BATISTA**

**“EFEITOS DA L-CITRULINA NO PROCESSO DE TRANSLOCAÇÃO  
BACTERIANA E NA PERMEABILIDADE INTESTINAL EM MODELO  
EXPERIMENTAL DE OBSTRUÇÃO INTESTINAL”**

**APROVADA EM 11 DE JUNHO DE 2010**

**COMISSÃO EXAMINADORA**

**Profa. Dra. JACQUELINE ISAURA ALVAREZ LEITE**

**Prof. Dr. EDUARDO GARCIA VILELA**

**Profa. Dra. MARIA ISABEL TOULSON DAVISSON CORREIA**  
Co-Orientadora

**Prof. Dr. VALBERT NASCIMENTO CARDOSO**  
Orientador

*Dedico este trabalho a minha família e aos meus amigos, pois sem eles a vida não teria significado tão belo e precioso.*

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por me conduzir todos os dias pelo melhor caminho e me mostrar que tudo Nele posso.

Aos animais, com a certeza de que o sacrifício não foi em vão.

Ao meu orientador Valbert Nascimento Cardoso, por compartilhar seus conhecimentos e possibilitar todas as condições para a execução deste trabalho.

A minha co-orientadora Maria Isabel Toulson Davisson Correia, por enriquecer este trabalho com sua competência, sugestões e conforto na superação das dificuldades.

Aos professores Jacques Robert Nicoli, José Augusto Nogueira Machado e Rosa Maria Esteves Arantes, por disponibilizarem material, tempo e pessoal para as análises em seus laboratórios.

À Profa. Simone Odília Diniz, pela atenção no laboratório.

Aos colegas do laboratório, Talita, Luciene, André, Iara, Mirelle, Rosana e Simone, pela paciência, conselhos, ensinamento das técnicas e companhia nas atividades do dia-a-dia.

Aos alunos da Iniciação Científica, principalmente Leo e Carol e à funcionária Etna pelo auxílio em momentos de aperto.

Aos funcionários do biotério, Adelaide e Batista, sempre dispostos a ajudar.

A todos os amigos e colegas de mestrado, em especial Kátia e Letícia, que vivenciaram as experiências comigo e tornaram mais fácil essa caminhada.

Aos meus pais, Agnaldo e Maria de Lourdes, por estarem ao meu lado em mais uma etapa cumprida e serem exemplo de luta durante a trajetória da minha formação profissional.

A minha irmã Lucila, por acreditar mais em mim do que eu mesma.

Aos tios, primos e avós, pela confiança e amor em mim depositados.

Ao meu namorado Breno, pelo carinho, compreensão, apoio e incentivo em todos os momentos.

Aos meus novos e velhos amigos, que estiveram presentes, mesmo aqueles distantes.

Aos LABORATÓRIOS BALDACCI, pelo fornecimento da citrulina.

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

E a todos que participaram e contribuíram de alguma maneira para o aperfeiçoamento e conclusão deste trabalho.

*“É melhor atirar-se à luta em busca de dias melhores, mesmo correndo o risco de perder tudo, do que permanecer estático como os pobres de espírito, que não lutam, mas também não vencem porque não conhecem a dor da derrota nem a glória de ressurgir dos escombros. Esses pobres de espírito, ao final de sua jornada na Terra, não agradecem a Deus por terem vivido, mas desculpam-se perante Ele, por terem apenas passado pela vida”.*

Bob Marley

# SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS</b>	<b>10</b>
<b>LISTA DE TABELAS</b>	<b>11</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS</b>	<b>12</b>
<b>RESUMO</b>	<b>14</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>15</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>16</b>
<b>2. REVISÃO DA LITERATURA</b>	<b>18</b>
<b>2.1 CITRULINA</b>	<b>18</b>
2.1.1 <b>Considerações gerais</b>	<b>18</b>
2.1.2 <b>Absorção</b>	<b>20</b>
2.1.3 <b>Metabolismo</b>	<b>21</b>
2.1.3.1 Anabolismo	<b>21</b>
2.1.3.2 Catabolismo	<b>23</b>
2.1.3.3 Metabolismo do óxido nítrico e reutilização da citrulina	<b>24</b>
2.1.4 <b>Ações biológicas e funcionais</b>	<b>25</b>
2.1.4.1 Considerações gerais	<b>25</b>
2.1.4.2 Marcador da função intestinal	<b>26</b>
2.1.4.3 Marcador da função renal	<b>26</b>
2.1.4.4 Vantagens da suplementação dietética com citrulina	<b>27</b>
<b>2.2 TRANSLOCAÇÃO BACTERIANA</b>	<b>29</b>
2.2.1 <b>Considerações gerais</b>	<b>29</b>
2.2.2 <b>Etiologia</b>	<b>31</b>
2.2.3 <b>Mecanismos de translocação bacteriana</b>	<b>32</b>
2.2.3.1 Alterações da microbiota gastrintestinal	<b>33</b>
2.2.3.2 Alterações da resposta imunológica	<b>34</b>
2.2.3.3 Alterações da barreira intestinal e permeabilidade	<b>36</b>
2.2.3.4 Métodos de avaliação da permeabilidade intestinal	<b>39</b>
<b>2.3 OBSTRUÇÃO INTESTINAL</b>	<b>41</b>
2.3.1 Considerações Gerais	<b>41</b>
2.3.2 Fisiopatologia	<b>41</b>



2.4	<b>MÉTODOS DE AVALIAÇÃO DA TRANSLOCAÇÃO BACTERIANA</b>	42
3.	<b>OBJETIVOS</b>	44
3.1	<b>OBJETIVO GERAL</b>	44
3.2	<b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b>	44
4.	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b>	45
4.1	<b>Animais</b>	45
4.2	<b>Rações</b>	45
4.2.1	Preparo e cálculo da composição nutricional das dietas suplementadas	45
4.3	<b>Tratamento</b>	46
4.4	<b>Cultivo e preparação da <i>Escherichia coli</i></b>	47
4.5	<b>Procedimento de marcação da <i>Escherichia coli</i> com <sup>99m</sup>Tecnécio</b>	47
4.6	<b>Modelo experimental de obstrução intestinal</b>	48
4.7	<b>Translocação bacteriana</b>	48
4.8	<b>Avaliação da permeabilidade intestinal</b>	49
4.9	<b>Análises histológicas</b>	49
4.10	<b>Dosagem de sIgA no fluido intestinal</b>	50
4.11	<b>Dosagem de citocinas no soro</b>	50
4.12	<b>Análises estatísticas</b>	51
5.	<b>RESULTADOS</b>	52
5.1	<b>Consumo alimentar e ganho de peso</b>	52
5.2	<b>Translocação bacteriana</b>	52
5.3	<b>Permeabilidade intestinal</b>	53
5.4	<b>Histologia do íleo terminal</b>	54
5.5	<b>Concentração de sIgA no fluido intestinal</b>	56
5.6	<b>Níveis de citocinas no soro</b>	56
6.	<b>DISCUSSÃO</b>	58
7.	<b>CONCLUSÕES</b>	65
8.	<b>PERSPECTIVAS FUTURAS</b>	66
9.	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	67
10.	<b>ANEXOS</b>	86
	<b>ANEXO I – COMPOSIÇÕES CENTESIMAIS</b>	86

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Estrutura molecular de L-citrulina e o grupo terminal ureídeo	18
<b>Figura 2</b>	Reações do ciclo da uréia	19
<b>Figura 3</b>	Síntese de citrulina	22
<b>Figura 4</b>	Metabolismo integrado da arginina, glutamina, citrulina e ornitina	24
<b>Figura 5</b>	Mecanismo de biossíntese de óxido nítrico (NO) pelo sistema óxido nítrico sintase	25
<b>Figura 6</b>	Translocação bacteriana e falência múltipla de órgãos	31
<b>Figura 7</b>	Mecanismos e componentes envolvidos no processo de translocação bacteriana	32
<b>Figura 8</b>	Tecido linfóide associado à mucosa gastrintestinal (GALT)	36
<b>Figura 9</b>	Permeabilidade intestinal dos grupos OINT, <i>Sham</i> e CIT	54
<b>Figura 10</b>	Evolução histológica do íleo terminal dos grupos <i>Sham</i> , OINT e CIT	55
<b>Figura 11</b>	Concentração de sIgA no fluido intestinal dos grupos <i>Sham</i> , OINT e CIT	56
<b>Figura 12</b>	Níveis séricos de INF- $\gamma$ dos grupos <i>Sham</i> , OINT e CIT	57
<b>Figura 13</b>	Níveis séricos de IL-10 dos grupos <i>Sham</i> , OINT e CIT	57

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b>	Composição centesimal da ração para roedores Labina®	86
<b>Tabela 2</b>	Composição centesimal de gelatina em pó incolor	86
<b>Tabela 3</b>	Composição centesimal de amido de milho	86
<b>Tabela 4</b>	Ganho de peso, consumo alimentar calórico, protéico e de nitrogênio	52
<b>Tabela 5</b>	Biodistribuição da $^{99m}\text{Tc}$ - <i>E. coli</i> nos órgãos dos diferentes grupos experimentais	53

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ARG	- Arginina
ASL	- Argininosuccinato liase
ASS	- Argininosuccinato sintetase
ATP	- Adenosina trifosfato
CD4	- Grupo 4 de diferenciação de células T
CD8	- Grupo 8 de diferenciação de células T
CIT	- Citrulina
cpm	- Contagens por minuto
DNA	- Ácido desoxirribonucléico
DTPA	- Ácido dietilenotriaminopentaacético
<i>E.coli</i>	- <i>Escherichia coli</i>
eNOS	- Óxido nítrico sintase endotelial
FAE	- Epitélio folicular associado
GALT	- Tecido linfóide associado à mucosa gastrintestinal
GLN	- Glutamina
GLN-ase	- Glutaminase
GLU	- Glutamato
GLUSAL	- Glutamato semialdeído
INF- $\gamma$	- Interferon-gama
Ig A	- Imunoglobulina A
Ig M	- Imunoglobulina M
IL	- Interleucina
iNOS	- Óxido nítrico sintase induzida
LEU	- Leucina
LPS	- Lipopolissacarídeo
MHC	- Complexo de histocompatibilidade principal
NK	- “Natural Killer”
NLM	- Nódulo linfático mesentérico
NOS	- Óxido nítrico sintase
NO	- Óxido nítrico
nNOS	- Óxido nítrico sintase neuronal
OAT	- Ornithina aminotransferase

OCT	-Ornitina carbamoiltransferase
ODC	- Ornitina descarboxilase
PAMPs	- Padrões moleculares associados aos patógenos
ORN	- Ornitina
P5CS	- Pirrolina 5-carboxilato sintase
PRO	- Prolina
PO	- Prolina oxidase
RNA	- Ácido ribonucléico
SIgA	- Imunoglobulina A secretória
TCR	- Receptor de células T
TGF- $\beta$	- Fator de crescimento transformador – $\beta$
TGI	- Trato gastrintestinal
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- $\alpha$	- Fator de necrose tumoral – $\alpha$
UFC	- Unidades formadoras de colônias
VET	- Valor energético total
$\omega$ -3	- Ácido graxo ômega-3
$^{99m}\text{Tc}$	- $^{99m}\text{Tc}$ Tecnécio
$^{99m}\text{Tc}$ -DTPA	- $^{99m}\text{Tc}$ -ácido dietilenotriaminopentacético
$^{99m}\text{Tc}$ - <i>E.coli</i>	- <i>Escherichia coli</i> marcada com tecnécio

## RESUMO

A citrulina é um aminoácido que se destaca atualmente por ser importante marcador da função intestinal, precursor da arginina e regulador do metabolismo protéico. Os efeitos da L-citrulina na translocação bacteriana e na permeabilidade intestinal foram avaliados. No estudo da translocação bacteriana, 24 camundongos machos Swiss foram separados aleatoriamente em três grupos: *Sham*, OINT e CIT. O grupo CIT recebeu 30 mg/dia de citrulina na ração suplementada e os outros grupos consumiram ração convencional. Ambas as dietas foram isocalóricas e isoprotéicas. No 8º dia, após 7 dias de tratamento, todos os animais receberam por gavagem  $10^8$  UFC/mL de  $^{99m}\text{Tc-E.coli}$ . Depois de 90 minutos, os animais foram anestesiados e operados (ligadura do íleo terminal). O grupo *Sham* sofreu apenas laparotomia mediana. Decorridas 18 horas, sangue e órgãos foram removidos para determinação da radioatividade. O fluido intestinal e o soro também foram coletados para dosagem de SIgA e citocinas, respectivamente, por ELISA. Para avaliação da permeabilidade intestinal utilizou-se o mesmo tratamento e procedimento cirúrgico nos grupos experimentais. Transcorridos 7 dias, os animais receberam 0,1 mL de  $^{99m}\text{Tc-DTPA}$  e após 90 minutos foram operados. Nos tempos de 4, 8 e 18 horas coletou-se o sangue e contou-se a radioatividade. Foram utilizados 4 animais em cada tempo investigado. Amostras de intestino foram retiradas no tempo de 18 horas para análise histológica. Os dados foram analisados pelos testes de Kruskal-Wallis e one-way ANOVA, considerando significativo  $p \leq 0,05$ . Os animais do grupo CIT apresentaram semelhante consumo alimentar ( $p > 0,05$ ) e menor ganho de peso ( $p < 0,05$ ) em relação aos demais grupos. O nível de translocação bacteriana foi maior no grupo OINT ( $p < 0,05$ ). O grupo CIT reduziu a translocação bacteriana e a permeabilidade intestinal, comparando-se com o grupo OINT ( $p < 0,05$ ). A histopatologia mostrou que a citrulina preservou a morfologia intestinal. A concentração de SIgA no fluido intestinal foi mais elevada no grupo CIT ( $p < 0,05$ ). O grupo OINT revelou os maiores níveis de INF- $\gamma$  no soro ( $p < 0,05$ ). Os níveis de IL-10 não diferiram entre os grupos ( $p > 0,05$ ). Os resultados sugerem que a citrulina diminui a translocação bacteriana, mantém a permeabilidade intestinal, melhora a resposta imunológica local, atua na preservação da integridade intestinal e parece modular a resposta imunológica sistêmica.

**PALAVRAS-CHAVE:** citrulina; translocação bacteriana; barreira intestinal; obstrução intestinal; SIgA; citocinas.

## ABSTRACT

L-CITRULLINE EFFECTS ON BACTERIAL TRANSLOCATION AND INTESTINAL PERMEABILITY IN AN EXPERIMENTAL INTESTINAL OBSTRUCTION MODEL. Citrulline is an amino acid that stands out today as being an important marker of intestinal function, precursor of arginine and regulator of protein metabolism. We evaluated the effects of L-citrulline on bacterial translocation and intestinal permeability. To study bacterial translocation, 24 Swiss male mice were divided randomly into three groups: *Sham*, IO (intestinal obstruction) and CIT. The CIT group received 30 mg/day of citrulline added to supplemented chow and the other groups fed conventional chow. Both diets were isocaloric and isoproteic. At 8<sup>th</sup> day, after 7 days of treatment, the groups received by gavage  $10^8$  CFU/mL of <sup>99m</sup>Tc-*E.coli*. After 90 min, the animals were anesthetized and underwent surgery (terminal ileum ligation). The *Sham* group underwent only laparotomy. After 18 h the animals were sacrificed. Blood and organs were removed for radioactivity determination. The intestinal fluid and serum was also collected to measure SIgA and cytokines, respectively by ELISA. To study the intestinal permeability, we used the same treatment and surgery procedure in the experimental groups. After 7 days, the animals received 0.1 mL of <sup>99m</sup>Tc-DTPA and 90 min later were operated. At 4, 8 and 18 h after this administration the blood was collected for radioactivity determination. Four animals were used to each time investigated. Intestine samples were removed 18 h after surgery for histological analysis. Data were analyzed using Kruskal-Wallis Test and one-way ANOVA, considering  $p \leq 0.05$  as significant. The animals of the CIT group showed similar food intake ( $p > 0.05$ ) and less weight gain ( $p < 0.05$ ), concerning to the other groups. The level of bacterial translocation was higher in the IO group ( $p < 0.05$ ). The CIT group reduced bacterial translocation and intestinal permeability, when compared with IO group ( $p < 0.05$ ). Histopathology showed that citrulline may preserve intestinal morphology. The concentration of sIgA in the intestinal fluid was found higher in the group treated with citrulline ( $p < 0.05$ ). IO group showed the highest levels of IFN- $\gamma$  in serum ( $p < 0.05$ ). The levels of IL-10 did not differ between the groups ( $p > 0.05$ ). The results suggest that citrulline reduces bacterial translocation, maintains intestinal permeability, improves local immune response, preserves intestinal integrity and seems to modulate systemic immune response.

KEY-WORDS: citrulline; bacterial translocation; intestinal barrier; intestinal obstruction; sIgA; cytokines.

# 1. INTRODUÇÃO

Em 1979, BERG & GARLINGTON conceituaram o processo de translocação bacteriana como a passagem de bactérias viáveis do lúmen gastrointestinal para outros órgãos. Este processo é facilitado quando há supercrescimento bacteriano no trato intestinal, o que modifica a microbiota (BERG, 1995; EL-AWADY et al., 2009). A alteração da barreira intestinal, a ação diminuída do sistema imunológico do hospedeiro e o desequilíbrio da microbiota são os principais fatores que favorecem a passagem de bactérias para sítios extra-intestinais (WELLS, 1990; EL-AWADY et al., 2009).

Pacientes críticos estão mais propensos à translocação bacteriana. Afecções tais como obstrução intestinal, icterícia obstrutiva, câncer, doenças inflamatórias intestinais, injúria isquêmica, dentre outras (WIEST & RATH, 2003) acarretam danos teciduais, aumento da permeabilidade e translocação bacteriana (DEITCH et al., 1990; MEDDAH et al., 2001; SHIOMI et al., 2007). Essas condições podem ser graves e letais, na ocorrência de sepsis e falência múltipla de órgãos (WIEST & RATH, 2003).

A resposta imunológica local mediada pela imunoglobulina A secretória (sIgA) e as citocinas liberadas pelas células de defesa modulam a permeabilidade intestinal e a translocação bacteriana. Assim, esses componentes da barreira intestinal precisam funcionar corretamente para combater antígenos luminiais e evitar inflamação crônica (LOTZ et al., 2007; AMIN et al., 2008; SANJABI et al., 2009).

Arginina, glutamina, cisteína, taurina, ácidos graxos ômega-3 e triglicerídios de cadeia média são nutrientes específicos com efeitos farmacológicos, que exercem papel na restauração da função imunológica (LOÏ et al., 2005). A arginina e a glutamina mostraram-se eficientes na redução da translocação bacteriana, em modelo experimental de obstrução intestinal em ratos (QUIRINO et al., 2007) e camundongos (SANTOS et al., 2009; VIANA et al., 2010).

Em situações de estresse, a arginina encontra-se pouco disponível. Doses elevadas são necessárias para restaurar os níveis plasmáticos de arginina e podem desencadear efeitos colaterais no trato gastrointestinal (MOINARD & CYNOBER, 2007). A citrulina é um aminoácido neutro, produto do metabolismo intermediário, que tem sido atualmente considerado como potencial imunonutriente. Isto se deve à contribuição fundamental na produção de arginina endógena, cuja conversão ocorre nos rins (CURIS et al., 2007; MOINARD & CYNOBER, 2007).

Estudos mostram que a citrulina é mais efetiva que a arginina nas mesmas concentrações (HICKNER et al., 2006; SCHWEDHELM et al., 2008), pois grande parte



da arginina é degradada pelo fígado (HICKNER et al., 2006). A citrulina não é captada pelo fígado, o que evita a formação excessiva de uréia, favorece a síntese de arginina e aumenta a disponibilidade de arginina para os tecidos (ZALOGA et al., 2004; HICKNER et al., 2006).

A citrulina é produzida no intestino principalmente a partir de glutamina, embora outros precursores possam originá-la. Tem-se indicado a utilização da citrulina como marcador da função tecidual, tanto intestinal quanto renal, em virtude das características do metabolismo. Hipóteses sobre a ação na regulação do metabolismo protéico também têm sido indicadas (CURIS et al., 2007; MOINARD & CYNOBER, 2007).

Diante das novas perspectivas associadas ao uso da citrulina e à integração metabólica com a arginina e a glutamina, a proposta deste trabalho foi avaliar a ação da citrulina no processo de translocação bacteriana e na permeabilidade intestinal, em modelo experimental de obstrução intestinal em camundongos. Ressalta-se ainda que, devido aos poucos trabalhos descritos na literatura relacionados com o emprego da suplementação com citrulina, o presente estudo reveste-se de importância e relevância para futuras aplicações tanto em pesquisa quanto na prática clínica.

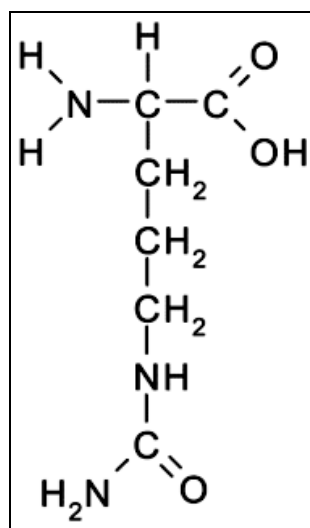
## 2. REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1. CITRULINA

#### 2.1.1. Considerações gerais

O nome “citrulina” vem do latim de melancia, *Citrullus vulgaris*, fruta que contém grande quantidade do aminoácido e de onde foi primeiramente isolada, há 70 anos (CURIS et al., 2005). Apresenta ação removedora do radical hidroxila, protegendo DNA e enzimas contra oxidação e, na melancia, é o principal agente de decomposição desse radical livre (MOINARD & CYNOBER, 2007).

A citrulina (CIT,  $C_6H_{13}N_3O_3$ ) é um  $\alpha$ -aminoácido, com características físicas e químicas bem definidas. Em temperatura e pressão ambientes, possui estrutura sólida e incolor, com ponto de fusão a 222°C. Assim como a maioria dos outros aminoácidos, possui um carbono assimétrico (dando origem a dois enantiômeros) e a forma natural é o isômero L. A citrulina também existe na forma de sais, como cloridrato (forma catiônica) (CURIS et al., 2005). A estrutura química pode ser visualizada na Figura 1.



**Figura 1.** Estrutura molecular de L-citrulina e o grupo terminal ureídeo.

O peso molecular da citrulina é de 175,19 g e as propriedades químicas resultam ainda do grupo ureídeo terminal da cadeia alifática que substitui o carbono  $\alpha$ . Este aminoácido é relativamente solúvel em água e pouco solúvel em etanol e metanol, devido à cadeia lateral polar. Pode-se observar na estrutura dois ácidos dos grupos de ácido carboxílico ( $pK_a \approx 2,4$ ) e de amina ( $pK_a \approx 9,4$ ). Sendo a citrulina um diácido, é

importante considerar que a forma neutra predominante, em condições fisiológicas, é a *zwitterion* (mais que 99,9%), com íons de carga positiva e negativa simultaneamente (CURIS et al., 2005).

Em mamíferos, a CIT é uma molécula comum do metabolismo intermediário. Contudo, até recentemente não era de interesse para a comunidade científica por ser um aminoácido não protéico e ser apenas um composto intermediário do ciclo da uréia (MOINARD & CYNOBER, 2007) (Figura 2). Um passo inédito foi dado a partir de 1980, quando WINDMUELLER & SPAETH (1981) demonstraram, em estudo com ratos, que há contínua liberação de citrulina pelo intestino delgado na circulação, realçando a complexidade do seu metabolismo.

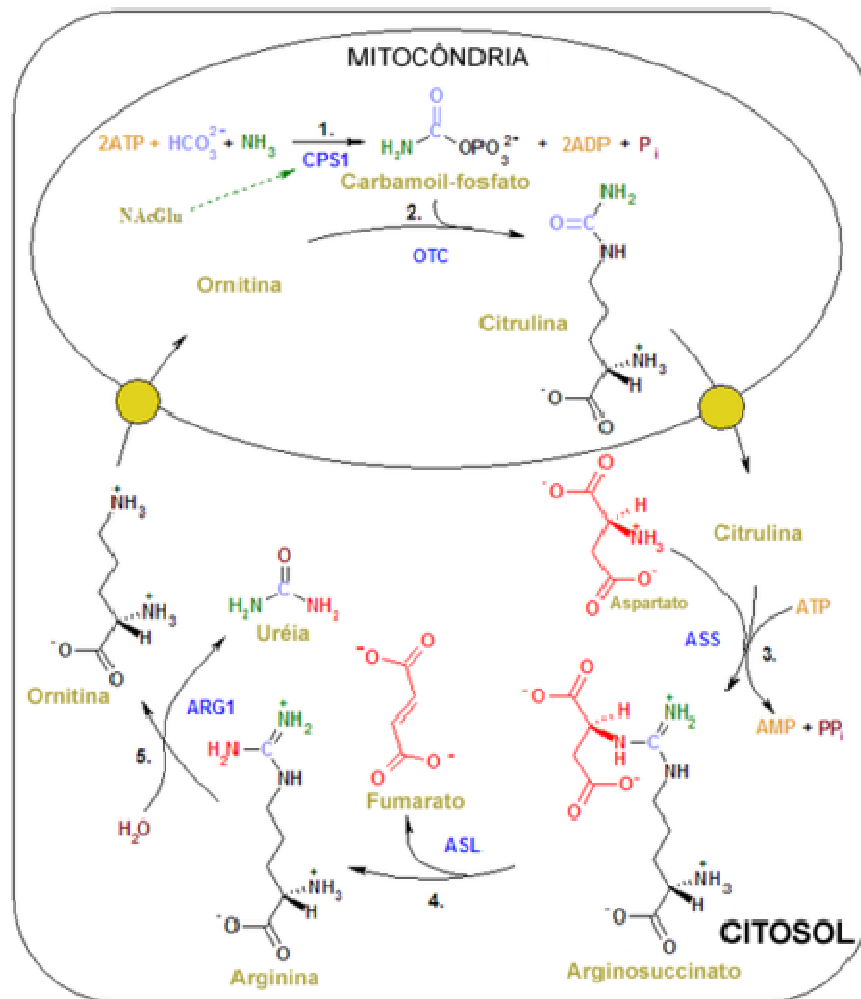


Figura 2. Reações do ciclo da uréia.

### 2.1.2. Absorção

Até o presente momento ainda não foi identificado nenhum transportador celular específico para citrulina. Muitos tipos celulares são capazes de captar citrulina e há poucas evidências de que seja por meio dos transportadores comuns de aminoácidos (CURIS et al., 2005). A citrulina contida nos alimentos é absorvida no intestino, provavelmente por mediação de um transportador. A absorção deve ser ótima entre o íleo médio e o distal, e o processo parece requerer sódio (VADGAMA & EVERED, 1992).

Recentes pesquisas realizadas com cultura de células Caco-2, derivadas de adenocarcinoma colônico humano, demonstraram que vários sistemas de transporte podem estar envolvidos na absorção da citrulina, o que é raro para aminoácidos (BAHRI et al., 2006; BAHRI et al., 2008).

Os sistemas relatados são o  $y^+$ ,  $y^+L$ ,  $B^{0,+}$  e  $b^{0,+}$ . O sistema  $y^+$  é um sistema de transporte  $Na^+$  - dependente para aminoácidos catiônicos; o sistema  $B^{0,+}$  é também  $Na^+$ -dependente; o sistema  $b^{0,+}$  é independente de  $Na^+$  e o sistema  $y^+L$  transporta aminoácidos neutros quando dependente de  $Na^+$  e aminoácidos catiônicos quando independente de  $Na^+$  (BAHRI et al., 2008).

Carreadores com grande especificidade para aminoácidos neutros também podem estar envolvidos, como aqueles pertencentes ao sistema  $B^0$  ( $Na^+$  - dependente) e ao sistema L (independente de  $Na^+$ ). O sistema L parece estar tanto presente na membrana basolateral de células epiteliais quanto na membrana apical de células Caco-2 e, na ausência de  $Na^+$ , atua em conjunto com o sistema  $b^{0,+}$  (BAHRI et al., 2008).

Pelo fato da citrulina utilizar diversos tipos de transportadores, alguns aminoácidos neutros e catiônicos podem interferir na absorção intestinal. Por outro lado, isso permite que a citrulina apresente melhor biodisponibilidade do que a arginina, por exemplo, e não induza diarreia osmótica em altas doses (BAHRI et al., 2008).

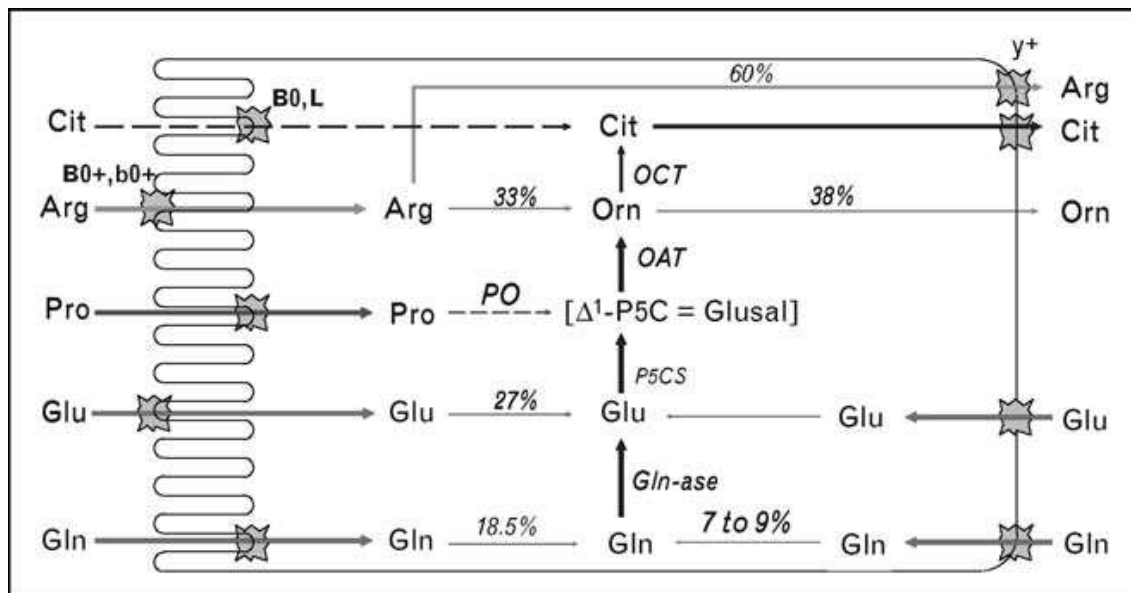
## 2.1.3. Metabolismo

### 2.1.3.1. Anabolismo

A citrulina é um aminoácido não essencial em condições fisiológicas e apresenta metabolismo único. A maior parte da citrulina circulante (80% a 90%) provém da conversão de glutamina no enterócito via glutamato, glutamato semi-aldeído e ornitina (WINDMUELLER & SPAETH, 1981; CURIS et al., 2005, CURIS et al., 2007, LIGTHART-MELIS et al., 2008), na qual a enzima mitocondrial pirrolina-5-carboxilato sintase desempenha papel essencial. A atividade máxima da enzima ocorre na mucosa duodenojejunal, quando comparada com a ileal. O cólon parece não exercer importante função na síntese da citrulina (PIRONI et al., 2006).

A produção de citrulina representa apenas 2% da via metabólica da glutamina (VAN DE POLL et al., 2007). A glutamina presente no enterócito pode vir dos alimentos ingeridos ou do pool de aminoácidos circulantes (PLAETH et al., 1999): enterócitos metabolizam entre 25% e 33% de glutamina arterial, 66% da glutamina luminal e 96% do glutamato (WU, 1998), enquanto que em ratos, cerca de 28% desse aminoácido é convertido em citrulina (WINDMUELLER & SPAETH, 1981). Outros aminoácidos também originam citrulina, a citar, o glutamato, a prolina e a arginina (CYNOBER, 2002). Em humanos, em torno de 13% da glutamina absorvida pelo intestino é convertida em citrulina (VAN DE POLL et al., 2007).

A via enzimática da biossíntese intestinal de citrulina é uma sequência complexa de pelo menos cinco enzimas na mitocôndria dos enterócitos. As enzimas-chave são OAT (ornitina aminotransferase) e a P5CS (pirrolina-5-carboxilato sintase), sendo a última expressa isoladamente na mucosa intestinal (CRENN et al., 2008), como pode ser verificado na Figura 3.



**Figura 3.** Síntese de citrulina.

Arg, arginina; Cit, citrulina; D1-P5C, D1-Lpirrolina-5-carboxilato; Gln, glutamina; Gln-ase, glutaminase; Glu, glutamato; Glusal, glutamato semialdeído; OAT, ornitina aminotransferase; OCT, ornitina carbamoiltransferase; Orn, ornitina; P5CS, D1-P5C sintase; PO, prolina oxidase; Pro, prolina. Porcentagens indicam a contribuição das diferentes vias do metabolismo de cada aminoácido. Eles estão refletivos na largura das setas. As setas tracejadas são para indicar as vias “secundárias”.  
 Fonte: CURIS et al. (2005); CURIS et al. (2007).

Duas moléculas de glutamato são necessárias para a síntese de citrulina: uma fornece o esqueleto de carbono (via P5CS) e pode ser substituída por outros aminoácidos como a prolina, enquanto que a segunda fornece o grupo amino terminal (via reação direta de transaminação) (CURIS et al., 2005).

O estudo pioneiro de WINDMUELLER & SPAETH (1981) em ratos mostrou que a arginina, além da glutamina, também pode ser convertida em citrulina no enterócito pela presença de duas enzimas necessárias para a síntese (arginase II e ornitina carbamoiltransferase).

A citrulina circulante depende, portanto, da síntese *de novo* intestinal e absorção de alimentos (RABIER & KAMOUN, 1995). A citrulina não é comumente encontrada em alimentos, com exceção da melancia (1 g de citrulina em 780 g). Mesmo sendo fonte do aminoácido, a concentração plasmática de citrulina não é significativamente aumentada após consumo regular de melancia por três semanas (COLLINS et al., 2007).

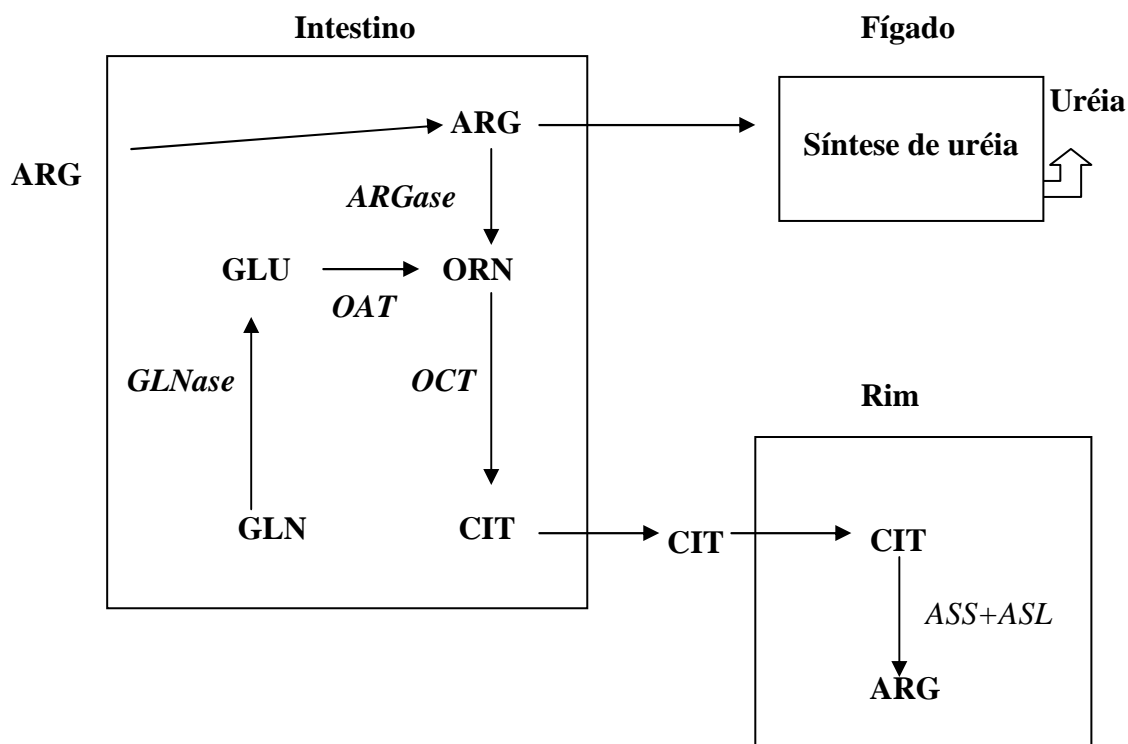
### 2.1.3.2. Catabolismo

A citrulina não é normalmente incorporada em proteínas endógenas ou exógenas e é convertida em arginina pelos rins. Nestes, aproximadamente 75% da citrulina produzida no intestino é captada e cerca de 80% é convertida em arginina nos túbulos proximais, sendo liberada no sangue para utilização pelos tecidos (PIRONI et al., 2006; MOINARD & CYNOBER, 2007; CRENN et al., 2008; DEUTZ, 2008).

Em condições incomuns, a citrulina pode se agregar a resíduos de arginina modificados, formando um peptídeo citrulinado em doenças auto-imunes como artrite reumatóide (SCHELLEKENS et al., 1998).

A conversão de citrulina a arginina pelos rins é suficiente para prover a necessidade corporal de arginina em adultos, porém isso não ocorre em recém-nascidos (CURIS et al., 2005). A conversão é realizada pelas enzimas argininosuccinato sintetase (ASS) e a argininosuccinato liase (ASL), envolvendo ciclo parcial da uréia. Essas enzimas são pouco ativas no intestino, o que não possibilita a utilização da citrulina no órgão (MOINARD & CYNOBER, 2007; CRENN et al., 2008). Deve-se enfatizar que a síntese intestinal de citrulina é evento regulatório crucial na produção renal de arginina (MOINARD & CYNOBER, 2007). Estima-se que 10% da arginina plasmática deriva da síntese *de novo* a partir da citrulina circulante (VAN DE POLL et al., 2007).

Na Figura 4 identifica-se o metabolismo integrado da citrulina.



**Figura 4.** Metabolismo integrado da arginina, glutamina, citrulina e ornitina. (*GLNase*, glutaminase; *OAT*, Ornitina aminotransferase; *OCT*, ornitina carbamoiltransferase; *ARGase*, arginase; ARG, arginina; CIT, citrulina; ORN, ornitina; GLN, glutamina; GLU, glutamato; ASS + ASL, argininosuccinato sintetase + liase).  
 Fonte: Adaptado de MOINARD & CYNBER, 2007.

### 2.1.3.3. Metabolismo do óxido nítrico e reutilização da citrulina

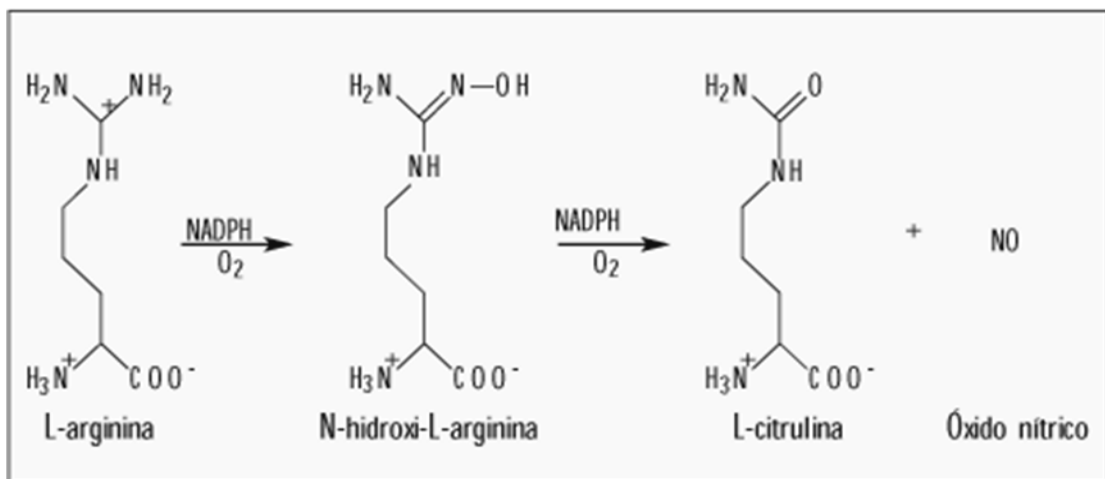
Segundo CRENN et al. (2008), os enterócitos, células epiteliais do intestino delgado, são os principais produtores de citrulina. Não obstante, as células imunológicas associadas também originam citrulina pela via do óxido nítrico (NO). As enzimas óxido nítrico sintases (NOS) são responsáveis pela síntese de óxido nítrico (NO), que acontece em todos os tecidos (CURIS et al., 2005). O NO é um radical livre altamente reativo, necessário na imunidade antimicrobiana e contra tumores, além de participar na função endotelial (DECHELOTTE et al., 2006). Há três tipos de famílias de NOS, que diferem em seu nível de expressão e localização: nNOS, que está presente especialmente nas células neurais, iNOS em macrófagos e eNOS nas células endoteliais. Todas essas enzimas têm um mecanismo em comum para produção de NO a partir de arginina, com liberação de citrulina (CURIS et al., 2005) (Figura 5).

Por ser facilmente convertida em arginina nos rins, a citrulina pode ser usada como precursora do óxido nítrico (NO). Desta forma, muitas células que são capazes de metabolizar a arginina podem captar a citrulina circulante, o que pode explicar certa



indução dos efeitos do NO, como por exemplo, a redução da tonicidade das células musculares lisas dos vasos sanguíneos (RAGHAVAN & DIKSHIT, 2001).

A citrulina pode ser ofertada pela conversão de arginina em NO, formando o chamado ciclo do NO. Em macrófagos ativados, essa citrulina reciclada relaciona-se com mais de 20% do NO produzido. Se a necessidade de NO é urgente, a citrulina pode ser sintetizada *in situ* a partir do glutamato, pela mesma via metabólica relatada no intestino (MURPHY & NEWSHOLME, 1998). Todavia, isto não pode ser traduzido para qualquer tipo celular, pois nas células vasculares do músculo liso e em neurônios, a citrulina parece não substituir a arginina na produção de NO (WIESINGER, 2001; WILEMAN et al., 2003).



**Figura 5.** Mecanismo de biossíntese de óxido nítrico (NO) pelo sistema óxido nítrico sintase.

## 2.1.4. Ações biológicas e funcionais

### 2.1.4.1. Considerações gerais

O ciclo interorgânico ARG-CIT-ARG pode ser visto como uma maneira de proteger a arginina da degradação hepática e produção excessiva de uréia. Grande parte da arginina dietética é catabolizada pela arginase I e faz-se necessário adaptar corretamente as taxas de formação da uréia de acordo com a ingestão protéica (CYNOBER et al., 1995; MOINARD & CYNOBER, 2007). Esse ciclo permite a resposta rápida a mudanças na ingestão de proteína, com preferência da via da citrulina quando há baixa ou adequada ingestão protéica e a da arginina, no caso de alta concentração de proteína na alimentação (CRENN et al., 2008).

A citrulina demonstra sustentar a homeostase protéica, principalmente em situações que requerem economia de nitrogênio. No estado pós-absortivo ou quando a ingestão protéica é baixa, a expressão da OCT (ornitina carbamoitransferase) no intestino aumenta, promovendo a formação de citrulina e permitindo a redução da síntese de uréia no fígado (MOINARD & CYNOBER, 2007).

#### 2.1.4.2. Marcador da função intestinal

O intestino delgado é a maior fonte de produção de citrulina e por tal, tem-se indicado a mesma como marcador sérico/plasmático da função intestinal (CRENN et al., 1997; CRENN et al., 1998). CRENN et al. (2000) mostraram a eficiência da citrulina como biomarcador da massa ativa intestinal.

Vários autores propõem seu uso em contextos que exigem monitoramento da atividade intestinal, como transplante (GONDOLESI et al., 2002, 2004; PAPPAS et al., 2004; PIRONI et al., 2006), doenças intestinais (doença celíaca, síndrome do intestino curto, doença de Crohn) (CRENN et al., 2003) e durante ou após radioterapia (PAPPAS et al., 2004; CURIS et al., 2005; CRENN et al., 2008; PETERS et al., 2008).

Para detecção de danos no intestino pela quimioterapia, no caso de doenças hematológicas, LUTGENS et al. (2003) apontaram a dosagem de citrulina no sangue como alternativa aos testes convencionais com açúcares para avaliar a permeabilidade intestinal.

#### 2.1.4.3. Marcador da função renal

Os rins são os órgãos que preferencialmente metabolizam a citrulina, por expressarem as enzimas argininosuccinato sintetase e argininosuccinato liase (ASS e ASL) (LEVILLAIN et al., 1990). Como consequência, falência renal é associada com redução do metabolismo de citrulina, devido à diminuição da atividade do complexo argininosintetase. A excreção urinária da citrulina é baixa, conforme o estágio da doença, sugerindo que maior parte da citrulina filtrada é reabsorvida ao longo dos túbulos proximais (LEVILLAIN et al., 1997).

Em ratos, a citrulinemia é bom marcador da função renal, em especial dos túbulos proximais. Falência renal grave é caracterizada por hipercitrulinemia (CEBALLOS et al., 1990), que parece ser mais sensível à disfunção dos rins que a clássica creatinemia (LEVILLAIN et al., 1997).

Em humanos, a citrulina plasmática está aumentada de acordo com a progressão da doença renal e existe boa correlação entre a mesma e a concentração plasmática de creatinina. Por este motivo, a citrulina poderia ser usada para detectar insuficiência renal aguda e crônica, como marcador específico da função dos túbulos e para estimar o grau de dano nos rins (CEBALLOS et al., 1990).

Em estudo realizado por LAU et al. (2000), com indivíduos em fase terminal de doença renal e indivíduos saudáveis foi observado que, naqueles pacientes com insuficiência renal, o aumento da taxa de síntese de citrulina e a manutenção de altos níveis de citrulina como um todo representou mecanismo adaptativo para manter a taxa de síntese de arginina.

#### 2.1.4.4. Vantagens da suplementação dietética com citrulina

A citrulina é um precursor natural da arginina. A arginina é um aminoácido não essencial, mas crucial em situações de estresse (WU & MORRIS, 1998; DECHELOTTE et al., 2006), como traumas, cirurgias, alguns tipos de câncer e processos infecciosos, muitas vezes associados à síndrome de deficiência da arginina (SDA). Esta síndrome reflete a destruição patológica da arginina e é caracterizada por três componentes: 1) redução na biodisponibilidade da arginina em tecidos locais e ou no plasma; 2) redução anormal do efeito biológico dependente de arginina; 3) aumento patológico da expressão da arginase I (OCHOA et al., 1991; YOON et al, 2007).

Deficiência de arginina prejudica processos celulares como a produção de óxido nítrico, função normal do linfócito T e cicatrização. Negativamente, afeta a função orgânica e os êxitos clínicos por meio da má perfusão da microcirculação tecidual e aumento da susceptibilidade a infecções (MORRIS et al., 2005; BARBUL & ULIYARGOLI, 2007; POPOVIC et al., 2007).

Ingestão normal de arginina na dieta ocidental está na faixa de 2-6 g/dia (MORRIS, 2004) e a suplementação com arginina parece incrementar os níveis plasmáticos de arginina (WILMORE, 2004). Aproximadamente 40% da arginina dietética é degradada no trato digestivo e o restante segue para o fígado, onde é catabolizada e produz uréia (FLYNN et al., 2002; ZALOGA et al., 2004). Por consequência, altas doses (> 10 g/dia) são necessárias para restaurar efetivamente os níveis plasmáticos de arginina (MORRIS, 2004) e estão associadas com náuseas, desconforto gastrointestinal e diarreia em alguns indivíduos (WU et al., 2007).

Apesar das funções evidentemente importantes no organismo, a arginina possui propriedade alcalina forte em soluções fisiológicas e por isso, os sais hidrocloreto ou mistura com ácidos orgânicos são geralmente utilizados para administração em animais e humanos para prevenir o desbalanço ácido-básico (WU et al., 2007). Ademais, a oferta oral de arginina não é recomendada para pacientes com infarto do miocárdio, devido ao aumento abrupto de síntese de NO pela iNOS, o que pode levar a vasodilatação excessiva e dano tecidual (SCHULMAN et al., 2006; WU et al., 2007).

Uma solução para os problemas encontrados com suplementação dietética de arginina pode ser o uso alternativo de L-citrulina. A capacidade da citrulina em melhorar os níveis sanguíneos de arginina foi primeiramente reportada por HARTMAN et al. (1994). Muitos estudos têm indicado que a citrulina é mais eficiente que a mesma concentração de arginina (HICKNER et al., 2006; URSCHEL et al., 2006; SCHWEDHELM et al., 2008). Quando absorvida pelo trato gastrintestinal e entra na circulação portal, grande parte da arginina é degradada no fígado. A citrulina não é clareada pelo fígado, sendo captada pelos rins e outros tecidos para conversão em L-arginina (HICKNER et al., 2006).

A citrulina é abundante em melancia e recente trabalho mostrou que consumo crônico deste alimento funcional foi efetivo no aumento plasmático dos níveis de arginina em humanos saudáveis (COLLINS et al., 2007). Este aminoácido contribui também na produção de óxido nítrico (DECHELOTTE et al., 2006) e tem sido apontado como um promissor farmaconutriente em sustentar o metabolismo protéico nas doenças intestinais e em ratos idosos subnutridos (CURIS et al., 2005).

Na ressecção intestinal maciça, o principal local de produção da citrulina está comprometido, com diminuição dos níveis plasmáticos tanto de citrulina quanto de arginina (WAKABAYASHI et al., 1994; CRENN et al., 2000). Isso sugere que arginina é um aminoácido essencial após ressecção intestinal maciça (WAKABAYASHI et al., 1994). A recomendação de 1 g/kg/dia de citrulina, de acordo com OSOWSKA et al. (2004) e OSOWSKA et al. (2008), foi capaz de gerar grandes quantidades de arginina nos tecidos e restaurar o balanço de nitrogênio.

Além da regulação do metabolismo de arginina e produção de uréia, a literatura evidencia o papel da citrulina na síntese muscular e sustentação da homeostase protéica. Pesquisas indicam que a suplementação com citrulina em ratos idosos e subnutridos aumenta a proteína muscular pela estimulação da síntese protéica (DUCHEMANN et al., 2004; OSOWSKA et al., 2006).

A leucina (LEU) e a citrulina (CIT) representam dois aminoácidos fundamentais no controle do balanço nitrogenado e composição da proteína muscular, dependendo do estado nutricional (MOINARD & CYNOBER, 2007). Por falta de transaminase, a LEU não é metabolizada no fígado (HARRIS et al., 1994). A LEU e a CIT têm algo em comum nas propriedades metabólicas, quando se considera o metabolismo hepático: CIT não é captada e a LEU não é metabolizada (MOINARD & CYNOBER, 2007).

A leucina era o único aminoácido que realmente apresentava efeito na síntese muscular (DARDEVET et al., 2000; BOLSTER et al., 2004). No estado pós-prandial, a provisão significativa da leucina é um estímulo à secreção de insulina e, em presença de outros aminoácidos essenciais, isto permite máxima síntese muscular. Já no estado pós-absortivo ou em situação de baixa ingestão protéica, um nível mínimo de síntese protéica tem que ser mantido para manter o funcionamento orgânico (MOINARD & CYNOBER, 2007). Nessas situações, a disponibilidade de citrulina estaria aumentada, manteria secreção basal de insulina (NAKATA & YADA, 2003) e mínima síntese de proteína (MOINARD & CYNOBER, 2007).

Os mecanismos pelos quais a citrulina estimularia a síntese protéica ainda não estão esclarecidos. A ação poderia ser indireta, por sua habilidade em originar arginina, induzir secreção de insulina e hormônio do crescimento ou simplesmente ser veículo de nitrogênio para o músculo. Diretamente, a citrulina teria também propriedades que elevariam a síntese protéica (MOINARD & CYNOBER, 2007).

## **2.2. TRANSLOCAÇÃO BACTERIANA**

### **2.2.1. Considerações gerais**

O termo translocação bacteriana foi inicialmente descrito por BERG & GARLINGTON (1979). Posteriormente foi definido como a passagem de microrganismos viáveis ou não e de seus produtos, do lúmen intestinal para os nódulos linfáticos mesentéricos (NLM) e demais órgãos estéreis (fígado e baço), causando infecção ou estimulando o sistema imunológico (WIEST & RATH, 2003; MACFIE, 2004; REDDY et al., 2006; KATOULI et al., 2009).

Atualmente, sabe-se que padrões moleculares associados aos patógenos (PAMPs), tais como lipopolissacarídios, flagelina, peptidoglicano, de origem bacteriana e outros, de origem viral também podem translocar e interagir com receptores

semelhantes ao Toll de células da imunidade inata, estando relacionados à patogênese da sepsis (TSUJIMOTO et al., 2009).

A translocação bacteriana ocorre espontaneamente 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 gastrointestinal (GALT) (MACFIE, 2000; LICHTMAN, 2001; ZANONI et al., 2009).

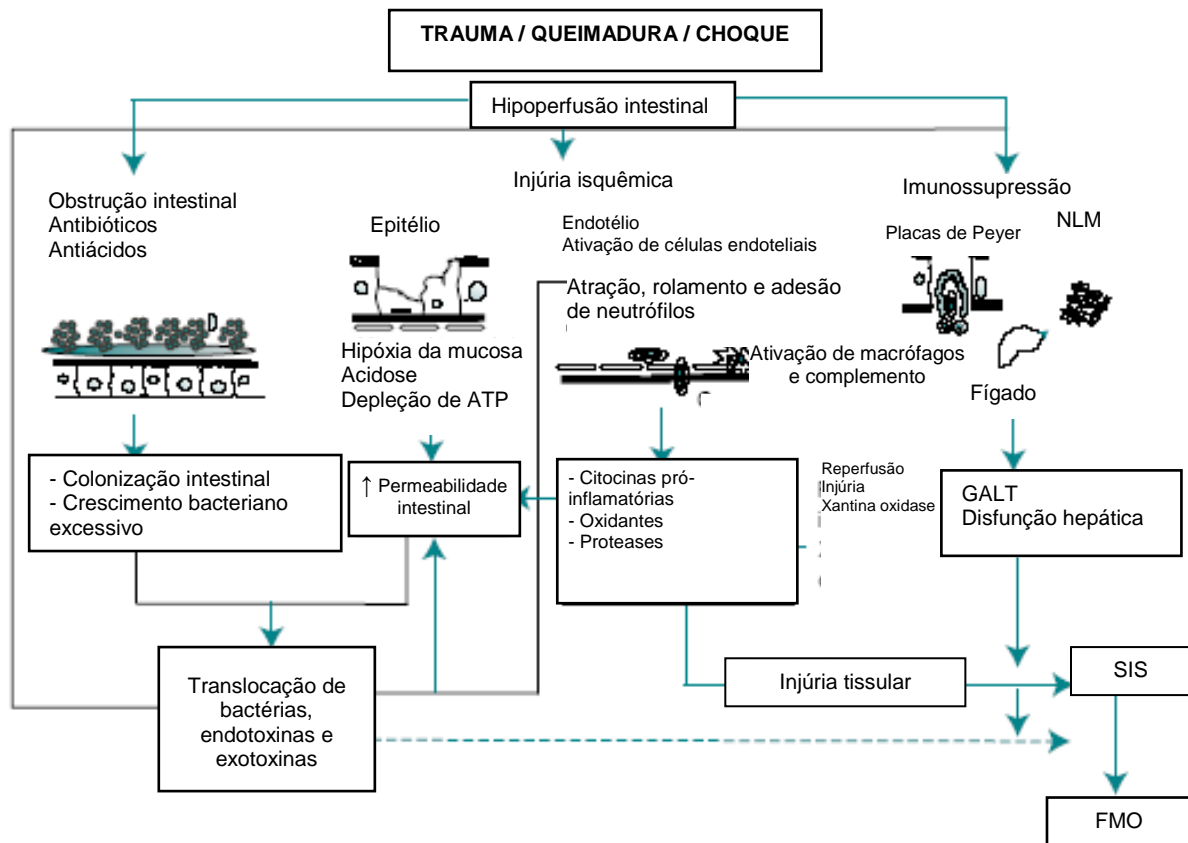
O processo de translocação encontra-se agravado em pacientes com obstrução intestinal, isquemia/reperfusão, pancreatite grave, choque hemorrágico, queimaduras, traumas, câncer intestinal ou doença inflamatória do intestino. Além disso, pacientes imunossuprimidos, desnutridos ou em uso prolongado de nutrição parenteral e com cirrose hepática/ insuficiência hepática aguda apresentam maior risco de translocação bacteriana (BERG, 1999; DE-SOUZA & GREENE, 2005; GATT et al., 2007).

A prevalência é de 14% em pacientes submetidos à operação eletiva (MACFIE, 2000; MACFIE, 2004; MACFIE et al., 2006) e há relatos de predisposição ao desenvolvimento de sepsis no pós-operatório (O'BOYLE et al., 1998; ONO et al., 2005; TAKESUE et al., 2005; SHIOMI et al., 2007; KATOULI et al., 2009).

Uma série de bactérias anaeróbicas facultativas do intestino humano estão associadas a esse evento, podendo causar infecção extra-intestinal, a saber, *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae*, *Enterococcus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* e *Proteus mirabilis* (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).

Tem sido proposto que estas bactérias intestinais, potencialmente patogênicas, ou as endotoxinas possam iniciar ou perpetuar o estado de septicemia em pacientes que não apresentam focos de infecção, propiciando o desenvolvimento de falência múltipla orgânica (WIEST & RATH, 2003; SHIOMI et al., 2007) (Figura 6).

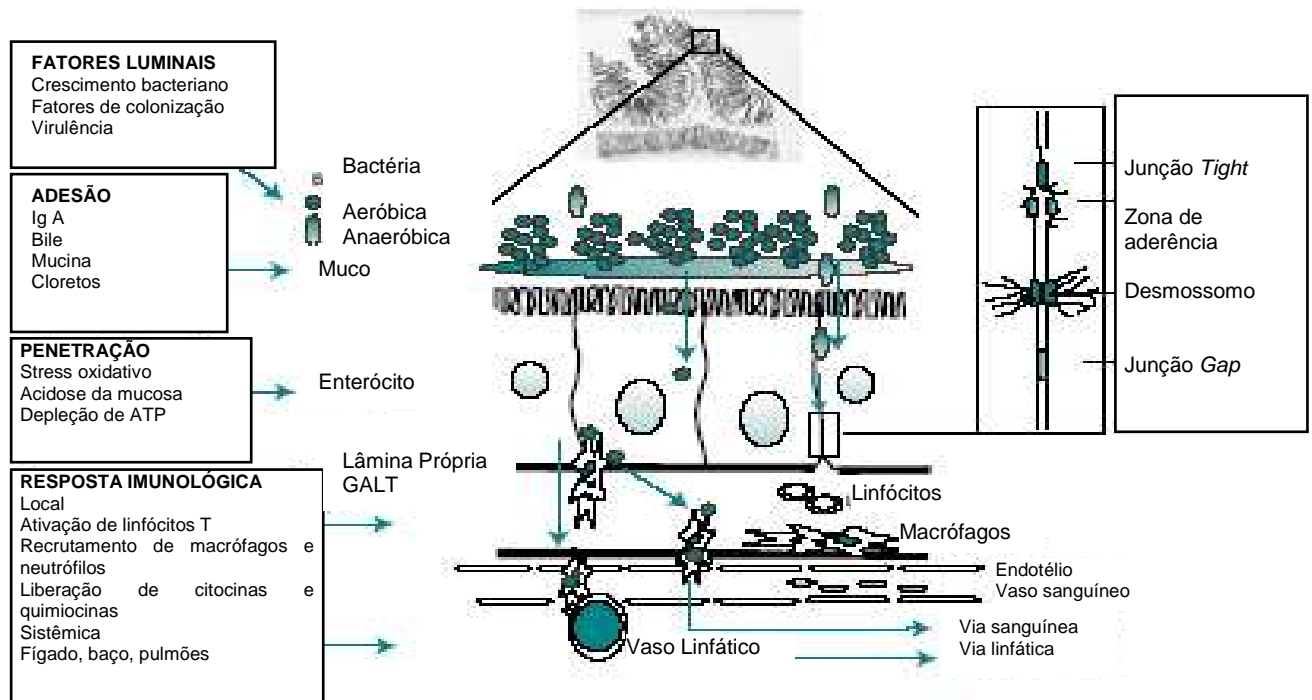
A translocação de bactérias ou de endotoxinas induz a ativação de células imunológicas e liberação de mediadores inflamatórios. Embora estes mediadores tenham efeitos benéficos após a injúria, a produção exagerada ou prolongada é prejudicial. Essas moléculas são responsáveis por lesões tissulares e favorecem o catabolismo, uma vez que disponibilizam proteínas e aminoácidos para manutenção das respostas imunológica e inflamatória e inibem a síntese hepática de albumina (SUGIURA et al., 1999; RUIZ-SILVA et al., 2002; SAMEL et al., 2002).



**Figura 6.** Translocação bacteriana e falência múltipla de órgãos. SIS, Síndrome Inflamatória Sistêmica; FMO, Falência Múltipla Orgânica. Fonte: Adaptado de WIEST & RATH (2003).

### 2.2.2. Etiologia

As três causas mais comumente envolvidas 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 7) (BERG, 1995; WIEST & RATH, 2003; ZANONI et al., 2009).



**Figura 7.** Mecanismos e componentes envolvidos no processo de translocação bacteriana. Fonte: Adaptado de WIEST & RATH (2003).

### 2.2.3. Mecanismos de translocação bacteriana

Estudos experimentais indicam que a translocação bacteriana pode ocorrer via paracelular ou transcelular. A migração transcelular se dá por meio da captação bacteriana pelos enterócitos apicais, seguida de internalização por vacúolos citoplasmáticos. A translocação da *E. coli* e de endotoxinas é observada através dos enterócitos, mesmo estas células estando intactas. A via paracelular representa outra via de translocação, sendo observada quando ocorrem lesões nas junções epiteliais. Macrófagos, SIgA, linfócitos T ( $CD4^+$  e  $CD8^+$ ) e outros leucócitos estão posicionados estrategicamente para reduzir a translocação (MACFIE, 2000).

BERG (1995) e BERG (1999) descreveram o processo de translocação em três etapas. Na primeira, a bactéria normalmente não atinge outros órgãos permanecendo restrita aos NLM. Já na segunda, a bactéria alcança outros órgãos como fígado, baço e rins, o que está associado com o grau de eficiência do sistema imunológico do hospedeiro. A combinação dos mecanismos da translocação bacteriana leva à terceira etapa, na qual a bactéria atinge a cavidade peritoneal e a corrente sanguínea.



### 2.2.3.1. Alterações da microbiota gastrointestinal

O habitat intestinal de um indivíduo contém, em média, de 300 a 500 espécies diferentes de bactérias. O estômago e o intestino delgado contêm poucas espécies de bactérias aderidas ao epitélio e no lúmen. A escassez de bactéria no trato digestivo alto se deve à composição das secreções ácidas, biliares e pancreáticas, que matam grande parte dos microrganismos ingeridos, bem como o peristaltismo, que impede a colonização microbiana. O intestino grosso, ao contrário, possui um ecossistema microbiano complexo e dinâmico, com alta densidade de bactérias viáveis, que mantém concentrações acima de  $10^{11}$  a  $10^{12}$  células/grama de conteúdo colônico. Cerca de 60% dos sólidos fecais são bactérias (GUARNER & MALAGELADA, 2003; WIEST & RATH, 2003).

As bactérias mais comuns no estômago e na parte superior do intestino são as gram-positivas e aeróbicas. Já a partir do íleo distal, as bactérias gram-negativas excedem as gram-positivas (BALZAN et al., 2007). As bactérias nativas influenciam no desenvolvimento dos componentes humorais do sistema imunológico e modulam o perfil de citocinas Th1 e Th2 (O'HARA & SHANAHAN, 2006; BALZAN et al., 2007). Normalmente as bactérias são mortas pelo sistema retículoendotelial *in situ* ou quando estão a caminho dos órgãos linfóides. Sendo assim, o linfonodo mesentérico e outros sítios extra-intestinais permanecem sem bactérias (BERG, 1995).

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

As bactérias que translocam prontamente são aquelas resistentes à morte por fagocitose (WIEST & RATH, 2003), sendo a *Escherichia coli* a mais eficiente nesse processo (KATOULI et al., 2009), visto a melhor adesão à mucosa epitelial do que bactéria não patogênica (BERG, 1995; REDDY et al., 2007).

Desnutrição, terapia com antibióticos, nutrição parenteral, obstrução intestinal, diabetes, choque endotóxico e ligação do ducto biliar causam alterações na microbiota gastrointestinal, com subsequente translocação (BERG, 1995; MACFIE, 2000).

### 2.2.3.2. Alterações da resposta imunológica

O trato intestinal possui grande atividade imunológica. O GALT (tecido linfóide associado à mucosa gastrintestinal) é o maior órgão imunológico do organismo, o que equivale a 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; (2) lâmina própria; (3) linfócitos intraepiteliais e (4) NLM (nódulo linfático mesentérico) (WIEST & RATH, 2003; ACHESON & LUCCIOLI, 2004). A Figura 8 ilustra o GALT.

Um importante elemento do GALT é o epitélio folicular associado (FAE), constituído em sua maioria 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 penetram nas placas de Peyer (SAWAI et al., 2001). As placas de Peyer são folículos linfóides que liberam linfócitos após o processamento de antígenos para sensibilização da imunidade da mucosa (local indutor) (HERMSEN et al., 2009). 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 local efetor para prevenção da entrada e disseminação de patógenos ao longo da barreira celular (ACHESON & LUCCIOLI, 2004).

Grande parte dos linfócitos intraepiteliais (70%) são linfócitos T CD8<sup>+</sup>, que atuam na imunidade inata e na vigilância da presença de células tumorais intestinais (PITMAN & BLUMBERG, 2000; ACHESON & LUCCIOLI, 2004). Linfócitos T CD8<sup>+</sup> modulam a atividade citotóxica direta e a produção de citocinas (BARNES & POWRIE, 2009; IZCUE et al., 2009).

Células T reguladoras (Treg CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>), também presentes no epitélio, são caracterizadas por altos níveis constitutivos do fator de transcrição Foxp3. Outra população similar inclui as células T reguladoras tipo 1 (Tr1). Esses tipos celulares visam o reconhecimento de antígenos intestinais e a prevenção de respostas imunológicas inatas e adaptativas inapropriadas. As células Treg e Tr1 podem, portanto, suprimir ativamente respostas antígeno-específicas por mecanismos

dependentes da secreção de IL-10 e TGF- $\beta$  (BARNES & POWRIE, 2009; IZCUE et al., 2009).

Apesar do repertório de receptor de células T (TCR) ser mais representado pelo TCR  $\alpha:\beta$ , células T com receptores  $\gamma:\delta$  são abundantes na mucosa intestinal e desempenham a função de manutenção do epitélio, controlando a indução de apoptose em enterócitos infectados. Ambas as células Treg e T  $\gamma:\delta$  participam na tolerância oral de antígenos alimentares (BARNES & POWRIE, 2009; IZCUE et al., 2009).

Os NLM's e o endotélio vascular também executam importantes funções no GALT. Nesses locais, ocorre apresentação de antígeno e articulação da resposta imunológica. Os antígenos (vírus, bactérias e macromoléculas) são transportados, através das células M, até as 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 gastrintestinal (TANAKA et al., 2004).

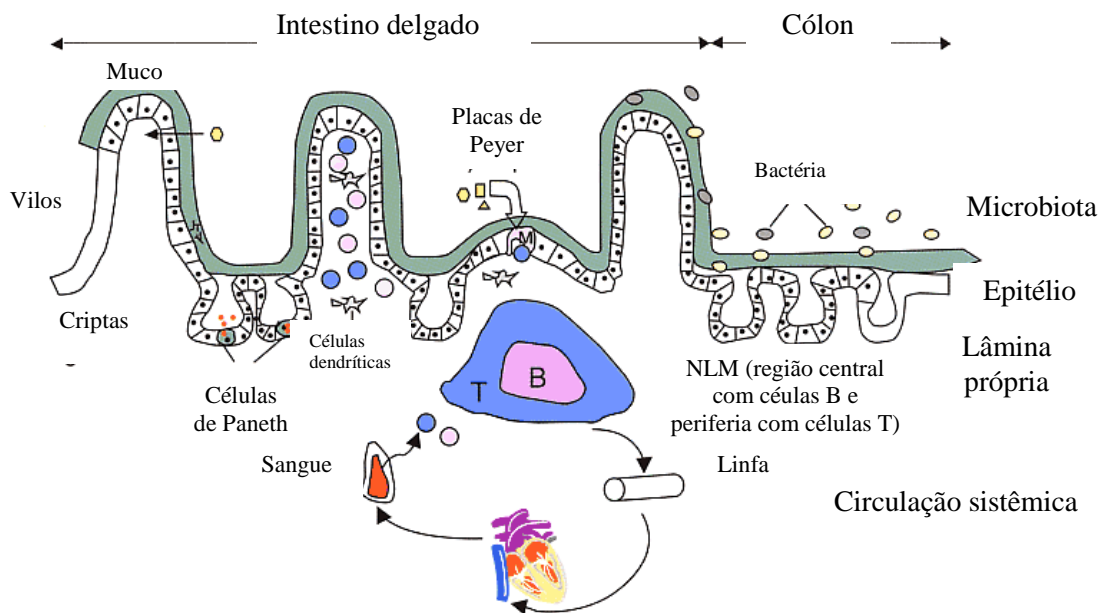
Nos NLM's ocorre fagocitose, processamento e apresentação dos antígenos aos linfócitos T. Os linfócitos T induzem a produção de citocinas Th1 e Th2. Citocinas Th1 (IL-2, INF- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ ) estimulam a imunidade celular, resultando em ativação de macrófagos, neutrófilos e linfócitos T, principalmente linfócitos T CD8<sup>+</sup>. Já interleucina-4 (IL-4), interleucina-5 (IL-5), interleucina-6 (IL-6), interleucina-10 (IL-10) e interleucina-13 (IL-13), que são citocinas Th2, ativam os linfócitos B, e desse modo, regulam a produção de anticorpos. A IgA, imunoglobulina abundante no trato gastrintestinal, é sintetizada na lâmina própria pela interação entre linfócitos T e B. Citocinas Th1 inibem a síntese de IgA, enquanto que citocinas Th2 estimulam sua produção (KUDSK, 2002; SHANG et al., 2004; HERMSEN et al., 2009).

As citocinas mais estudadas na inflamação são o Interferon- $\gamma$  (INF- $\gamma$ ) e a Interleucina-10 (IL-10). INF- $\gamma$  é uma citocina multifuncional com efeitos pleiotrópicos em diversos aspectos da função imunológica celular (SCHRODER et al., 2004; GILCHRIST & BEFUS, 2008), tais como atividade anti-viral, aumento da transcrição e expressão do complexo de histocompatibilidade principal (MHC) em macrófagos e estimulação de células T e NK (ITO et al., 2006).

A IL-10 é a citocina chave reguladora do sistema imunitário, pois limita a resposta inflamatória que poderia causar danos teciduais (SANJABI et al., 2009). Durante infecção, IL-10 melhora a excessiva resposta Th1 e de células T CD8<sup>+</sup>, caracterizadas pela superprodução de INF- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  (fator de necrose tumoral- $\alpha$ )

(COUPER et al., 2008). Portanto, a IL-10 é essencial para a homeostase do sistema imunológico, inclusive no trato gastrintestinal (SANJABI et al., 2009).

A translocação bacteriana relaciona-se com a diminuição da função do sistema imunológico intestinal, tanto em nível celular quanto humoral. Estudos com pacientes sépticos demonstraram menor quantidade de IgA e IgM (imunoglobulina M) na lâmina própria e reduzidos níveis de imunoglobulinas na superfície mucosa do intestino delgado. 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 aderência de bactérias à superfície de enterócitos, etapa inicial do processo de translocação bacteriana (MACFIE, 2000; WOODCOCK et al., 2001).



**Figura 8.** Tecido linfóide associado à mucosa gastrintestinal (GALT).

As células M, acima das placas de Peyer, constituem o epitélio folicular associado (FAE). NLM: nódulos linfáticos mesentéricos.

### 2.2.3.3. Alterações da barreira intestinal e permeabilidade

A partir do esfíncter esofágico inferior até o ânus, o trato gastrintestinal (TGI) é revestido por contínua camada simples de células. Este epitélio separa o meio interno do organismo do ambiente externo. Isto é necessário devido à presença de uma série de agentes ambientais que podem desencadear ou propagar inflamação, ao cruzarem essa barreira (ARRIETA et al., 2006).

O epitélio intestinal é composto pelos enterócitos conectados por junções, células caliciformes (produtoras de muco), células de Paneth (secretoras de peptídios antimicrobianos nas criptas de Lieberkühn), células M e linfócitos intraepiteliais (NEUTRA, 2001; BARNES & POWRIE, 2009; IZCUE et al., 2009). A mucosa intestinal age como barreira protetora, por mecanismos imunogênicos como imunoglobulinas, muco, defensinas, linfócitos e outras substâncias antimicrobianas (ARRIETA et al., 2006) e não-imunogênicos por meio da permeabilidade intestinal seletiva (FARHADI et al., 2003).

A microbiota do TGI também é importante e traz benefícios para o hospedeiro, contribuindo na defesa contra agentes estranhos, pois possui efeitos de trofismo similares ao da mucosa intestinal. Essa desempenha também papel relevante no desenvolvimento e competência do sistema imunológico (GUARNER & MALAGELADA, 2003; JIA et al., 2008).

O peristaltismo intestinal não constitui uma barreira propriamente dita, mas regula a velocidade do trânsito intestinal e do conteúdo luminal (enzimas, nutrientes e microrganismos). O muco, rico em mucina, lactoferrina, lisozima e IgA atua como barreira seletiva, permitindo a difusão de moléculas de baixo peso molecular e dificultando a passagem de macromoléculas e microrganismos. Já o glicocálix, distribuído nas vilosidades que estruturam a região apical dos enterócitos, também funciona como barreira física (NEUTRA, 2001).

O intestino delgado está envolvido no equilíbrio hidroeletrolítico, na sinalização endócrina, na excreção e desintoxicação, além da capacidade absorptiva e de digestão. As vilosidades e microvilosidades ao longo do órgão possibilitam grande área de absorção ( $100 \text{ m}^2$ ), que deve estar intacta para executar o papel de defesa e de barreira, prevenindo a passagem de agentes e moléculas tóxicos (PIRLICH et al., 2006), bem como de fatores pró-inflamatórios do lúmen para a circulação (FARHADI et al., 2003).

As células epiteliais intestinais possuem microvilosidades no ápice e filamentos em borda de escova no topo. Essa anatomia auxilia na prevenção de aderência de patógenos (ACHESON & LUCCIOLI, 2004). A união entre os enterócitos ocorre por meio dos desmossomos, junções *Tight* e *Gap*, que permitem a comunicação intercelular e a passagem somente de pequenas moléculas ( $< 11,5 \text{ \AA}$ ) (WIEST & RATH, 2003). As células epiteliais desenvolveram a habilidade de comunicação com células imunológicas regionais, influenciando o crescimento, a migração e a resposta ao estímulo antigênico (PITMAN & BLUMBERG, 2000).

A integridade da barreira intestinal é primordial para a prevenção da translocação bacteriana. Em modelos experimentais de choque hemorrágico ou lesões térmicas observaram-se alterações nas junções *Tight* (BERG, 1995). Injúrias às junções epiteliais permitem que microorganismos utilizem essas áreas afetadas como via alternativa de acesso à mucosa intestinal (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 visualizam alterações nas junções intercelulares e há evidências de que dilatações nas junções *Tight* permitam maior penetração bacteriana (MACFIE, 2000).

O balanço entre a proliferação celular e a apoptose representa outro fator que mantém a integridade da 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).

Diversas células intestinais produzem óxido nítrico, participante de processos fisiológicos do intestino: secreção de muco gastrointestinal, transporte de cloretos e de fluidos, fluxo sanguíneo, atividade motora intestinal, agregação de neutrófilos e eliminação de metabólitos reativos de oxigênio. O óxido nítrico é importante na reparação e na permeabilidade da mucosa intestinal. Alteração na produção, em situações como endotoxemia, choque hemorrágico, injúria térmica, desnutrição e outros, explicaria dano à barreira intestinal (WIEST & RATH, 2003). Desta maneira, o óxido nítrico (NO), sintetizado a partir do aminoácido L-arginina pela óxido nítrico sintase (NOS) se mostra fundamental na manutenção da função da barreira intestinal em baixos níveis (FARHADI et al., 2003).

A distinção entre absorção e permeabilidade intestinal se faz necessária neste contexto. A absorção descreve o transporte mediado de substâncias, que apresenta implicações para a nutrição (BJARNASON et al., 1995). A permeabilidade intestinal é classicamente definida como o grau de difusão de compostos não-mediada através da parede do intestino (SOETERS et al., 2007), correspondendo à medida da função da barreira intestinal (GENEROSO et al., 2003).

A permeabilidade intestinal é determinada pela interação entre os componentes da barreira incluindo a camada imóvel de água, a superfície hidrofóbica da mucosa, o fluxo sanguíneo, o revestimento da mucosa, os fatores epiteliais (especialmente as junções compactas) e os fatores endoteliais (FARHADI et al., 2003). A microestrutura

do intestino é muito vulnerável e alteração na morfologia e função podem resultar em aumento da permeabilidade (PIRLICH et al., 2006).

A permeabilidade epitelial é regulada por duas vias: o transporte paracelular e o transporte transcelular. A primeira é controlada pelas junções presentes entre as células epiteliais (formadas principalmente por estrutura protéica filamentosa denominada citoesqueleto), que impedem a passagem de endotoxinas e produtos bacterianos. A segunda permite a entrada de várias moléculas existentes no lúmen nas células, bem como a saída das mesmas no lado do tecido seroso (FARHADI et al., 2003).

Os mastócitos modulam a permeabilidade gastrointestinal sob condições fisiológicas e patológicas e protegem contra ação bacteriana, liberando citocinas, como o TNF- $\alpha$ . Mediadores de mastócitos estão envolvidos na patogênese de permeabilidade anormal induzida por estresse, alergia alimentar e processos inflamatórios intestinais, devido ao aumento desse tipo celular nessas situações. No caso da histamina, ela aumenta a perfusão e a permeabilidade endotelial (FARHADI et al., 2003).

#### 2.2.3.4. Métodos de avaliação da permeabilidade intestinal

FORDTRAN et al. (1967) desenvolveram inicialmente idéias para a avaliação da permeabilidade intestinal, mas foi MENZIES (1974) quem introduziu oligossacarídeos como substâncias-teste, em método não-invasivo de avaliação da permeabilidade intestinal. Este se baseia na excreção urinária diferencial de substâncias administradas por via oral.

*In vivo*, a permeabilidade intestinal é avaliada medindo excreção urinária de substâncias-teste administradas via oral, geralmente por meio de pequenos sacarídeos, como os monossacarídeos manitol e D-xilose, lactulose (oligossacarídeos), (BJARNASON et al., 1995; KOHOUT et al., 1999; MELICHAR et al., 2001; MELICHAR et al., 2006), compostos radioativos não degradáveis, como o  $^{51}\text{Cr}$ -EDTA (ácido cromo etilenodiaminotetracetato) e  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -DTPA (Tc-ácido dietilenotriaminopentacético) (BJARNASON et al., 1995; ARRIETA et al., 2006) e polímeros de polietileno glicol (PEG) (BJARNASON et al., 1995; ANDERSON et al., 2004).

Tipicamente, os açúcares administrados devem ter várias características em comum como: serem pequenos, solúveis em água, componentes que não são alterados nem destruídos no intestino, atóxicos, não metabolizados ou absorvidos e

clareados quantitativamente pelos rins. Devem ser ainda facilmente detectáveis na urina e separados de compostos endógenos e dietéticos semelhantes. No entanto, essas substâncias utilizadas para avaliar a permeabilidade do intestino delgado (lactulose, manitol, celobiose ou rafinose) são degradadas pela microbiota do intestino grosso, não provendo informação sobre a permeabilidade colônica (ARRIETA et al., 2006).

A estimativa da mudança da permeabilidade é calculada pela taxa da dose oferecida de uma molécula grande (que passa entre os enterócitos como a lactulose) e a fração de uma pequena quantidade de composto que se presume passar através do enterócito (como o manitol). O aumento da permeabilidade seria detectado pela excreção de moléculas grandes. Quando estas passam pela barreira intestinal, significa que a bactéria pode seguir a mesma rota (MACFIE, 2000).

Quanto ao PEG, o mais utilizado é o PEG 400, que possui massa molecular entre 194 e 502. Em ratos, a permeabilidade intestinal ao PEG 400, composto altamente solúvel é influenciada pelo gradiente osmótico. A recuperação desse composto na urina após administração intravenosa é incompleta, o que pode afetar a reprodutibilidade dos resultados (BJARNASON et al., 1995).

Por todas essas razões, elementos radiomarcados como  $^{51}\text{Cr}$ -EDTA (ácido cromo etilenodiaminotetracetato) e  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -DTPA (Tc-ácido dietilenotriaminopentacético) são utilizados como alternativa para avaliação da permeabilidade intestinal, visto que apresentam as mesmas propriedades físicas dos oligossacarídeos, com a vantagem da facilidade na medida. A diferença na utilização do  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  e do  $^{51}\text{Cr}$  é a meia-vida (6 horas e 27,7 dias, respectivamente). Em humanos, a avaliação da excreção desses compostos na urina é realizada no prazo de 24 horas, devido à diferença na excreção de indivíduos sadios e dos pacientes com doença intestinal (BJARNASON et al., 1995; SUN et al., 1998; JORGENSEN et al., 2006).

O  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -DTPA é uma molécula grande, que em condições normais não ultrapassa a barreira intestinal. Este radiofármaco já foi aplicado em estudos de permeabilidade intestinal em animais no nosso laboratório, utilizando modelos de obstrução intestinal (SANTOS et al. 2009; VIANA et al., 2010) e icterícia obstrutiva (DINIZ et al., 2005). Os trabalhos desenvolvidos por SANTOS et al. (2009) e VIANA et al. (2010) observaram que a detecção do  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -DTPA no sangue é mais prática e rápida que a determinação do radiotraçador em urina e fezes, como previamente descrito por DINIZ et al. (2005).



## **2.3. OBSTRUÇÃO INTESTINAL**

### **2.3.1. Considerações gerais**

A obstrução intestinal corresponde à interrupção total ou parcial do fluxo do conteúdo intestinal, súbito ou progressivo (MADL & DRUML, 2003). A classificação da obstrução intestinal é baseada na localização (delgado ou grosso), extensão (completa ou parcial), gravidade (simples ou estrangulada), tipo de evolução (aguda ou crônica) e natureza da obstrução (mecânica, vascular ou funcional) (VIDAL, 2005; KENDRICK, 2009). Em torno de 20% das operações para tratamento de abdome agudo são em pacientes com obstrução intestinal. As aderências são a principal causa em todos os grupos etários (VIDAL, 2005).

A obstrução intestinal mecânica é provocada por barreira física que impede a progressão do conteúdo intestinal (FILHO, 2000), sendo a doença mais frequente no intestino delgado (KENDRICK, 2009). As principais causas relacionadas são aderências por operações ou inflamações prévias, vólvulo, hérnias, tumores benignos ou malignos, inflamações como enterite regional, diverticulite e doença de Crohn (KAHI & REX, 2003; LETIZIA & NORTON, 2003).

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, modo de instalação, local e grau da obstrução. As mais comuns são dor abdominal, vômitos, constipação, fraqueza, desidratação, distensão abdominal (DURANTE et al., 2005) e desordens metabólicas (MAGLINTE et al., 2008).

### **2.3.2. Fisiopatologia**

A distensão intestinal é causada pelo acúmulo de gás deglutido e líquidos próximos ao segmento obstruído. O ar deglutido é rico em N<sub>2</sub>, H<sub>2</sub> e CH<sub>4</sub> formados por bactérias do cólon e, possivelmente, pela microbiota alterada do delgado, devido à obstrução. O acúmulo de líquido deve-se ao líquido ingerido, saliva deglutida, suco gástrico, secreções biliares e pancreáticas e 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<sub>2</sub> à mucosa intestinal. Conseqüentemente ocorre isquemia que pode evoluir para necrose da alça intestinal, dependendo do período e 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<sub>2</sub>. A acidose também se relaciona positivamente com aumento da permeabilidade intestinal (WIEST & RATH, 2003).

Em 1989, DEITCH demonstrou que a obstrução intestinal promove translocação para os NLM's, 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 de 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 neste e em outros trabalhos (SHIOMI et al., 2007; EL-AWADY et al., 2009; ZANONI et al., 2009).

## **2.4. MÉTODOS DE AVALIAÇÃO DA TRANSLOCAÇÃO BACTERIANA**

Diversos métodos são utilizados para avaliar a translocação bacteriana. Dentre os métodos diretos, os mais comuns são a contagem de unidades formadoras de colônias (UFC) em cultura de microrganismos nos nódulos linfáticos mesentéricos (NLM) e órgãos sem bactérias (baço, fígado e pulmão) e a contagem da radioatividade pelo processo que utiliza bactéria marcada com isótopo radioativo. Um marcador indireto é a cultura ou a presença de endotoxina no sangue portal ou periférico (LICHTMAN, 2001; TSUJIMOTO et al., 2009).

No método de contagem de unidades formadoras de colônias, quantidades suficientes de microrganismos viáveis são essenciais para se obter resultado positivo e maior parte das bactérias translocadas podem estar mortas e não crescerão em cultura convencional. A medida de endotoxinas no sangue também possui muitos problemas e apresenta inibidores mal definidos, bem como sensibilidade a anticoagulantes, à manipulação e à preparação das amostras (TSUJIMOTO et al., 2009).

O <sup>99m</sup>tecnécio (<sup>99m</sup>Tc) é um radionúcleo artificial originado da desintegração radioativa de um elemento radioativo (99molibdênio), isótopo proveniente da fissão nuclear do urânio. As características desse radioisótopo são o baixo custo, alta

disponibilidade, meia vida curta de seis horas, emissão de radiação gama ( $\gamma$ ) e baixa energia de radiação (140 Kev) (DINIZ et al., 1999).

Por ser um metal deficiente em elétrons, o  $^{99m}\text{Tc}$  reage principalmente com grupos doadores de elétrons como aminas, amidas, tióis, sulfidrilas e isonitrilas. Na marcação de bactérias, o mais provável é que o  $^{99m}\text{Tc}$  reaja principalmente com estruturas protéicas, 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., 1999; DINIZ et al., 2005). Observou-se que após o procedimento de marcação, a célula bacteriana permanece preservada. Estudo relacionado à viabilidade da bactéria não indicou diferenças significativas no crescimento em meio de cultura e nas unidades formadoras de colônias da  $^{99m}\text{Tc-E.coli}$  e *E. coli* controle (DINIZ et al., 1999).

A bactéria marcada é indicada como o método mais sensível (WIEST, 2004; BALZAN et al., 2007) e tem sido muito utilizada (ONO et al., 2005). Estudos realizados no Laboratório de Radioisótopos da Faculdade de Farmácia/UFMG evidenciaram o fenômeno da translocação bacteriana, por meio de bactérias marcadas com  $^{99m}\text{Tc}$  Técnico. Dentre estes, destacam-se os trabalhos desenvolvidos por OLIVEIRA et al. (2006), QUIRINO et al. (2007), SANTOS et al. (2009) e VIANA et al. (2010), que avaliaram a translocação bacteriana em modelo de obstrução intestinal. Em 2005, DINIZ et al. trabalhando com modelo experimental de icterícia obstrutiva já tinham utilizado a *E.coli* marcada com  $^{99m}\text{Tc}$  para investigar a translocação bacteriana.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. OBJETIVO GERAL**

- Avaliar os efeitos da L-citrulina no processo de translocação bacteriana e na permeabilidade intestinal, em modelo de obstrução intestinal em camundongos, utilizando  $^{99m}\text{Tc}$ -*E. coli* e  $^{99m}\text{Tc}$ -DTPA, respectivamente.

#### **3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Avaliar a morfologia intestinal dos grupos tratados e não tratados com citrulina, por meio de análises histológicas;
- Verificar os efeitos da L-citrulina na resposta imunológica local, pela dosagem de sIgA no fluido intestinal dos animais;
- Investigar a ação da L-citrulina na resposta imunológica sistêmica, com determinação dos níveis da citocina pró-inflamatória INF- $\gamma$  e anti-inflamatória IL-10 no soro.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. Animais

Camundongos machos Swiss, pesando entre 25 e 30 gramas, fornecidos pelo biotério da Faculdade de Farmácia da UFMG foram utilizados. Os animais foram mantidos no biotério da Faculdade de Farmácia em gaiolas plásticas individuais, com controle da iluminação (ciclo de luz claro/escuro) e ventilação. Água potável foi oferecida *ad libitum*. Os animais foram distribuídos aleatoriamente em três grupos, conforme descrito a seguir:

**GRUPO CONTROLE:** “Sham” operados (ausência de obstrução intestinal) + ração convencional *ad libitum*

**GRUPO OINT:** Obstrução intestinal + ração convencional *ad libitum*

**GRUPO CIT:** Obstrução intestinal + 30 mg/dia de citrulina acrescentadas à ração convencional + ração convencional *ad libitum*

O protocolo de pesquisa nº 260/2008 foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da UFMG.

### 4.2. Rações

Foram utilizadas ração para roedores Labina® e ração suplementada, preparada de acordo com o item 4.2.1. A composição centesimal dos ingredientes utilizados no preparo das dietas suplementadas (ração para roedores Labina®, gelatina em pó incolor e amido de milho) está representada no Anexo I (Tabelas 1, 2 e 3).

#### 4.2.1. Preparo e cálculo da composição nutricional das dietas suplementadas

Para o preparo da dieta suplementada com citrulina foram utilizados os seguintes ingredientes com as respectivas proporções:

- Ração convencional triturada – 82,6%

- Amido – 8,8%
- Citrulina em pó – 1%
- Gelatina em pó incolor (a base de colágeno) – 3%
- Óleo vegetal – 0,7%
- Água – qsp (quantidade suficiente para)

Inicialmente, a ração na forma pó, fornecida pelo Biotério da Faculdade de Farmácia, foi peneirada e homogeneizada com a citrulina. Em seguida, foram acrescentados gelatina em pó incolor (dissolvida em água destilada previamente aquecida), amido (disperso em água destilada à temperatura ambiente) e óleo vegetal. Finalmente, água destilada (qsp) foi adicionada à temperatura ambiente. Todos os ingredientes foram intensamente homogeneizados até formação de massa uniforme, que foi subdividida em pequenos cilindros, similares à forma da ração tradicional. Estes cilindros foram secados em estufa a 45°C, por oito horas (Série D, Nova Ética, SP, BR). Após secagem, a ração obtida foi pesada para cálculo da quantidade diária a ser oferecida aos animais.

A proporção dos ingredientes que foram utilizados no preparo das dietas suplementadas foi estabilizada e padronizada a partir da composição nutricional da ração convencional, de modo que fossem obtidas dietas isocalóricas e isoprotéicas (Anexo I - Tabelas 1, 2 e 3). A composição nutricional das dietas preparadas foi calculada com base na composição nutricional da ração convencional e dos demais ingredientes acrescentados.

#### **4.3. Tratamento**

Durante sete dias consecutivos, anteriores ao ato cirúrgico para promoção da obstrução intestinal e inoculação da <sup>99m</sup>Tc-*E.coli*, ingestão calórica e protéica foram mensuradas diariamente. O peso foi aferido no primeiro e último dias de tratamento. Água foi fornecida *ad libitum*. Os grupos controle e OINT receberam ração convencional *ad libitum*. O grupo CIT recebeu 30mg/dia de citrulina, incorporada à ração convencional, de acordo com a recomendação de 1g/kg/dia (OSOWSKA et al., 2004). A dose de 30mg/dia de citrulina representou aproximadamente 0,6% do VET (Valor Energético Total). Após o consumo diário total da ração suplementada, os animais do grupo CIT receberam a ração convencional *ad libitum*.

#### 4.4. Cultivo e preparação da *Escherichia coli*

A bactéria utilizada foi *Escherichia coli* (ATCC-10536), não patogênica, fornecida pelo Laboratório de Controle de Qualidade Biológico da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais. De uma cultura-mãe de *E. coli* foi feito o repique em ágar 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 estéril. A concentração bacteriana foi ajustada espectrofotometricamente em 10% a 11,2% de transmitância a 580nm (espectrofotômetro Genesys®<sup>TM</sup> 10 Series), correspondente a 10<sup>8</sup> unidades formadoras de colônia por mL (UFC/mL) (DINIZ et al., 1999; DINIZ et al., 2005).

#### 4.5. Procedimento de marcação da *Escherichia coli* com <sup>99m</sup>Tecnécio

Alíquotas de 2,0 mL da suspensão bacteriana, descrita no item 4.4 foram incubadas a 37 °C com 1,0 mL de solução de cloreto estanoso a 580 µM (1,3 mg/mL), pH 7,0, por 10 minutos (SnCl<sub>2</sub> – Sigma). Após este período, 37 MBq a 55,5 MBq de <sup>99m</sup>Tecnécio na forma de Na<sup>99m</sup>TcO<sub>4</sub> (pertechnetato de sódio), obtidos de gerador de <sup>99</sup>Molibdênio/<sup>99m</sup>Tecnécio (IPEN/CNEN, São Paulo, Brasil) foram adicionados a cada preparação e mantidos a 37°C por mais 15 minutos.

Os tubos foram centrifugados a 3000 rpm durante 25 minutos (centrífugas FANEM® modelos 206 BL e 206 MP, São Paulo, Brasil). O precipitado foi ressuspenso em 3,0 mL de salina estéril. Este procedimento foi repetido por três vezes, com retirada de alíquota de 100 µL do precipitado e do sobrenadante para contagem da radioatividade em cintilador de poço automático (ANSR, Abbot, EUA) (DINIZ et al., 1999; DINIZ et al., 2005). A porcentagem de <sup>99m</sup>Tc incorporado nas células bacterianas foi determinada do seguinte modo:

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

sendo cpm = contagem por minuto.

#### 4.6. Modelo experimental de obstrução intestinal

Decorridos os sete dias de tratamento especial, 0,1 mL da suspensão da  $^{99m}\text{Tc}$ -*E.coli* ou  $^{99m}\text{Tc}$ -DTPA foi administrado por gavagem. Após 90 minutos do procedimento da gavagem, os animais foram anestesiados intraperitonealmente com solução de cloridrato de xilazina (Dopaser®) e cloridrato de ketamina (Dopalen®) nas concentrações de 8 mg/Kg e 60 mg/kg, respectivamente.

A operação para promoção da obstrução intestinal foi realizada no oitavo dia, baseada em SALVALLAGIO et al. (2002). Incisão mediana de aproximadamente 2 cm foi feita no abdome, com exposição do ceco e íleo terminal. Em seguida, este último sofreu ligadura com nó simples (fio de nylon 5.0, BRASURE, São Paulo, Brasil) a 1 cm da válvula ileocecal. Finalizando o procedimento, foi realizada a sutura da camada muscular abdominal e da pele com fio de nylon 5.0. Todos os grupos passaram pelo mesmo processo. Deve-se ressaltar que o grupo controle (*Sham*) não sofreu ligadura do íleo terminal, sendo submetido apenas ao estresse cirúrgico da abertura do abdome.

#### 4.7. Translocação bacteriana

Alíquotas de 0,1 mL da suspensão de  $^{99m}\text{Tc}$ -*E. coli* contendo  $10^7$  UFC foram administradas em todos os animais por gavagem. Após a administração da  $^{99m}\text{Tc}$ -*E. coli* e o procedimento cirúrgico, os animais foram mantidos em gaiolas individuais, por 18 horas com ração convencional e água *ad libitum*. Após este período, os animais foram novamente anestesiados conforme descrito no item anterior. O sangue foi coletado por punção venosa axilar, com auxílio de pipeta Pasteur e acondicionado em tubos para obtenção de soro ou plasma.

Em seguida, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e os nódulos linfáticos mesentéricos (NLM), fígado, baço, pulmões e tireóide retirados, pesados e lavados para a determinação da radiação em cintilador de poço automático (ANSR, Abbot, EUA). Para determinação dos dados, a contagem obtida em cpm foi dividida por grama do tecido removido e apresentada em cpm/g. A tireóide foi removida para controle da radioatividade livre devida aos átomos de tecnécio que não se incorporaram nas células bacterianas. Em cada grupo experimental foram utilizados 8 animais (n=8).



#### 4.8. Avaliação da permeabilidade intestinal

Trinta e seis animais foram divididos em 3 grupos, conforme item 4.1, cada grupo sendo representado por 12 animais (n=12). Alíquotas de 0,1 mL de DTPA marcado com 18,5 MBq de  $^{99m}\text{Tc}$  foi administrada por gavagem nos animais dos grupos *sham*, OINT e CIT após sete dias de tratamento e 90 minutos antes da operação. Após os tempos de 4, 8 e 18 horas da operação, os animais foram anestesiados e 500  $\mu\text{L}$  de sangue foram coletados por punção axilar para determinação da radioatividade (SANTOS et al., 2009; VIANA et al., 2010). Para os cálculos do percentual de dose utilizou-se um padrão de dose contendo o mesmo volume de  $^{99m}\text{Tc}$ -DTPA administrado aos camundongos, de acordo com a seguinte fórmula:

$$\% \text{ dose} = \frac{\text{cpm do sangue}}{\text{cpm da dose administrada}} \times 100$$

#### 4.9. Análises histológicas

Após a coleta do sangue para avaliação da permeabilidade intestinal, o intestino delgado dos animais de cada grupo foi removido, perfundido com PBS 1x (salina de tampão fosfato) até remoção completa de fluidos e fezes. Em seguida foi perfundido com paraformaldeído a 4%, imerso para fixação em período mínimo de 24 horas e levado para análise histológica.

Os segmentos intestinais correspondentes ao íleo distal (anéis de 1 cm proximais à lesão) foram processados para inclusão rotineira em parafina. Cortes de 5  $\mu\text{m}$  foram corados em hematoxilina e eosina (HE) e observados ao microscópio óptico. Imagens foram capturadas por câmera digital Coolsnap color (MediaCybernetics, USA), utilizando-se o Software Image Pro-plus para fins de documentação. As fotomicrografias estão apresentadas em aumento original de quatro vezes (4x) com o objetivo de mostrar os aspectos panorâmicos das lesões. Por outro lado, aumento de quarenta vezes (40x) foi utilizado para demonstrar detalhes da arquitetura do tecido ou células.

Três secções histológicas de cada fragmento de intestino foram examinadas. Três anéis consecutivos próximos à área da obstrução foram processados para inclusão transversal, de forma que toda a espessura da parede intestinal pudesse ser

observada. Cinco animais de cada grupo experimental foram estudados quanto às alterações histológicas do intestino (n=5). As análises e o laudo de histopatologia foram executados no Laboratório de Neuro-Imuno Patologia Experimental, sob coordenação da Professora Dra. Rosa Maria Esteves Arantes (ICB/UFMG), sem conhecimento prévio dos grupos.

#### **4.10. Dosagem de sIgA no fluido intestinal**

O intestino delgado dos três grupos de animais submetidos ao procedimento de translocação bacteriana foi removido após 18 horas e o procedimento de coleta do conteúdo foi adaptado de LIM et al. (1981). Retirou-se 500 mg de fluido intestinal em tubo falcon, com manutenção do material no gelo enquanto eram coletadas as demais amostras. O fluido foi diluído em 2 mL de PBS com 1% de inibidor de protease para posterior centrifugação a 2000 rpm/20 min. O sobrenadante foi removido e armazenado em eppendorf a -80°C.

As amostras foram inicialmente diluídas na proporção de 1:1000. A análise de sIgA foi realizada em duplicata pelo método de ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) de captura, utilizando anti-IgA de camundongo (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) e conjugado de peroxidase anti-IgA de camundongo (Sigma). A revelação do ensaio deu-se com o desenvolvimento de cor originada pelo o-fenilenodiamina (OPD, Sigma) e feita leitura a 492 nm em leitor de placas de ELISA (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA).

As concentrações da imunoglobulina foram determinadas utilizando padrão de IgA de camundongo purificado (Southern Biotechnology Associates Inc., Birmingham, AL, USA). As dosagens foram feitas no Laboratório de Ecologia e Fisiologia de Microrganismos, com auxílio de Flaviano dos Santos Martins e sob coordenação do Professor Dr. Jacques Robert Nicoli (ICB/UFMG). Para a mensuração de sIgA foram utilizados quatro animais (n=4).

#### **4.11. Dosagem de citocinas no soro**

O soro para dosagem de citocinas foi obtido após 18 horas do experimento de translocação bacteriana. O sangue foi coletado por punção axilar em tubo de ensaio e centrifugado a 2500 rpm/15 min. O soro foi removido e armazenado em eppendorf a -80°C. As citocinas foram dosadas pelo método de ELISA de captura, no qual se utilizou

um anticorpo monoclonal de captura (anti-citocina de camundongo), um anticorpo monoclonal de detecção biotinilado (anti-citocina de camundongo), a enzima estreptavidina-peroxidase (Streptavidin-HRP), o tetrametilbenzidina (TMB) como revelador e peróxido de hidrogênio como substrato.

O ensaio foi feito de acordo com as instruções do fabricante dos kits comerciais para dosagem de IL-10 (KMC0101) e INF- $\gamma$  (KMC4021) (INVITROGEN<sup>TM</sup>, CA, USA) em soro de camundongos. As quantidades de citocinas foram calculadas a partir das curvas de calibração, obtidas pelas diferentes concentrações de citocinas (leitura a 450 nm). Todo o procedimento foi realizado no Laboratório do Professor Dr. José Augusto Nogueira Machado, da Santa Casa de Misericórdia de Belo Horizonte, MG. Para a determinação dos níveis de citocinas foram utilizados três animais (n=3).

#### **4.12. Análises estatísticas**

Os resultados obtidos referentes à translocação bacteriana foram analisados pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis seguido do *Post hoc* de Dunn para comparação entre as medianas dos grupos. Permeabilidade intestinal, ganho de peso, ingestão, SIgA e citocinas foram avaliados por meio de ANOVA, com *Post hoc* de Tukey para comparação entre as médias dos grupos. As diferenças foram consideradas significativas se  $p \leq 0,05$ . O programa utilizado foi o Biostat versão 3.0 (Sociedade Civil Mamirauá/MCT-CNPq).

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Consumo alimentar e ganho de peso

O consumo alimentar (g), calórico (kcal), protéico (g) e de nitrogênio (g) foram equivalentes entre os grupos *Sham*, OINT e CIT ( $p > 0,05$ ). O ganho de peso diferiu estatisticamente entre os grupos OINT e CIT ( $p < 0,05$ ), bem como entre *Sham* e CIT ( $p < 0,01$ ). No entanto, entre os grupos OINT e *Sham* não foi observada diferença quanto ao ganho de peso ( $p > 0,05$ ), conforme Tabela 4.

**Tabela 4.** Ganho de peso, consumo alimentar, calórico, protéico e de nitrogênio.

	Grupo experimental		
	<i>Sham</i>	OINT	CIT
Ganho de peso (g/semana)	7,06 ± 1,42	6,46 ± 1,48	4,58 ± 1,15*
Consumo alimentar (g/dia)	5,61 ± 0,78	5,80 ± 0,77	5,17 ± 0,36
Ingestão calórica (kcal/dia)	18,68 ± 2,60	19,35 ± 2,56	17,22 ± 1,20
Ingestão protéica (g/dia)	1,29 ± 0,18	1,33 ± 0,16	1,19 ± 0,08
Ingestão de nitrogênio (g/dia)	0,17 ± 0,02	0,17 ± 0,02	0,16 ± 0,01

Dados expressos como média ± DP (n=8).

\*Indica diferença estatística em relação aos demais grupos ( $p < 0,05$ ).

### 5.2. Translocação bacteriana

Verifica-se pela Tabela 5 que os animais do grupo CIT demonstraram níveis de translocação bacteriana significativamente reduzidos para sangue e todos os órgãos analisados ( $p < 0,05$ ), quando comparados com os animais do grupo OINT. O tratamento com citrulina diminuiu a translocação bacteriana para níveis fisiológicos no baço, pulmões e linfonodos mesentéricos ( $p > 0,05$ ). Os resultados foram similares no grupo *Sham*, ao se considerarem estes parâmetros ( $p > 0,05$ ).

**Tabela 5.** Biodistribuição da  $^{99m}\text{Tc}$ -*E. coli* nos tecidos dos diferentes grupos experimentais.

Órgão/Sangue	cpm/g		
	<i>Sham</i>	OINT	CIT
*NLM	29,50 <sup>a</sup>	69,50 <sup>b</sup>	30,50 <sup>a</sup>
Sangue	66,67 <sup>a</sup>	278,63 <sup>b</sup>	168,40 <sup>c</sup>
Fígado	285,58 <sup>a</sup>	1462,20 <sup>b</sup>	606,22 <sup>c</sup>
Baço	350,00 <sup>a</sup>	1172,22 <sup>b</sup>	337,14 <sup>a</sup>
Pulmões	182,14 <sup>a</sup>	777,06 <sup>b</sup>	225,00 <sup>a</sup>

Comparação simultânea entre os diferentes grupos de tratamentos.

Dados expressos como mediana (n=8).

cpm/g: contagem por minuto/grama.

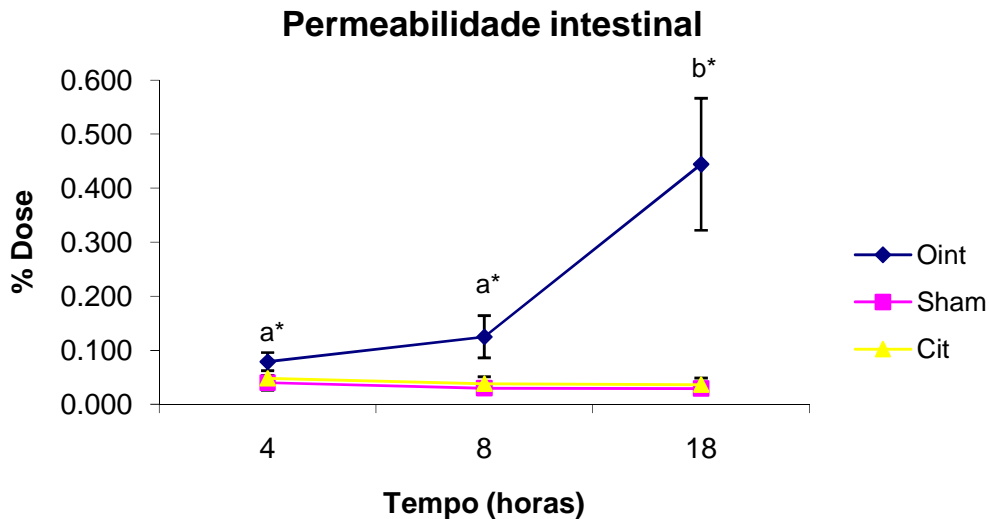
a, b, c: letras diferentes indicam diferença estatística ( $p < 0,05$ ).

\*NLM: nódulos linfáticos mesentéricos.

### 5.3. Permeabilidade intestinal

Os dados de permeabilidade intestinal estão representados na Figura 9. O grupo *Sham* não apresentou diferença estatística entre os tempos de 4, 8 e 18 h ( $p > 0,05$ ). No grupo OINT, a permeabilidade foi similar nos tempos de 4 e 8 h ( $p > 0,05$ ), mas foi maior no tempo de 18 h em relação aos dois primeiros momentos ( $p < 0,01$ ). Os animais do grupo tratado (CIT) mostraram o mesmo comportamento da permeabilidade intestinal com relação àqueles do grupo *Sham*.

Comparando-se a permeabilidade intestinal entre os grupos, verificou-se que o percentual da dose de  $^{99m}\text{Tc}$ -DTPA administrada encontrada no sangue foi diferente nos três tempos entre os grupos *Sham* e OINT ( $p < 0,05$ ), assim como entre os grupos OINT e CIT ( $p < 0,05$ ). Os animais dos grupos *Sham* e CIT demonstraram semelhante permeabilidade intestinal nos diversos tempos estudados ( $p > 0,05$ ), indicando que a citrulina manteve a permeabilidade intestinal em níveis fisiológicos.



**Figura 9.** Permeabilidade intestinal dos grupos OINT, *Sham* e CIT.

Valores expressos em média  $\pm$  DP (n=4).

% dose = (cpm do sangue\*100)/cpm da dose administrada.

(\*) indica diferença estatística entre os grupos avaliados (p<0,05).

Letras diferentes indicam diferença estatística entre os tempos do mesmo grupo (p<0,05).

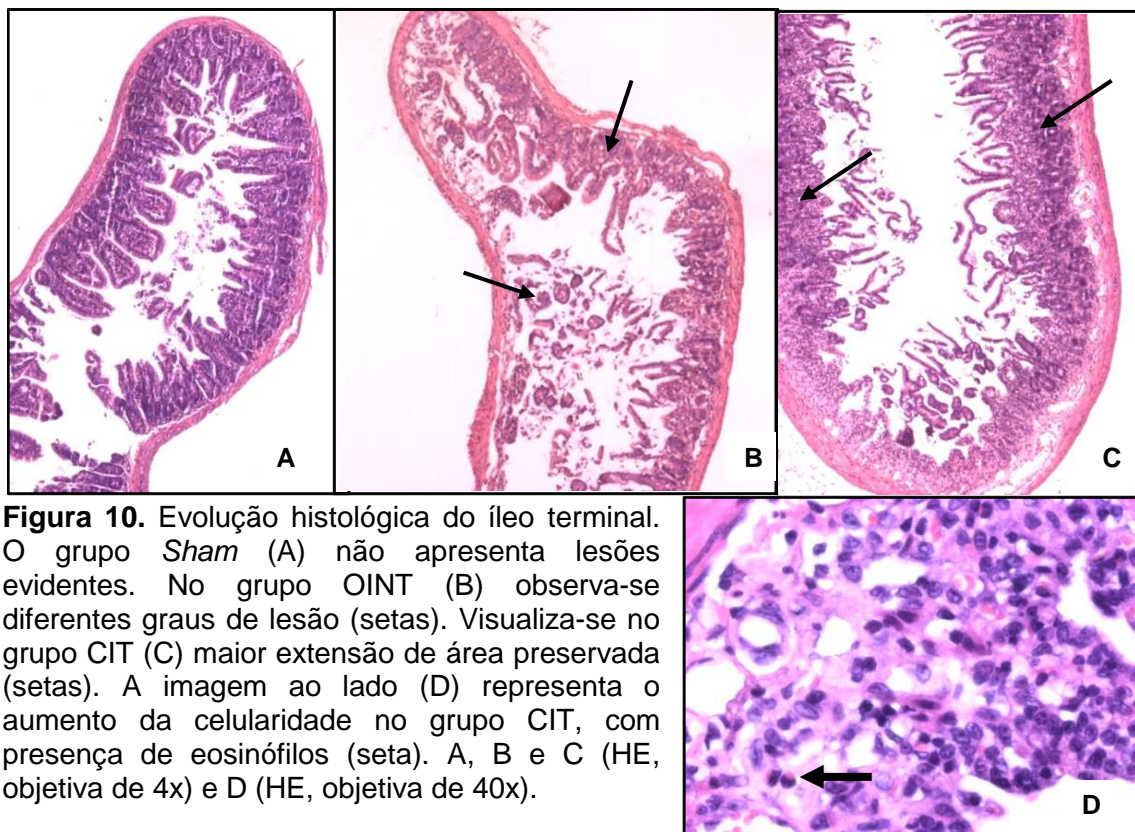
#### 5.4. Histologia do íleo terminal

O grupo *Sham* apresentou discreto edema difuso da submucosa e algumas áreas de descamação do epitélio das vilosidades. No entanto, o aspecto arquitetural está preservado, sem lesões celulares evidentes (Figura 10A). O epitélio é preservado na maior extensão, com discretas e inespecíficas alterações em raras áreas.

No grupo OINT, a variação do aspecto histológico do intestino e do grau de lesão afetando a parede intestinal foi muito pequena entre os animais. As lesões do intestino ocorreram predominantemente na mucosa, na submucosa e, algumas vezes, nas camadas musculares do órgão. A Figura 10B mostra o aspecto panorâmico dos intestinos deste grupo, evidenciando lesões focais que se intercalam com áreas preservadas. Observa-se ainda a presença de degeneração e necrose isquêmica (de coagulação) de áreas bem delimitadas da parede do segmento anular do intestino examinado. Estas se apresentam atróficas, com perda da celularidade e dos contornos das células ainda preservadas que passam a formar um arcabouço de vilosidades intestinais despovoadas de enterócitos, com grande extensão de edema que se estende também à lâmina própria da submucosa. Em algumas áreas, as camadas muscular e serosa também apresentam alterações necrótico-degenerativas neste grupo. A transição com a área normal mostra nitidamente a preservação da arquitetura tecidual do intestino a despeito da presença de fenômenos vasculares de zona

limítrofe, tais como congestão, edema e discretas alterações inespecíficas do epitélio, além de ulcerações e perda da integridade do mesmo. Não há evidente aumento da celularidade ou migração predominante de tipos celulares específicos neste material, no tempo de 18 h, após a ligadura do íleo terminal.

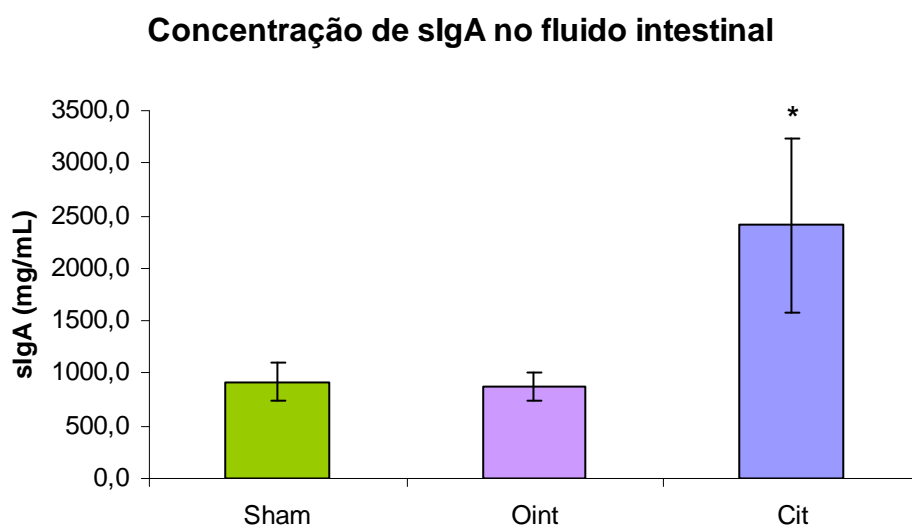
No grupo CIT visualiza-se maior extensão da área preservada em relação ao grupo OINT (Figura 10C). Esta se intercala com pequenas extensões de áreas lesadas, que já apresentam a lâmina própria da mucosa relativamente íntegra e revestida por esboços dos eixos das vilosidades com revestimento epitelial. O aspecto da lâmina própria exhibe aumento da celularidade, principalmente de células mono e polimorfonucleares, predominantemente eosinófilos (Figura 10D). Há deposição de matriz de tecido conjuntivo rico em vasos neoformados na submucosa e nos eixos vilositários, com edema discreto, mas presente em algumas áreas. Há vasos hiperemiados contendo hemácias. As ulcerações da mucosa são raramente observadas.



**Figura 10.** Evolução histológica do íleo terminal. O grupo *Sham* (A) não apresenta lesões evidentes. No grupo OINT (B) observa-se diferentes graus de lesão (setas). Visualiza-se no grupo CIT (C) maior extensão de área preservada (setas). A imagem ao lado (D) representa o aumento da celularidade no grupo CIT, com presença de eosinófilos (seta). A, B e C (HE, objetiva de 4x) e D (HE, objetiva de 40x).

## 5.5. Concentração de sIgA no fluido intestinal

A média das concentrações obtidas de imunoglobulina A secretória (sIgA) no fluido intestinal foi  $921,50 \pm 182,06$  mg/mL para o grupo *Sham*;  $876,62 \pm 136,49$  para o grupo OINT e  $2414,78 \pm 828,24$  para o grupo CIT. A concentração de sIgA foi similar entre os grupos *Sham* e OINT ( $p > 0,05$ ). O grupo CIT apresentou maiores concentrações do anticorpo em relação aos demais grupos ( $p < 0,05$ ) (Figura 11).



**Figura 11.** Concentração de sIgA no fluido intestinal dos grupos *Sham*, OINT e CIT.

Valores expressos em média  $\pm$  DP (n=4).

\*Indica diferença estatística em relação aos demais grupos ( $p < 0,05$ ).

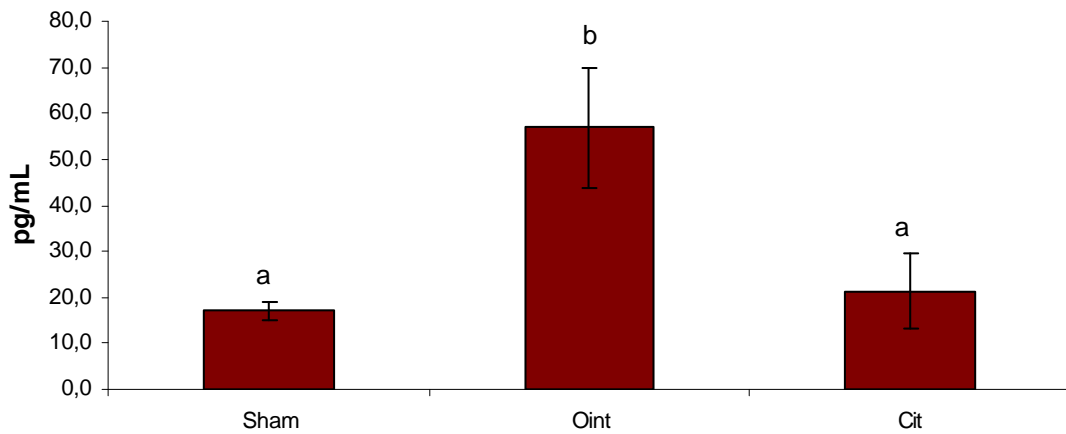
## 5.6. Níveis de citocinas no soro

Observam-se nas Figuras 12 e 13 os níveis séricos de INF- $\gamma$  e IL-10 para os animais dos grupos investigados. Os níveis médios de INF- $\gamma$  em pg/mL foram de  $17,08 \pm 1,92$ ,  $56,86 \pm 13,03$  e  $21,36 \pm 8,03$  para os grupos *Sham*, OINT e CIT, respectivamente. Houve diferença estatística entre os grupos *Sham* e OINT ( $p < 0,01$ ), bem como entre CIT e OINT ( $p < 0,01$ ), sugerindo maiores sinais de inflamação no grupo OINT. Não foi verificada diferença estatisticamente significativa entre os grupos *Sham* e CIT ( $p > 0,05$ ).

Quanto aos níveis de IL-10, os valores médios encontrados foram de  $71,93 \pm 2,28$  para o grupo *Sham*;  $69,44 \pm 11,17$  para o grupo OINT e  $87,30 \pm 13,42$  para o grupo CIT. Os níveis dessa citocina não diferiram estatisticamente entre os grupos ( $p > 0,05$ ).

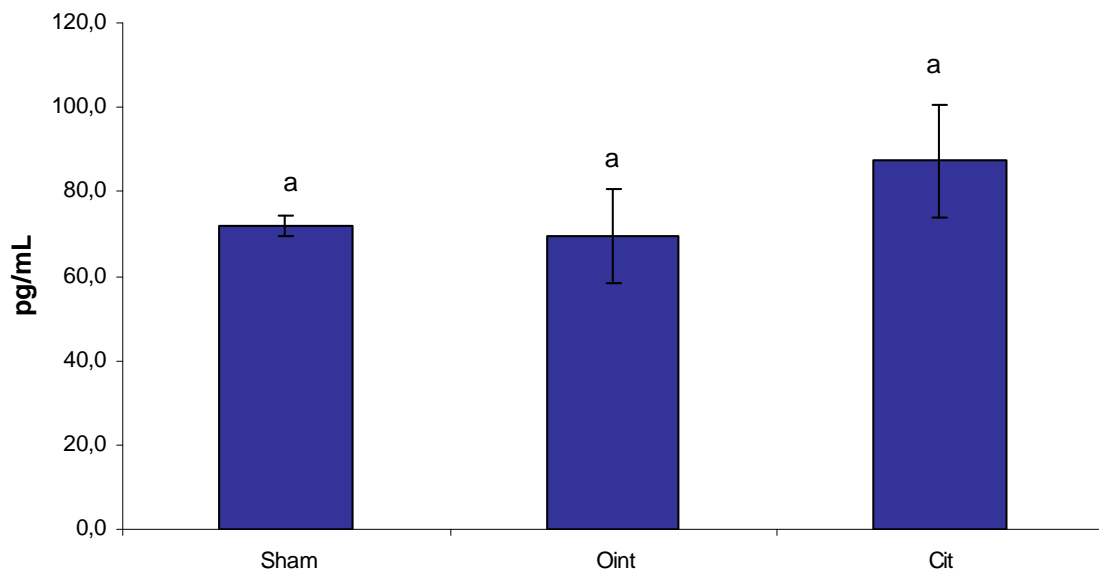


### Níveis séricos de INF-gama



**Figura 12.** Níveis séricos de INF- $\gamma$  dos grupos *Sham*, OINT e CIT. Valores expressos em média  $\pm$  DP (n=3). Letras diferentes indicam diferença estatística entre os grupos (p<0,05).

### Níveis séricos de IL-10



**Figura 13.** Níveis séricos de IL-10 dos grupos *Sham*, OINT e CIT. Valores expressos em média  $\pm$  DP (n=3). Letras iguais indicam que não houve diferença estatística entre os grupos (p>0,05).

## 6. DISCUSSÃO

A citrulina é um nutriente que está em ascensão, devido às descobertas crescentes sobre sua influência no metabolismo. Com o intuito de minimizar as interferências na interpretação dos dados foram preparadas dietas isocalóricas (332 kcal/100g) e isoprotéicas (23g/100g). A composição final da dieta convencional, consumida pelos grupos *Sham* (controle) e OINT e da dieta suplementada, ingerida pelo grupo CIT foi a mesma em termos de macronutrientes (51% de carboidrato, 23% de proteína e 4% de lipídio).

O grupo tratado (CIT) apresentou menor consumo alimentar, calórico, protéico e de nitrogênio, apesar de não ter havido diferença estatisticamente significativa entre os três grupos. O ganho de peso foi significativamente menor nos animais do grupo CIT, comparando-os com os grupos *Sham* e OINT (Tabela 4). Salienta-se que, mesmo ganhando menos peso, os animais tratados com citrulina responderam positivamente à agressão que sofreram.

O método da bactéria marcada ( $^{99m}\text{Tc}$ -*E. coli*) foi escolhido neste trabalho por ser rápido, direto, simples e não requerer condições assépticas durante os experimentos (DINIZ et al., 2005; OLIVEIRA et al., 2006; QUIRINO et al., 2007; SANTOS et al., 2009; VIANA et al., 2010). Além disso, permite a detecção de produtos bacterianos e fragmentos independentes da viabilidade (WHITE et al., 2006).

Os dados da biodistribuição da  $^{99m}\text{Tc}$ -*E. coli* (Tabela 5) mostraram aumento estatisticamente significativo na captação da bactéria radiomarcada pelo sangue e por todos os órgãos investigados do grupo OINT, quando comparado com os animais do grupo *Sham*. Esses dados confirmam que este modelo experimental é eficaz para promover a translocação bacteriana da  $^{99m}\text{Tc}$ -*E. coli*, conforme já demonstrado por trabalhos anteriores desenvolvidos em nosso laboratório (OLIVEIRA et al., 2006, QUIRINO et al., 2007; SANTOS et al., 2009; VIANA et al., 2010).

Os baixos níveis de translocação bacteriana observados nos animais do grupo *Sham* corroboram os estudos prévios de OLIVEIRA et al. (2006), QUIRINO et al. (2007), SANTOS et al. (2009) e VIANA et al. (2010), que também verificaram níveis reduzidos de translocação bacteriana no grupo *Sham*. Alguns pesquisadores afirmam que a translocação de bactérias em quantidades pequenas é um fenômeno fisiológico e espontâneo, necessário como estímulo para o sistema reticuloendotelial, principalmente para as células de Kupffer no fígado (CHIN et al., 2007; BALZAN et al., 2007).

A citrulina foi capaz de reduzir estatisticamente os níveis de translocação da  $^{99m}\text{Tc}$ -*E. coli* para o sangue e todos os órgãos, considerando-se o grupo OINT (Tabela 5). No grupo tratado, a translocação bacteriana foi similar ao grupo *Sham* para NLM, baço e pulmões. Níveis fisiológicos de  $^{99m}\text{Tc}$ -*E. coli* não foram identificados apenas no sangue e no fígado do grupo CIT. O fato ocorrido pode ser explicado pelas várias vias de translocação dos microrganismos para sítios extra-intestinais, propostas por WIEST & RATH (2003): migração retrógrada para os pulmões; migração transmural direta através da parede intestinal; migração linfática via placas de Peyer; migração via nódulos linfáticos mesentéricos; migração via ducto torácico; migração via circulação sistêmica ou via canais vasculares alcançando o sistema porta. Assim, a *E. coli* poderia ter migrado pelo sistema porta e atingido em menor número os NLM, sendo mais detectada no sangue e no fígado dos animais do grupo CIT do que nos mesmos tecidos do grupo *Sham*. Acredita-se que o fígado retiraria os microrganismos do sangue venoso portal por meio da atividade fagocitária dos macrófagos, impedindo o espalhamento da bactéria para baço e pulmões (LEMAIRE et al., 1997), no caso do grupo tratado.

Na literatura não há relatos sobre o papel da citrulina no processo de translocação bacteriana. Por ser precursora da arginina, admite-se que a ação da citrulina poderia ser mediada, indiretamente, por intermédio da arginina.

QUIRINO et al. (2007), utilizando o modelo experimental de obstrução intestinal em ratos suplementados com arginina (300mg/dia, 600mg/dia ou Impact®), observaram redução dos níveis de translocação bacteriana para o sangue e os demais órgãos investigados. A translocação bacteriana nos grupos suplementados foi similar ao grupo *Sham*, mostrando que não diferiu dos níveis fisiológicos. VIANA et al. (2010) mostraram também que a arginina reduziu a translocação bacteriana para níveis fisiológicos no sangue e em todos os órgãos avaliados, em modelo experimental de obstrução intestinal.

A translocação bacteriana exacerbada constitui uma das causas mais comuns de sepsis (WIEST & RATH, 2003). A sepsis é definida como a resposta sistêmica à infecção. É o principal problema de saúde pela significativa morbidade, taxa de mortalidade acima de 30% e, geralmente, requer tratamento e cuidado intensivos. Em pacientes sépticos, a concentração de arginina parece ser marcadamente menor que nos demais pacientes sem esta alteração. A reduzida disponibilidade de arginina é atribuída à menor produção de arginina e maior clareamento do aminoácido, levando à diminuição da arginina plasmática (LUIKING et al., 2009).

Pacientes críticos apresentam comumente resposta inflamatória exagerada, relacionada ao aumento da produção de óxido nítrico (NO), aumento da arginase e reduzida síntese de arginina nos rins (VAN WAARDENBURG, 2007). Nesses casos, concentrações fisiológicas de arginina são benéficas. No entanto, em doses suplementares esse aminoácido aumenta a atividade da enzima eNOS (endotelial), a discrepância conhecida como paradoxo da L-arginina (KAO et al., 2009).

A suplementação com citrulina poderia constituir-se em boa estratégia para restaurar o anabolismo protéico e a síntese adequada de NO, mediante as contradições do uso da arginina, especialmente na sepsis. Estudos concluíram que a citrulina é eficaz em originar NO, tanto em indivíduos saudáveis (SCHWEDHELM et al., 2008), quanto em pacientes com sepsis (KAO et al., 2009; LUIKING et al., 2009) e macrófagos *in vitro* (BRYK et al., 2008). O NO favorece o adequado aporte sanguíneo e tônus microvascular. Baixos níveis de NO produzidos pela eNOS são necessários à manutenção da homeostase intestinal (CHOKSHI et al., 2008).

O método de avaliação da permeabilidade intestinal, com contagem da radioatividade no sangue a partir da dose de <sup>99m</sup>Tc-DTPA administrada é inovador, simples, prático e de baixo custo, conforme estudos realizados em nosso laboratório por SANTOS et al. (2009) e VIANA et al. (2010). O DTPA é uma molécula que raramente atravessa a barreira intestinal. Contudo, quando a permeabilidade intestinal está aumentada como resultado da injúria na mucosa intestinal, ocorre permeação do DTPA pelo intestino e, portanto, esse fármaco aparece em maior concentração na corrente sanguínea (JORGENSEN et al., 2006).

Os resultados mostraram aumento significativo da permeabilidade intestinal no tempo de 18 h nos animais do grupo OINT, quando comparado com os animais do grupo *Sham* (Figura 9). Observa-se que esse dado coincide com a translocação bacteriana estatisticamente aumentada para o grupo OINT (Tabela 5). De acordo com BERG (1995), a falência da barreira intestinal aumenta a permeabilidade da mucosa, o que parece contribuir na promoção da translocação bacteriana.

Os animais que receberam o tratamento com citrulina apresentaram níveis de permeabilidade intestinal similares àqueles encontrados para o grupo *Sham*, a despeito da agressão (Figura 9). A arginina e a glutamina também preservaram a permeabilidade intestinal em animais que sofreram obstrução intestinal (SANTOS et al. 2009; VIANA et al., 2010).

As análises histológicas do íleo terminal, disponibilizadas na Figura 10, indicam que a citrulina atuou no aumento do *turnover* celular após a obstrução intestinal, visto

que se visualizou neoformação de vasos, deposição de tecido conjuntivo e células inflamatórias no intestino dos animais tratados. Desta forma, os animais tratados com este aminoácido apresentaram menor grau de lesão do que os animais não tratados (OINT). Os resultados histológicos observados foram semelhantes aos encontrados em trabalho publicado pelo nosso grupo (VIANA et al., 2010). Contudo, no presente estudo houve aumento da celularidade no grupo CIT, com presença de eosinófilos, o que não foi verificado no trabalho supracitado.

Os eosinófilos são células com grânulos citoplasmáticos que secretam radicais oxigenados livres e produzem o PAF (*platelet-activating factor*), que aumenta a permeabilidade vascular e a quimiotaxia, perpetuando a inflamação e induzindo a produção de muco. A ação primordial desse tipo celular é contra parasitas, porém o eosinófilo fagocita outros patógenos e libera substâncias anti-inflamatórias (PEIXOTO, 2004).

Nota-se o envolvimento dos eosinófilos na patogênese de doenças inflamatórias crônicas respiratórias (PEIXOTO, 2004) e intestinais (LAMPINEN et al., 2008). Já em condições agudas, como neste modelo experimental, estas células poderiam ser benéficas, à medida que participariam da defesa do hospedeiro e atenuariam os danos teciduais.

Outro ponto que deve ser mencionado é que a citrulina apresenta ação antioxidante, atuando como varredor de radicais livres, especialmente com relação ao radical hidroxil (OH.) (MOINARD & CYNOBER, 2007). Esta característica complementar poderia auxiliar na manutenção da integridade epitelial, amenizando o impacto da injúria isquêmica durante a obstrução intestinal.

A resposta humoral local foi ampliada com o uso da citrulina, o que conferiu proteção contra a translocação bacteriana. A concentração de sIgA foi estatisticamente maior no fluido intestinal dos animais tratados com citrulina, quando se comparou com os demais grupos (Figura 11).

A imunoglobulina A secretória (sIgA) desempenha papel importante na imunidade da mucosa intestinal, compreendendo a primeira linha de defesa das superfícies da mucosa intestinal e extra-intestinais no combate aos microrganismos (QIAO et al., 2005). A sIgA aglutina potenciais invasores, facilitando o clareamento pelo peristaltismo e movimentos mucociliares (KADAUI & CORTHÉSY, 2007), cujo mecanismo é conhecido como imunoexclusão (KADAUI & CORTHÉSY, 2007; AMIN et al., 2008).

slgA é funcionalmente única, pois oferece proteção ao hospedeiro contra patógenos sem provocar resposta inflamatória e quando ligada ao antígeno, slgA não ativa a cascata do complemento. A inibição da ativação da cascata do complemento mediada por IgG e IgM é feita pela slgA, o que confere ação anti-inflamatória sobre si mesma (AMIN et al., 2008).

A característica marcante desta imunoglobulina é a adesão seletiva às células M nas placas de Peyer intestinais de camundongos. A captação de slgA permite o direcionamento para as células dendríticas, que se tornam parcialmente ativadas (KADAQUI & CORTHÉSY, 2007). A slgA pode impedir a adesão bacteriana, que é considerada crucial para iniciar a invasão da mucosa e infecção. A deficiência de slgA resulta em supercrescimento bacteriano, adesão e translocação (QIAO et al., 2005).

Não existem evidências na literatura que justifiquem a relação entre citrulina e sistema imunológico intestinal. No entanto, a participação da arginina na imunomodulação é retratada em diversos trabalhos, referidos a seguir.

No intestino, a arginina parece exercer vários efeitos, como aumento da secreção de slgA, cicatrização de feridas, deposição de colágeno e síntese de poliaminas, mantendo a morfologia e modulando a resposta imunológica, protegendo contra a translocação bacteriana (ERSIN et al., 2000). O aumento da secreção de slgA pode ser um mecanismo pelo qual a arginina auxilia na redução da translocação bacteriana. A IgA secretória é importante efetor da imunidade específica contra patógenos intraluminais, impedindo a fixação na superfície da mucosa intestinal (SAWAI et al., 2001).

FAN et al. (2010) compararam a nutrição enteral convencional e a nutrição enteral suplementada com arginina em camundongos com queimaduras (20% da área corporal). Os animais foram tratados durante sete dias após a injúria e verificou-se que o grupo suplementado com arginina apresentou níveis maiores de slgA. Outros autores também demonstraram que a suplementação com arginina aumenta a secreção de IgA em ratos sépticos (SHANG et al., 2004).

Mediadores endógenos regulatórios como as citocinas executam importante papel no controle do reconhecimento inato inapropriado e manutenção da homeostase intestinal em estudos *in vivo* (LOTZ et al., 2007). As citocinas contribuem para modular apropriadamente a função e a extensão da ativação de linfócitos, além de evitar a autoimunidade ou dano tecidual excessivo durante a inflamação (SANJABI et al., 2009).

A ação da citrulina no perfil de citocinas (Figuras 12 e 13) foi marcada pela ausência de diferença entre os grupos quanto aos níveis de IL-10 no soro. Observa-se manutenção do estímulo da resposta anti-inflamatória do tipo Th2 no grupo tratado com citrulina. Por outro lado, houve redução dos níveis de INF- $\gamma$  para níveis fisiológicos semelhantes ao *Sham* nos animais do grupo CIT, com menor indução da resposta Th1. O grupo OINT apresentou os maiores níveis de INF- $\gamma$ , indicando inflamação acentuada subsequente à injúria intestinal.

Pesquisa recente do nosso laboratório (dados não publicados) com suplementação dietética de arginina (2% do VET) no grupo obstruído mostrou aumento de IL-10 no soro dos animais, quando comparado com os animais dos grupos OINT e *Sham*. Com relação aos níveis de INF- $\gamma$  encontraram-se níveis semelhantes àqueles determinados para o grupo OINT.

Trabalho realizado por FAN et al. (2010) reportou que os níveis de IL-4 e IL-10 se elevaram com a suplementação com arginina em camundongos queimados e houve redução dos níveis de INF- $\gamma$  e IL-2 em homogenatos intestinais. Como possíveis mecanismos pelos quais a arginina favorece a resposta de citocinas Th2 é a redução da resposta inflamatória Th1 com paralelo aumento na produção de óxido nítrico (NO). NO modula o fenótipo das células T e a mudança do padrão Th1 para Th2 (LECLEIRE et al., 2008; FAN et al., 2010).

A manutenção dos níveis de IL-10 pela citrulina poderia associar-se à indução da produção de IgA e controle da destruição tecidual, o que realmente foi aqui demonstrado. A IL-10 reduz a produção de citocinas inflamatórias em macrófagos e direciona a diferenciação de células T para o tipo Th2 (LOTZ et al., 2007), estimulando a resposta mediada por IgA (FAN et al., 2010). Além disso, a IL-10 protege contra inflamação intestinal, preservando a função das junções *Tight* (AL-SADI et al., 2009).

A citrulina regularia a inflamação também pela redução dos níveis séricos de INF- $\gamma$ . O INF- $\gamma$  encontra-se elevado nas doenças inflamatórias intestinais e atribui-se a ele o aumento da permeabilidade das junções epiteliais *Tight* (AL-SADI & MA, 2007; GROSCWITZ & HOGAN, 2009; SCHARL et al., 2009). As junções epiteliais *Tight* são cruciais para a manutenção da função da barreira intestinal e prevenção da permeação paracelular de agentes luminiais nocivos (AL-SADI & MA, 2007).

Desta maneira, os efeitos da citrulina na imunidade celular e humoral podem estar relacionados à diminuição dos níveis de translocação bacteriana, pela preservação da permeabilidade intestinal e da integridade da barreira intestinal. Em

razão de poucos trabalhos descritos na literatura, este estudo poderá servir como referência para posteriores trabalhos sobre este tema.

A citrulina parece exercer funções essenciais, o que contribui para abertura de nova linha de investigações científicas e futuras aplicações na clínica. Com a finalidade de elucidar melhor as funções da citrulina, novos estudos serão necessários para identificar os mecanismos envolvidos na ação deste aminoácido, para que o mesmo seja considerado imunonutriente com características peculiares e complementares.



## 7. CONCLUSÕES

- O tratamento com citrulina, na dose de 30mg/dia, promoveu a redução dos níveis de translocação bacteriana para todos os tecidos investigados;
- Os animais obstruídos tratados com citrulina apresentaram níveis fisiológicos de permeabilidade intestinal, similares àqueles observados para o grupo *Sham*;
- Os dados histológicos mostraram que a citrulina desempenha ação protetora sobre o epitélio intestinal;
- A citrulina aumentou a resposta imunológica local, ou seja, a concentração de sIgA no fluido intestinal;
- A suplementação com citrulina parece modular a resposta imunológica sistêmica, por meio da diminuição da citocina pró-inflamatória (INF- $\gamma$ ) para níveis fisiológicos e manutenção dos níveis da citocina anti-inflamatória (IL-10) no soro.

## 8. PERSPECTIVAS FUTURAS

- Estudar o papel da citrulina no metabolismo protéico, pela determinação do teor de proteínas e nitrogênio no músculo, intestino e conteúdo intestinal;
- Avaliar a ação da citrulina no perfil de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias do tecido intestinal;
- Relacionar o perfil de citocinas do tecido intestinal à expressão de proteínas das junções epiteliais;
- Analisar os efeitos da suplementação com citrulina nas concentrações plasmáticas de citrulina e arginina, utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE);
- Investigar a influência da citrulina na via do óxido nítrico, com mensuração dos níveis deste radical livre no tecido intestinal e no plasma.

## 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACHESON, D.W.K.; LUCCIOLI, S. Mucosal immune responses. *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.*, v. 18, p. 387-404, 2004.
- AL-SADI, R.M.; MA, T.Y. IL-1 $\beta$  causes an increase in intestinal epithelial tight junction permeability. *J. Immunol.*, v. 178, p. 4641-4649, 2007.
- AL-SADI, R.; BOIVIN, M.; MA, T. Mechanism of cytokine modulation of epithelial tight junction barrier. *Front. Biosci.*, v. 14, p. 2765-2778, 2009.
- AMIN, P.B.; DIEBEL, L.N.; LIBERATI, D.M. Secretory immunoglobulin A blunts gut-mediated priming of neutrophils in vitro. *J. Trauma*, v. 64, p. 1437–1442, 2008.
- ANDERSON, D.G.; JAIN, P.K.; FLEMING, S.; POON, P.; MITCHELL, C.J.; MACFIE, J. Evaluation of a triple sugar test of colonic permeability in humans. *Acta Physiol. Scand.*, v. 182, p. 171–177, 2004.
- ARRIETA, M.C. BISTRITZ, L.; MEDDINGS, J.B. Alterations in intestinal permeability. *Gut*, v. 55, p. 1512–1520, 2006.
- BAHRI, S.; CURIS, E.; AUSSEL, C. Caractèrisation *in vitro* du transport intestinal de la citrulline. *Nut. Clin. Metab.*, v. 20, n. 2, p. S111 (abstract), 2006.
- BAHRI, S.; CURIS, E.; EL WAFI, F.Z.; AUSSEL, C.; CHAUMEIL, J.C.; CYNOBER, L.; ZERROUK, N. Mechanisms and kinetics of citrulline uptake in a model of human intestinal epithelial cells. *Clin Nutr.*, v. 27, n. 6, p.872-880, 2008.
- BALZAN, S.; QUADROS, C. A.; CLEVA, R.; ZILBERSTEIN, B.; CECCONELLO, I. Bacterial translocation: overview of mechanisms and clinical impact. *J. Gastroenterol. Hepatol.*, v. 22, p. 464-471, 2007.
- BARBUL, A.; ULIYARGOLI, A. Use of exogenous arginine in multiple organ dysfunction syndrome and sepsis. *Crit Care Med.*, v. 35, n. 9, p. S564-S567, 2007.

- BARNES, M.J.; POWRIE, F. Regulatory T cells reinforce intestinal homeostasis. *Immunity*, v. 31, p. 401-411, 2009.
- BERG, R.D.; GARLINGTON, A.W. Translocation of certain indigenous bacteria from the gastrointestinal tract to the mesenteric lymph nodes and other organs in a gnotobiotic mouse model. *Infect. Immun.*, v. 23, p. 403-411, 1979.
- BERG, R.D. Bacterial translocation from the gastrointestinal tract. *Trends Microbiol.*, v. 3, p. 149-154, 1995.
- BERG, R.D. Bacterial translocation from the gastrointestinal tract. *Adv. Exp. Med. Biol.*, v. 473, p. 11-30, 1999.
- BJARNASON, I.; MACPHERSON, A.; HOLLANDER, D. Intestinal permeability: an overview. *Gastroenterology*, v. 108, p. 1566-1581, 1995.
- BOLSTER, D.R.; VARY, T.C.; KIMBALL, S.R.; JEFFERSON, L.S. Leucine regulates translation initiation in rat skeletal muscle via enhanced eIF4G phosphorylation. *J. Nutr.*, v. 134, p. 1704–1710, 2004.
- BRYK, J.; OCHOA, J.B.; CORREIA, M.I.; MUNERA-SEELEY, V.; POPOVIC, P.J. Effect of citrulline and glutamine on nitric oxide production in RAW 264.7 cells in an arginine-depleted environment. *JPEN J. Parenter. Enteral Nutr.*, v. 32, n. 4, 377-383, 2008.
- CEBALLOS, I.; CHAUVEAU, P.; GUERIN, V.; BARDET, J.; PARVY, P.; KAMOUN, P.; JUNGERS, P. Early alterations of plasma amino acids in chronic renal failure. *Clin. Chim. Acta*, v. 188, p. 101–108, 1990.
- CHIN, K.F.; KALLAM, R; O'BOYLE, C; MACFIE, J. Bacterial translocation may influence the long-term survival in colorectal cancer patients. *Dis. Colon Rectum*, v. 50, n. 3, p. 323-330, 2007.

- CHOKSHI, N.K.; HUNTER, C.J.; GUNER, Y. S.; GRISHIN, A.; FORD, H.R. The role of nitric oxide in intestinal epithelial injury and restitution in neonatal NEC. *Semin. Perinatol.*, v. 32, n. 2, p. 92–99, 2008.
- COLLINS, J.K.; WU, G.; PERKINS-VEAZIE, P.; SPEARS, K.; CLAYPOOL, P. L.; BAKER, R. A. et al. Watermelon consumption increases plasma arginine concentrations in adults. *Nutrition*, v. 23, p. 261-266, 2007.
- COUPER, K.N.; BLOUNT, D.G.; RILEY, E.M. IL-10: The master regulator of immunity to infection. *J. Immunol.*, v. 180, p. 5771–5777, 2008.
- CRENN, P.; MATUCHANSKY, C.; MESSING, B. Clinical and biochemical modelization of postsurgical intestinal failure in human adults. *Clin. Nutr.*, v. 16, p. 133-135, 1997.
- CRENN, P.; COUDRAY-LUCAS, C.; CYNOBER, L.; MESSING, B. Postabsorptive plasma citrulline concentration: a marker of intestinal failure in humans. *Transplant. Proc.*, v. 30, p. 2528-2528, 1998.
- CRENN, P.; COUDRAY-LUCAS, C.; THUILLIER, F.; CYNOBER, L.; MESSING, B. Postabsorptive plasma citrulline concentration is a marker of absorptive enterocyte mass and intestinal failure in humans. *Gastroenterology*, v. 119, p. 1495–1505, 2000.
- CRENN, P.; VAHEDI, K.; LAVERGNE-SLOVE, A.; CYNOBER, L.; MATUCHANSKY, C.; MESSING, B. Plasma citrulline: a marker of enterocyte mass in villous atrophy-associated small bowel disease. *Gastroenterology*, v. 124, p. 1210–1219, 2003.
- CRENN, P.; MESSING, B.; CYNOBER, L. Citrulline as a biomarker of intestinal failure due to enterocyte mass reduction. *Clin. Nutr.*, v. 27, p. 328-339, 2008.
- CURIS, E.; NICOLIS, I.; MOINARD, C.; OSOWSKA, S.; ZERROUK, N.; BÉNAZETH, S.; CYNOBER, L. Almost all about citrulline in mammals. *Amino Acids*, v. 29, p. 177-205, 2005.

- CURIS, E.; CRENN, P.; CYNOBER, L. Citrulline and the gut. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care*, v. 10, p. 620–626, 2007.
- CYNOBER, L.; LE BOUCHER, J.; VASSON, M. Arginine metabolism in mammals. *J Nutr. Biochem.*, v. 6, p. 402-413, 1995.
- CYNOBER, L. Plasma amino acid levels with a note on membrane transport: characteristics, regulation, and metabolic significance. *Nutrition*, v. 18, p. 761–766, 2002.
- DANI, R.; CASTRO, L.P. *Gastroenterologia Clínica*. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., 1993, v. 1, 579p.
- DARDEVET, D.; SORNET, C.; BALAGE, M.; GRIZARD, J. Stimulation of in vitro rat muscle protein synthesis by leucine decreases with age. *J. Nutr.*, v. 130, p. 2630–2635, 2000.
- DECHELOTTE, P.; HASSELMANN, M.; CYNOBER, L.; ALLAOUCHICHE, B.; COËFFIER, M.; HECKETSWEILER, B. et al. L-alanyl-L-glutamine dipeptide-supplemented total parenteral nutrition reduces infectious complications and glucose intolerance in critically ill patients: the French controlled, randomized, double-blind, multicenter study. *Crit. Care Med.*, v. 34, n. 3, p. 598-604, 2006.
- DEITCH, E.A. Simple intestinal obstruction causes bacterial translocation in man. *Arch. Surg.*, v. 124, p. 699-701, 1989.
- DEITCH, E.A.; BRIDGES, W.M.; MA, J.W.; MA, L.; BERG, R.D.; SPECIAN, R.D. Obstructed intestine as a reservoir for systemic infection. *Am. J. Surg.*, v. 159, p. 394-401, 1990.
- DE-SOUZA, D.A.; GREENE, L.J.; Intestinal permeability and systemic infections in critically ill patients: effect of glutamine. *Crit. Care Med.*, v. 33, n. 5, p. 1125-1135, 2005.

- DEUTZ, N.E.P. The 2007 ESPEN Sir David Cuthbertson Lecture: amino acids between and within organs. The glutamate-glutamine-citrulline-arginine pathway. *Clin. Nutr.*, v. 27, p. 321-327, 2008.
- DINIZ, S.O.F.; RESENDE, B.M.; NUNAN, E.A.; SIMAL, C.J.R.; CARDOSO, V.N. <sup>99m</sup>Techneium labelled *Escherichia coli*. *Appl. Radiat. Isot.*, v. 51, p. 33-36, 1999.
- 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 <sup>99m</sup>Tc-*Escherichia coli*. *Braz. Arch. Biol. Technol.*, v. 48, p. 45-49, 2005.
- DUCHEMANN, T.; OSOWSKA, S.; WALRAND, S.; PAILLARD, A.; BOIRIE, Y.; CYNOBER, L.; MOINARD, C. La Citrulline améliore l'accrétion protéique musculaire chez le rat âgé dénutri via une stimulation de la synthèse protéique. *Nut. Clin. Metabol.*, v. 18, p. S20 (abstract), 2004.
- DURANTE, A.P.; BARATELLA, J.R.S.; VELHOTE, M.C.P. et al. *Obstrução Intestinal no Lactente e na Criança Maior: Diagnóstico e Tratamento*. Projeto Diretrizes: Associação Brasileira de Cirurgia Pediátrica, 2005. 10p. Disponível em: <[http://www.projetodiretrizes.org.br/4\\_volume/26-Obsintestdiag.pdf](http://www.projetodiretrizes.org.br/4_volume/26-Obsintestdiag.pdf)>. Acesso em: 20 dez. 2009.
- EL-AWADY, S. I.; EL-NAGAR, M.; EL-DAKAR, M.; RAGAB, M. ELNADY, G. Bacterial translocation in an experimental intestinal obstruction model. *Acta Cir. Bras.*, v. 24, n. 2, p. 98-106, 2009.
- ERSIN, S.; TUNCYUREK, P.; ESASSOLAK, M.; ALKANAT, M.; BUKE, C.; YILMAZ, M. et al. The prophylactic and therapeutic effects of glutamine and arginine enriched diets on radiation induced enteritis in rats. *J. Surg. Res.*, v. 89, n. 2 p. 121–125, 2000.
- FAN, J.; MENG, Q.; GUO, G.; XIE, Y.; LI, X.; XIU, Y. et al. Effects of early enteral nutrition supplemented with arginine on intestinal mucosal immunity in severely burned mice. *Clin. Nutr.*, v. 29, n. 1, p. 124-130, 2010.

- FARHADI, A.; BANAN A.; FIELDS, J.; KESHAVARZIAN, A. Intestinal barrier: an interface between health and disease. *J. Gastroenterol. Hepatol.*, v. 18, p. 479–497, 2003.
- 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. *Biomed. Pharmacother.*, v. 56, n. 9, p. 427-438, 2002.
- FORDTRAN, J.S.; RECTOR, F.C.; LOCKLEAR, T.W.; EWTON, M.F. Water and solute movement in the small intestine of patients with sprue. *J. Clin. Invest.*, v. 46, p. 287-298, 1967.
- GATT, M.; REDDY, B.S.; MACFIE, J. Bacterial translocation in the critical ill - evidence and methods of prevention. *Aliment. Pharmacol. Therap.*, v. 25, p. 741- 757, 2007.
- GENEROSO, M.; DE ROSA, M.; DE ROSA, R.; DE MAGISTRIS, L.; SECONDULFO, M.; FIANDRA, R. et al. Cellobiose and lactulose coupled with mannitol and determined using ion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection, are reliable probes for investigation of intestinal permeability. *J. Chromatogr. B*, v. 783, n. 2, p. 349–357, 2003. Disponível em: <[www.elsevier.com/locate/chromb](http://www.elsevier.com/locate/chromb)>. Acesso em: 20 mar. 2008.
- GILCHRIST, M.; BEFUS, A. D. Interferon- $\gamma$  regulates chemokine expression and release in the human mast cell line HMC1: role of nitric oxide. *Immunology*, v. 123, n. 2, p. 209–217, 2008.
- GONDOLESI, G.; FISHBEIN, T.; CHEHADE, M.; TSCHERNIA, A.; MAGID, M.; KAUFMAN, S.; RAYMOND, K.; SANSARICQ, C.; LELEIKO, N. Serum citrulline is a



potential marker for rejection of intestinal allografts. *Transplant. Proc.*, v. 34, p. 918–920, 2002.

GONDOLESI, G. E.; KAUFMAN, S. S.; SANSARICQ, C.; MAGID, M. S.; RAYMOND, K. ILEDAN, L. P.; TAO, Y.; FLORMAN, S. S.; LELEIKO, N. S.; FISHBEIN, T. M. Defining normal plasma citrulline in intestinal transplant recipients. *Am. J. Transplant.*, v. 4, p. 414–418, 2004.

GROSCWITZ, K.R.; HOGAN, S.P. Intestinal barrier function: molecular regulation and disease pathogenesis. *J. Allergy Clin. Immunol.*, v. 124, p. 3-20, 2009.

GUARNER, F.; MALAGELADA, JUAN-R. Gut flora in health and disease. *Lancet*, v. 361, p. 512-19, 2003. Disponível em: <[www.thelancet.com](http://www.thelancet.com)>. Acesso em: 06 mar. 2008.

HARRIS, R.A.; POPOV, K. M.; ZHAO, Y.; SHIMOMURA, Y. Regulation of branched chain amino acid catabolism. *J. Nutr.*, v. 124, p. 1499S–502S, 1994.

HARTMAN, W.J.; TORRE, P.M.; PRIOR, R.L. Dietary citrulline but not ornithine counteracts dietary arginine deficiency in rats by increasing splanchnic release of citrulline. *J. Nutr.*, v. 124, p. 1950–1960, 1994.

HERMSEN, J.L.; SANO, Y.; KUDSK, K. Food fight! Parenteral nutrition, enteral stimulation and gut-derived mucosal immunity. *Langenbecks Arch. Surg.*, v. 394, p. 17-30, 2009.

HICKNER, R.C.; TANNER, C.J.; EVANS, C.A.; CLARK, P.D.; HADDOCK, A.; FORTUNE, C.; GEDDIS, H.; WAUGH, W.; MCCAMMON, M. L-Citrulline reduces time to exhaustion and insulin response to a graded exercise test. *Med. Sci Sports Exerc.*, v. 38, n. 4, p. 660-666, 2006.

ITO, R.; SHIN-YA, M.; KISHIDA, T.; URANO, A.; TAKADA, R.; SAKAGAMI, J. et al. Interferon-gamma is causatively involved in experimental inflammatory bowel disease in mice. *Clin. Exp. Immunol.*, n. 146, n. 2, p. 330–338, 2006.

- IZCUE, A.; COOMBES, J.L.; POWRIE, F. Regulatory lymphocytes and intestinal inflammation. *Annu. Rev. Immunol.*, v. 27, p. 313–338, 2009.
- JIA, W.; LI, H.; ZHAO, L.; NICHOLSON, J. K. Gut microbiota: a potential new territory for drug targeting. *Nature*, v. 7, p. 123-129, 2008. Disponível em: <[www.nature.com/reviews/drugdisc](http://www.nature.com/reviews/drugdisc)>. Acesso em: 06 mar. 2008.
- JORGENSEN, V.L.; NIELSEN, L.S.; ESPERSEN, K.; PERNER, A. Increased coloretal permeability in patients with severe sepsis and septic shock. *Intens. Care Med.*, v. 32, p. 1790-1796, 2006.
- KADAOU, K.A.; CORTHÉSY, B. Secretory IgA mediates bacterial translocation to dendritic cells in mouse peyer's patches with restriction to mucosal compartment. *J. Immunol.*, v. 179, n. 7751-7757, 2007.
- KAHI, C.J.; REX, D.K. Bowel obstruction and pseudo-obstruction. *Gastroenterol. Clin. North Am.*, v. 32, n. 4, p. 1229-1247, 2003.
- KAO, C.C.; BANDI, V.; GUNTUPALLI, K.K.; WU, M.; CASTILLO, L.; JAHOR, F. Arginine, citrulline and nitric oxide metabolism in sepsis. *Clin. Sci. (Lond)*, v. 117, n. 1, p. 23-30, 2009.
- KATOULI, M.; RAMOS, N.L.; NETTELBLADT, C.G.; LJUNGDAHL, M.; ROBINSON, W.; ISON, H. M. et al. Host species-specific translocation of Escherichia coli. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, v. 28, p. 1095–1103, 2009.
- KENDRICK, M.L. Partial small bowel obstruction: clinical issues and recent technical advances. *Abdom. Imaging*, v. 34, p. 329–334, 2009.
- KOHOUT, P.; CERMAN, J.; BRÁTOVÁ, M.; ZADÁK, Z. Small bowel permeability in patients with cytostatic therapy. *Nutrition*, v. 15, n. 7/8, p. 546-549, 1999.
- KUDSK, K.A. Current aspects of mucosal immunology and its influence by nutrition. *Am.J. Surg.*, v. 183, p. 390-398, 2002.

- LAMPINEN, M.; BACKMAN, M.; WINQVIST, O.; RORSMAN, F.; RONNBLOM, A.; SANGFELT, P. et al. Different regulation of eosinophil activity in Crohn's disease compared with ulcerative colitis. *J. Leukocyte Biol.*, v. 84, p. 1392-1399, 2008.
- LAU, T.; OWEN, W.; MING, Y. et al. Arginine, citrulline and nitric oxide metabolism in end-stage renal disease patients. *J. Clin. Invest.*, v. 105, p. 1217–1225, 2000.
- LECLEIRE, S.; HASSAN, A.; MARION-LETELLIER, R.; ANTONIETTI, M.; SAVOYE, G.; BÔLE-FEYSOT, C. et al. Combined glutamine and arginine decrease proinflammatory cytokine production by biopsies from Crohn's patients in association with changes in nuclear factor-kB and p38 mitogen-activated protein kinase pathways. *J. Nutr.*, v. 138, p. 2481–2486, 2008.
- LEMAIRE, L.C.J.M.; VAN LANSCHOT, J.J.B.; SOUTENBEEK, C.P.; VAN DEVENTER, S.J.H.; WELLS, C.L.; GOUMA, D.J. Bacterial translocation in multiple organ failure: cause or epiphenomenon still unproven. *Br. J. Surg.*, v. 84, n. 10, p. 1340-1350, 1997.
- LETIZIA, M.; NORTON, E. Successful management of malignant bowel obstruction. *J. Hosp. Palliat. Nurs.*, v. 5, n. 3, p. 152-158, 2003.
- LEVILLAIN, O.; HUS-CITHAREL, A.; MOREL, F.; BANKIR, L. Localization of arginine synthesis along rat nephron. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, v. 259, p. F916–F923, 1990.
- LEVILLAIN, O.; PARVY, P.; HASSLER, C. Amino acid handling in uremic rats: citrulline, a reliable marker of renal insufficiency and proximal tubular dysfunction. *Metabolism*, v. 46, p. 611–618, 1997.
- LICHTMAN, S.M. Bacterial translocation in humans. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.*, v. 33, p. 1-10, 2001.
- LIGTHART-MELIS, G.C.; VAN DE POLL, M.C.G.; BOELENS, P.G.; DEJONG, C.H.C.; DEUTZ, N.E.P.; VAN LEEUWEN, P.A.M. Glutamine is an important precursor for de novo synthesis of arginine in humans. *Am. J. Clin. Nutr.*, v. 87, p. 1282–1289, 2008.

- LIM, T.S.; MESSIHA, N.; WATSON, R.R. Immune components of the mucosae of ageing and protein deficient mice. *Immunology*, v. 43, p. 401-407, 1981.
- LOÏ, C.; OSOWSKA, S.; NEVEUX, N.; DARQUY, S.; CYNOBER, L.; MOINARD, C. Effects of an immune-enhancing diet in endotoxemic rats. *Nutrition*, v. 21, p. 255–263, 2005.
- LOTZ, M.; KÖNIG, T.; MÉNARD, S.; GÜTLE, D.; BOGDAN, C.; HORNEF, M.W. Cytokine-mediated control of lipopolysaccharide-induced activation of small intestinal epithelial cells. *Immunology*, v. 122, n. 3, p. 306-315, 2007.
- LUIKING, Y.C.; POEZE, M.; RAMSAY, G.; DEUTZ, N.E. Reduced citrulline production in sepsis is related to diminished de novo arginine and nitric oxide production. *Am. J. Clin. Nutr.*, v. 89, n. 1, p. 142-52, 2009.
- LUTGENS, L.C.H.W.; DEUTZ, N.E.P.; GUEULETTE, J.; CLEUTJENS, J.P.M.; BERGER, M.P.F.; WOUTERS, B.G. et al. Citrulline: a physiologic marker enabling quantitation and monitoring of epithelial radiation-induced small bowel damage. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, v. 57, n. 4, p. 1067–1074, 2003.
- MACFIE, J. Enteral Versus Parenteral Nutrition: the significance of bacterial translocation and gut-barrier function. *Nutrition*, v. 16, p. 606-611, 2000.
- MACFIE, J. Current status of bacterial translocation as a cause of surgical sepsis. *Br. Med. Bull.*, v. 71, p. 1-11, 2004.
- MACFIE, J; REDDY, B.S.; GATT, M.; JAIN, P.K.; SOWDI, R.; MITCHELL, C.J. Bacterial translocation studied in 927 patients over 13 years. *Br. J. Surg.*, v. 93, p. 87–93, 2006.
- MADL, C.; DRUML, W. Systemic consequences of ileus. *Best Prac. Res. Clin. Gastroenterol.*, v. 17, p. 445-56, 2003.

- MAGLINTE; D.D.T.; HOWARD, T.J.; LILLEMÖE, K.D.; SANDRASEGARAN, K.; REX, D.K. Small-Bowel Obstruction: State-of-the-art imaging and its role in clinical management. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.*, v. 6, p. 130–139, 2008.
- MEDDAH, A.T.; LEKE, L.; ROMOND, M.B.; GRENIER, E.; CORDONNIER, C.; RISBOURG, B.; CANARELLI, J.P. The effects of mesenteric ischemia on ileal colonization, intestinal integrity, and bacterial translocation in newborn piglets. *Pediatr. Surg. Int.*, v. 17, p. 515-20, 2001.
- MELICHAR, B.; KOHOUT, P.; BRÁTOVÁ, M.; SOLICHOVÁ, D.; KRÁLÍČKOVÁ, P.; ZADÁK, Z. Intestinal permeability in patients with chemotherapy-induced stomatitis. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, v. 127, p. 314-318, 2001.
- MELICHAR, B.; URBANEK, L.; KRCMOVÁ, L.; KALABOVA, H.; SVOBODOVA, I.; DRAGOUNOVA, E. et al. Urinary neopterin in patients with ovarian cancer. *Pteridines*, v. 17, p.145-153, 2006.
- MENZIES, I. S. Absorption of intact oligosaccharide in health and disease. *Biochem. Soc. Trans.*, v. 2, p. 1040-1046, 1974.
- MOINARD, C.; CYNOBER, L. Citrulline: A New Player in the Control of Nitrogen Homeostasis. *J. Nutr.*, v. 137, p. 1621S–1625S, 2007.
- MORRIS, S.M. Enzymes of arginine metabolism. *J Nutr.*, v. 134, n. 10, p. S2743-S2747, 2004.
- MORRIS, C.R.; KATO, G.J.; POLJAKOVIC, M.; WANG, X.; BLACKWELDER W.C.; SACHDEV, V. et al. Dysregulated arginine metabolism, hemolysis-associated pulmonary hypertension, and mortality in sickle cell disease. *JAMA*, v. 294, p. 81–90, 2005.
- MURPHY, C.; NEWSHOLME, P. Importance of glutamine metabolism in murine macrophages and human monocytes to L-arginine biosynthesis and rates of nitrite or urea production. *Clin. Sci.*, v. 95, p. 397–407, 1998.

- NAKATA, M.; YADA, T. Nitric oxide-mediated insulin secretion in response to citrulline in islet beta-cells. *Pancreas*, v. 27, p. 209–13, 2003.
- NEUTRA, M.R.; MANTIS, N.J.; KRAEHENBUHL, J.P. Collaboration of epithelial cells with organized mucosal lymphoid tissues. *Nat. Immunol.*, v. 2. n. 11, p. 1004-9, 2001.
- O'BOYLE, C.J.; MACFIE, J.; MITCHELL, C.J.; JOHNSTONE, D.; SAGAR, P.M.; SEDMAN, P.C. Microbiology of bacterial translocation in humans. *Gut*, v. 42, p. 29–35, 1998.
- OCHOA, J.B.; UDEKWU, A.O.; BILLIAR, T.R. et al. Nitrogen oxide levels in patients after trauma and during sepsis. *Ann. Surg.*, v. 214, p. 621-626, 1991.
- O'HARA, A.M.; SHANAHAN, F. The gut flora as a forgotten organ. *EMBO Rep.*, v. 7, p. 688–693, 2006.
- 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.
- ONO, S.; TSUJIMOTO, H.; YAMAUCHI, A.; HIRAKI, S.; TAKAYAMA, E.; MOCHIZUKI, H. Detection of microbial DNA in the blood of surgical patients for diagnosing bacterial translocation. *World J. Surg.*, v. 29, p. 535–539, 2005.
- OSOWSKA, S.; MOINARD, C.; NEVEUX, N.; LOÏ, C.; CYNOBER, L. Citrulline increases arginine pools and restores nitrogen balance after massive intestinal resection. *Gut*, v. 53, p. 1781–1786, 2004.
- OSOWSKA, S.; DUCHEMANN, T.; WALRAND, S.; PAILLARD, A.; BOIRIE, Y.; CYNOBER, L. et al. Citrulline modulates muscle protein metabolism in old malnourished rats. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, v. 291, p. E582–E586, 2006.
- OSOWSKA, S.; NEVEUX, N.; NAKIB, S.; LASSERRE, V.; CYNOBER, L.; MOINARD, C. Impairment of arginine metabolism in rats after massive intestinal resection: effect

- of parenteral nutrition supplemented with citrulline compared with arginine. *Clin. Sci. (Lond)*, v. 115, n. 5, p. 159-166, 2008.
- PAPPAS, P.A.; TZAKIS, A.G.; SAUDUBRAY, J.M.; GAYNOR, J. J.; CARRENO, M. R.; HUIJING, F. et al. Trends in serum citrulline and acute rejection among recipients of small bowel transplants. *Transplant. Proc.*, v. 36, p. 345–347, 2004.
- PEIXOTO, D.M. *Eosinofilia e IgE sérica total na alergia respiratória e parasitose intestinal*. Recife: UFPE, 2004. 57p. (Dissertação, Mestrado em Saúde da Criança e do Adolescente).
- PETERS, J.H.C.; WIERDSMA, N.J.; TEERLINK, T.; VAN LEEUWEN, P.A.M.; MULDER, C.J.J.; VAN BODEGRAVEN, A.A. The citrulline generation test: proposal for a new enterocyte function test. *Aliment. Pharmacol. Ther.*, v. 27, 1300–1310, 2008.
- PIRLICH, M.; NORMAN, K.; LOCHS, H.; BAUDITZ, J. Role of intestinal function in cachexia. *Cur. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care*, v. 9, p. 603–606, 2006.
- PIRONI, L.; GUIDETTI, M.; LAURO, A.; PINNA, A.D. Role of citrulline in rejection monitoring after bowel transplantation. *Curr. Opin. Organ. Transplant.*, v. 11, n. 3, p. 256-262, 2006.
- PITMAN, R.S.; BLUMBERG, R.S. Intestinal epithelial cells and mucosal immunity. *J. Gastroenterol.*, v. 35, p. 805-814. 2000.
- PLAETH, M.; SCHNEIDER, B.H.; RAIBLE, A.; HARTMANN, F. Effects of vascular or luminal administration and of simultaneous glucose availability on glutamine utilization by isolated rat small intestine. *Int. J. Colorectal Dis.*, v. 14, p. 95–100, 1999.
- POPOVIC, P.J.; ZEH, H.J.; OCHOA, J.B. Arginine and Immunity. *J. Nutr.*, v. 137, p. S1681- S1686, 2007.

- QIAO, SHI-FENG; LÜ, TIAN-JING; SUN, JIA-BANG; LI, F. Alterations of intestinal immune function and regulatory effects of L-arginine in experimental severe acute pancreatitis rats. *World J. Gastroenterol.*, v. 11, n.39, p. 6216-6218, 2005.
- 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. *Clin. Nutr.*, v. 26, p. 335-340, 2007.
- RABIER, D.; KAMOUN, P. Metabolism of citrulline in man. *Amino acids*, v. 9, p. 299-316, 1995.
- RAGHAVAN, S.A.V.; DIKSHIT, M. L-Citrulline mediated relaxation in the control and lipopolysaccharide-treated rat aortic rings. *Eur. J. Pharmacol.*, v. 431, p. 61–69, 2001.
- REDDY, B.S.; GATT, M.; SOWDI, F.; MACFIE, J. Surgical manipulation of the large intestine increases bacterial translocation in patients undergoing elective colorectal surgery. *Colorec. Dis.*, v. 8, 596-600, 2006.
- REDDY, B.S.; MACFIE, J.; GATT, M.; MACFARLANE-SMITH, L.; BITZOPOULOU, K. SNELLING, A. Comensal bacteria do translocate across the intestinal barrier in surgical patients. *Clin. Nutr.*, v. 26, p. 208-215, 2007.
- RUIZ-SILVA, M.; SILVA, R.M.; MENCHACA-DIAZ, J.L.; SIQUEIRA, A.F.R.S.; BUZZUTTI, F.I.; SILIANO, P.R. et al. Substantial changes in the intestine-derived lymph during bacterial translocation. *Transplant. Proc.*, 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. et al. Microscopy of bacterial translocation during small bowel obstruction and ischemia in vivo – a new animal model. *BMC Surgery*, v. 2, p. 6-11, 2002.



- SANJABI, S.; ZENEWICZ, L.A.; KAMANAKA, M.; FLAVELL, R.A. Anti-inflammatory and pro-inflammatory roles of TGF- $\beta$ , IL-10, and IL-22 in immunity and autoimmunity. *Curr. Opin. Pharmacol.*, v. 9, p. 447–453, 2009.
- SANTOS, R.G.C.; VIANA, M.L.; GENEROSO S.V.; ARANTES, R.E. ; CORREIA, M.I.T.D.; CARDOSO, V.N. Glutamine supplementation decreases intestinal permeability and preserves gut mucosa integrity in an experimental mouse model. *JPEN J. Parenter. Enteral. Nutr.*, 2009. *In press*
- SAWAI, T.; GOLDSTONE, N.; DRONGOWSKI, R.A. Effect of secretory immunoglobulin A on bacterial translocation in an enterocyte-lymphocyte co-culture model. *Pediatr. Surg. International*, v. 17, p. 275-279, 2001.
- SCHARL, M.; PAUL, G.; BARRETT, K.E.; MCCOLE, D.F. Adenosine monophosphate activated protein kinase mediates the interferon gamma-induced decrease in intestinal epithelial barrier function. *JBC J. Biol. Chem.*, Publicado em 04 ago. 2009. *In press*
- SCHELLEKENS, G.A.; DE JONG, B.A.; VAN DEN HOOGEN, F.H.; VAN DE PUTTE, L. B.; VAN VENROOIJ, W.J. Citrulline is an essential constituent of antigenic determinants recognized by rheumatoid arthritis-specific autoantibodies. *J. Clin. Invest.*, v. 101, p. 273-81, 1998.
- SCHRODER, K.; HERTZOG, P.J.; RAVASI, T.; HUME, D. A. Interferon- $\gamma$ : an overview of signals, mechanisms and functions. *J. Leukoc. Biol.*, v. 75, n. 2, p. 163-189, 2004.
- SCHULMAN, S.P.; BECKER, L.C.; KASS, D.A.; CHAMPION, H.C.; TERRIN, M. L.; FORMAN, S.; ERNST, K.V. et al. L-arginine therapy in myocardial infarction. The Vascular Interaction with Age in Myocardial Infarction (VINTAGEM I) randomized clinical trial. *JAMA*, v. 295, p. 58–64, 2006.
- SCHWEDHELM, E.; MAAS, R.; FREESE, R.; JUNG, D.; LUKACS, Z.; JAMBRECINA, A.; SPICKLER, W.; SCHULZE, F.; BÖGER, R. H. Pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of oral L-citrulline and L-arginine: impact on nitric oxide metabolism. *Br. J. Clin. Pharmacol.*, v. 65, n. 1, p. 51–59, 2008.

- 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. *J. Surg. Res.*, v.117, p. 262-271, 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. *Clin. Nutr.*, v. 23, p. 561-569, 2004.
- SHIOMI, H.; SHIMIZU, T.; ENDO, Y.; MURATA, S.; KURUMI, Y.; UJI, Y.; TANI, T. Relations among circulating monocytes, dendritic cells, and bacterial translocation in patients with intestinal obstruction. *World J. Surg.*, v. 31, p. 1806–1812, 2007.
- 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. *Transplant. Proc.*, v. 34, p. 999-1000, 2002.
- SOETERS, P.B.; LUYER, M.D.; GREVE, J.W.M.; BUURMAN, W.A. The significance of bowel permeability. *Cur. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care*, v. 10, p. 632–638, 2007.
- 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. *J. Pediatr. Surg.*, v. 40, p. 470-477, 2005.
- SUGIURA, T.; TASHIRO, T.; YAMAMORI, H.; TAKAGI, K.; HAYASHI, N.; ITABASHI, T. et al. Effects of total parenteral nutrition on endotoxin translocation and extent of the stress response in burned rats. *Nutrition*, v. 15, p. 570-575, 1999.
- SUN, Z.; WANG, X.; ANDERSSON, R. Role of intestinal permeability in monitoring mucosal barrier function. *Digest. Surg.*, v. 15, p. 386-97, 1998.
- SWANK, G.M.; DEITCH, E.A. Role of the gut in multiple organ failure: bacterial translocation and permeability changes. *World J. Surg.*, v. 20, p. 411-417, 1996.

- TAKESUE, Y.; KAKEHASHI, M.; OHGE, H.; UEMURA, K.; IMAMURA, Y.; MURAKAMI, Y. et al. Bacterial translocation: not a clinically relevant phenomenon in colorectal cancer. *World J. Surg*, v. 29, p. 198–202, 2005.
- TANAKA H.; MIYAZAKI S.; SUMIYAMA Y.; KAKIUCHI, T. Role of macrophages in a mouse of postoperative MRSA enteritis. *J. Surg. Res.*, v. 118, p. 144-121, 2004.
- TSUJIMOTO, H.; ONO, S.; MOCHIZUKI, H. Role of translocation of pathogen-associated molecular patterns in sepsis. *Dig. Surg.*, v. 26, p. 100-109, 2009.
- 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. *J. Clin. Neurosci.*, v. 10, p. 596-601, 2003.
- URSCHEL, K.L.; SHOVELLER, A.K.; UWIERA, R.R.E.; PENCHARZ, P.B.; BALL, R. O. Citrulline is an effective arginine precursor in enterally fed neonatal piglets. *J. Nutr.*, v. 136, p. 1806–1813, 2006.
- VADGAMA, J. V.; EVERED, D. F. Characteristics of L-citrulline transport across rat small intestine in vitro. *Pediatr. Res.*, v. 32, p. 472–478, 1992.
- VAN DE POLL, M.C.; LIGTHART-MELIS, G.C.; BOELEN, P.G.; DEUTZ, N.E.; VAN LEEUWEN, P.A.; DEJONG, C.H. Intestinal and hepatic metabolism of glutamine and citrulline in humans. *J. Physiol.*, v. 581, p. 819 –27, 2007.
- VAN WAARDENBURG, D.A.; BETUE, C.T.; LUIKING, Y.C.; ENGEL, M.; DEUTZ, N. E. Plasma arginine and citrulline concentrations in critically ill children: strong relation with inflammation. *Am. J. Clin. Nutr.*, v. 86, p. 1438-44, 2007.
- 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.

- VIDAL, M.A.N. Obstrução Intestinal: Causas e Conduas. *Rev. Bras. Coloproct.*, v. 25, p.332-338, 2005.
- WAKABAYASHI, Y.; YAMADA, E.; YOSHIDA, T.; TAKAHASHI, H. Arginine becomes an essential amino acid after massive resection of rat small intestine. *J. Biol. Chem.*, v. 269, p. 32667–32671, 1994.
- WELLS, C.L. Relationship between intestinal microecology and the translocation of intestinal bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek*, v. 58, n. 2, p. 87-93, 1990.
- WHITE, J.S.; HOPER, M.; PARKS, R.W.; CLEMENTS, W.D.B.; DIAMOND, T. Patterns of bacterial translocation in experimental biliary obstruction. *J. Surg. Res.*, v. 132, p. 80–4, 2006.
- WIESINGER, H. Arginine metabolism and the synthesis of nitric oxide in the nervous system. *Prog. Neurobiol.*, v. 64, p. 365–391, 2001.
- WIEST, R. Bacterial translocation. *Biosc. Microflor.*, v.24, p. 61-90, 2004.
- WIEST, R.; RATH, H.C. Bacterial translocation in the gut. *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.*, v. 17, n. 3, p. 397- 425, 2003.
- WILEMAN, S.M.; MANN, G.E.; PEARSON, J.D.; BAYDOUN, A.R. Role of L-citrulline transport in nitric oxide synthesis in rat aortic smooth muscle cells activated with LPS and interferon-gama. *Br. J. Pharmacol.*, v. 140, p. 179–185, 2003.
- WILMORE, D. Enteral and parenteral arginine supplementation to improve medical outcomes in hospitalized patients. *J Nutr.*, v.134, n. 10, p. S2863–S2867, 2004.
- WINDMUELLER, H.G.; SPAETH, A.E. Source and fate of circulating citrulline. *Am. J. Physiol.*, v. 241, p. E473–E480, 1981.
- 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. *J. Clin. Pathol.*, v. 54. p. 619-623, 2001.

- WU, G. Intestinal mucosal amino acid catabolism. *J. Nutr.*, v. 128, p. 1249–1252, 1998.
- WU, G.; COLLINS, J.K.; PERKINS-VEAZIE, P.; SIDDIQ, M.; DOLAN, K.D.; KELLY, K.A. et al. Dietary supplementation with watermelon pomace juice enhances arginine availability and ameliorates the metabolic syndrome in Zucker diabetic fatty rats. *J. Nutr.*, v. 137, p. 2680–2685, 2007.
- WU, G.; MORRIS, S.M. Arginine metabolism: nitric oxide and beyond. *Biochem. J.*, v. 336, p. 1-17, 1998.
- YOON, C.Y.; SHIM, Y.J.; KIM, E.H.; LEE, J.H.; WON, N.H.; KIM, J.H. et al. Renal cell carcinoma does not express argininosuccinate synthetase and is highly sensitive to arginine deprivation via arginine deiminase. *Int. J. Cancer*, v. 120, p. 897-905, 2007.
- ZALOGA, G.P.; SIDDIQUI, R.; TERRY C.; MARIK, P.E. Arginine: mediator or modulator of septicemia? *Nutr. Clin. Pract.*, v. 19, p. 201-215, 2004.
- ZANONI, F.L.; BENABOU, S.; GRECO, K.V.; MORENO, A.C.R.; CRUZ, J.W.M.C.; FILGUEIRA, F.P. et al. Mesenteric microcirculatory dysfunctions and translocation of indigenous bacteria in a rat model of strangulated small bowel obstruction. *Clinics*, v. 64, n. 9, p. 911-919, 2009.

## 10. ANEXOS

### ANEXO I - COMPOSIÇÕES CENTESIMAIS

**Tabela 1.** Composição centesimal da ração para roedores Labina®.

Umidade	12g
Proteína bruta	23g
Lipídeos	4g
Fibras	5g
Minerais	10g
Cálcio	1,5g
Fósforo	0,85g
CHO <sup>1</sup>	51g

<sup>1</sup> O percentual de carboidratos foi calculado considerando-se que CHO = Sólidos Totais – (Proteína + Lipídeos + Cinzas).

**Tabela 2.** Composição centesimal de gelatina em pó incolor.

Valor calórico	345 kcal
Carboidratos	0g
Proteína	69g
Lipídeos	0g

**Tabela 3.** Composição centesimal de amido de milho.

Valor calórico	352 kcal
Carboidratos	90g
Proteína	0g
Lipídeos	0g