

Maria Augusta Gomes Pereira

# **INFLUÊNCIA DA DESNUTRIÇÃO ENERGÉTICO- PROTÉICA NO PROCESSO DE TRANSLOCAÇÃO BACTERIANA EM MODELO EXPERIMENTAL DE OBSTRUÇÃO INTESTINAL EM RATOS**

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

Orientador: Prof. Valbert Nascimento Cardoso

Co-orientador: Prof. Tasso Moraes e Santos

Faculdade de Farmácia da UFMG

Belo Horizonte, MG

2005

Dedico este trabalho a meus filhos Ana e João.

*“Quando morre uma flor, nasce uma semente;  
quando uma semente morre, nasce uma planta. E a  
vida continua seu caminho, mais forte do que a  
morte”.*

Rabindranath Tagore

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, por terem me dado a vida, formado meu caráter e me legado lições de ética e estética.

Ao meu companheiro, Weliton, por ter me dedicado muita paciência e tolerância. E também, por ter me incentivado e auxiliado nas cirurgias.

Ao meu orientador, Professor Doutor Valbert Nascimento Cardoso, que me acolheu em um momento de incerteza, com respeito, ensinamentos e preciosos conselhos; ao meu co-orientador, Professor Doutor Tasso Moraes e Santos, por sua amizade e apoio, por ter me indicado um caminho que eu até então desconhecia e ter me conduzido através dele.

*“A grande tarefa do sujeito que pensa certo, não é transferir, depositar, oferecer, doar ao outro, tomado como paciente de seu pensar a inteligibilidade das coisas, dos fatos, dos conceitos. A tarefa coerente do educador que pensa certo é, exercendo como ser humano a irrecusável prática de inteligir, desafiar o educando com quem se comunica e a quem comunica, produzir sua compreensão do que vem sendo comunicado “.*

Paulo Freire

À Professora Simone Odília Fernandes Diniz, por sua hospitalidade, pelo seu esforço em manter um laboratório aconchegante e organizado, nos fornecendo condições adequadas de trabalho.

Ao Professor Doutor Roberto Junqueira, pelo orientação prestada nas análises estatísticas.

À colega Mariana Andrade de Oliveira, que além de me ensinar a técnica empregada na cirurgia dos ratos me auxiliou nas análises estatísticas.

À colega Daniela Santos Lemos, minha fiel ajudante, pelo inestimável auxílio na etapa experimental de meu trabalho.

À veterinária Maria Adelaide Fernandes, amiga e solidária, que conhece tudo sobre os animais e que sempre mostrou-se disposta a me ajudar.

Ao admirável José Batista Viturino, que tanto me auxiliou na lida com os ratos.

Ao Felipe Santos Cavatoni Serra, entusiasmado assistente nas cirurgias, além de colaborador em outras fases da pesquisa.

Às colegas, Marina Oliveira Venuto e Patrícia Costa Fonseca, também eficientes e prestativas colaboradoras.

À colega Gleycimara Batista Gomes, pelas valiosas dicas no trato com as ratazanas.

A todos os colegas e funcionários dos laboratórios de radioisótopos e de nutrição experimental, que contribuíram para a viabilização do meu trabalho.

Também agradeço a todos meus queridos colegas do mestrado de Ciência de Alimentos, pela enriquecedora convivência, por compartilharem minhas angústias e me ajudarem a superar minhas deficiências.

Finalmente, agradeço aos professores do mestrado que me deram a chance de estar aqui hoje, que me ensinaram, que me incentivaram e que muito contribuíram para meu êxito.

*“Os pescadores sabem que o mar é perigoso e a tormenta, terrível. Mas este conhecimento não os impede de fazer-se ao mar.”*

Vincent Van Gogh

# SUMÁRIO

<b>LISTA DE TABELAS.....</b>	<b>8</b>
<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>10</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....</b>	<b>11</b>
<b>RESUMO .....</b>	<b>13</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>14</b>
<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>15</b>
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA .....</b>	<b>18</b>
<b>2.1 MÁ NUTRIÇÃO ENERGÉTICO PROTÉICA.....</b>	<b>18</b>
<b>2.1.1 Alterações fisiopatológicas na desnutrição energético-protéica.....</b>	<b>21</b>
<b>2.1.2 Desnutrição energético-protéica e mecanismos de defesa do hospedeiro .....</b>	<b>24</b>
<b>2.2 TRANSLOCAÇÃO BACTERIANA.....</b>	<b>32</b>
<b>2.2.1 Definição e causas.....</b>	<b>32</b>
<b>2.2.2 Papel do sistema imunológico na translocação bacteriana .....</b>	<b>34</b>
<b>2.2.3 Rota e local da translocação bacteriana.....</b>	<b>37</b>
<b>2.3 OBSTRUÇÃO INTESTINAL.....</b>	<b>40</b>
<b>2.4 ISÓTOPO RADIOATIVO.....</b>	<b>43</b>
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>45</b>
<b>3.1 MATERIAL.....</b>	<b>45</b>
<b>3.1.1 Reagentes .....</b>	<b>45</b>
<b>3.1.2 Equipamentos .....</b>	<b>45</b>
<b>3.1.3 Outros .....</b>	<b>45</b>
<b>3.1.4 Animais e rações.....</b>	<b>46</b>
<b>3.2 MÉTODOS .....</b>	<b>47</b>
<b>3.2.1 Preparação da bactéria .....</b>	<b>47</b>
<b>3.2.2 Procedimento da marcação .....</b>	<b>47</b>
<b>3.2.3 Modelo experimental de obstrução intestinal .....</b>	<b>48</b>
<b>3.2.4 Grupos “Sham” operados .....</b>	<b>49</b>
<b>3.2.5 Estudo da translocação bacteriana .....</b>	<b>49</b>
<b>3.2.6 Avaliação do efeito da restrição energético protéica sobre o peso corporal...51</b>	

3.2.7 Avaliação do efeito da restrição energético protéica sobre o peso dos órgãos estudados.....	51
3.2.8 Análises estatísticas.....	51
<b>4 RESULTADOS.....</b>	<b>52</b>
4.1 EFEITO DA RESTRIÇÃO ALIMENTAR ENERGÉTICO-PROTÉICA SOBRE O PESO CORPORAL.....	52
4.2 EFEITO DA RESTRIÇÃO ENERGÉTICO-PROTÉICA SOBRE O PESO DOS ORGÃOS ESTUDADOS.....	54
4.3 ESTUDOS DE BIODISTRIBUIÇÃO DA <sup>99m</sup> Tc-E.coli NOS RATOS NORMONUTRIDOS (GNN).....	54
4.4 ESTUDOS DE BIODISTRIBUIÇÃO DA <sup>99m</sup> Tc-E.coli NOS RATOS QUE SOFRERAM RESTRIÇÃO ALIMENTAR (GRA).....	55
4.5 EFEITO DA RESTRIÇÃO ALIMENTAR ENERGÉTICO-PROTÉICA SOBRE A TRANSLOCAÇÃO BACTERIANA NOS ANIMAIS “SHAM” OPERADOS.....	56
4.6 EFEITO DA RESTRIÇÃO ALIMENTAR ENERGÉTICO-PROTÉICA SOBRE A TRANSLOCAÇÃO BACTERIANA NOS ANIMAIS SUBMETIDOS À OBSTRUÇÃO INTESTINAL.....	56
<b>5 DISCUSSÃO.....</b>	<b>58</b>
<b>6 CONCLUSÕES E SUGESTÕES.....</b>	<b>65</b>
<b>7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>66</b>
APÊNDICE A-TABELAS COMPLEMENTARES DA ETAPA EXPERIMENTAL.....	74
APÊNDICE B-ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS.....	79

## LISTA DE TABELAS

1 Média dos pesos corpóreos semanais, em gramas, dos animais dos grupos estudados (GNN e GRA).....	52
2 Média dos pesos, em gramas, dos órgãos dos animais dos grupos estudados (GNN e GRA).....	54
3 Biodistribuição da $^{99m}\text{Tc-E.coli}$ , 24 horas após injeção no íleo dos ratos normonutridos (GNN), dos grupos “Sham” operados e com obstrução intestinal..	55
4 Biodistribuição da $^{99m}\text{Tc-E.coli}$ , 24 hs após injeção no íleo dos ratos que sofreram restrição alimentar (GRA), dos grupos “Sham” operados e submetidos à obstrução intestinal.....	55
5 Biodistribuição da $^{99m}\text{Tc-E.coli}$ , 24 hs após injeção no íleo dos ratos dos grupos GNN e GRA “Sham” operados.....	56
6 Biodistribuição de $^{99m}\text{Tc-E.coli}$ , 24 hs após injeção no íleo dos ratos dos grupos GNN e GRA, que apresentavam obstrução intestinal.....	57
7 Composição da ração para ratos.....	74
8 Fator de decaimento para o tecnécio.....	75
9 Peso corpóreo, medido semanalmente, dos animais do grupo alimentado <i>ad libitum</i> (GNN), n=18.....	76
10 Peso corpóreo, medido semanalmente, dos animais do grupo submetido à restrição alimentar (GRA), n=18.....	76
11 Peso corpóreo dos animais na ocasião da cirurgia.....	77
12 Peso dos órgãos dos animais, dos grupos GNN e GRA, em experiência.....	78
13 Proporção do peso médio de cada órgão/ peso corpóreo médio dos animais, dos grupos GNN (normonutridos) e GRA (desnutridos).....	78
14 Análise de Variância e teste de Duncan para os pesos corpóreos dos animais dos grupos GNN e GRA, (n=36), medidos semanalmente.....	79
15 Análise de Variância e teste de Duncan para o peso corpóreo dos animais na data da cirurgia.....	80
16 Análise de Variância e teste de Duncan para os pesos dos órgãos dos animais dos grupos GNN (n=18) e GRA (n=18).....	80



17 Análise estatística através de teste de Mann-Whitney para comparação da biodistribuição da <sup>99m</sup> Tc-E.coli entre ratos do grupo GNN, 24 hs após sua injeção no íleo.....	81
18 Análise estatística através de teste de Mann-Whitney para comparação da biodistribuição da <sup>99m</sup> Tc-E.coli entre ratos do grupo GRA, 24 hs após sua injeção no íleo.....	81
19 Análise estatística através de teste de Mann-Whitney para comparação da biodistribuição da <sup>99m</sup> Tc-E.coli entre ratos dos grupos GNN e GRA, “Sham”operados, 24 hs após sua injeção no íleo.....	82
20 Análise estatística através de teste de Mann-Whitney para comparação da biodistribuição da <sup>99m</sup> Tc-E.coli entre ratos dos grupos GNN e GRA, submetidos à obstrução intestinal, 24 hs após sua injeção no íleo.....	82

## **LISTA DE FIGURAS**

<b>1 Ligadura do íleo terminal.....</b>	<b>49</b>
<b>2 Intestino delgado 24 hs após ligadura do íleo terminal.....</b>	<b>50</b>
<b>3 Gráfico do peso corpóreo semanal médio dos animais dos grupos GNN (normonutrido) e GRA (desnutrido), em gramas.....</b>	<b>53</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIDS	Síndrome de Imunodeficiência Adquirida
APC	Célula apresentadora de antígeno
CA	Anidrase Carbônica
Célula M	Célula multifenestrada
Célula B	Linfócito B (Bursa Dependente)
Célula NK	Célula natural killer
Célula T	Linfócito T (Timo Dependente)
Cpm	Contagem por minuto
DNA	Ácido desoxirribonucleico
FAE	Epitélio folicular associado
FAD	Dinucleotídeo Flavina Adenina
FAO	Organização de Alimentos e Agricultura
FDC	Células Foliculares Dendríticas
GALT	Tecido linfático associado ao intestino
GAPDH	Desidrogenase Gliceraldeído - 3 – Fosfato
GNN	Grupo Normonutrido
GRA	Grupo com restrição alimentar
G6PDH	Glicose-6-fosfato-desidrogenase
GR	Glutathione Redutase
GSH	Glutathione -S-Transferase
IgA	Imunoglobulina A
IgG	Imunoglobulina G
IL	Interleucina
LPS	Lipopolissacarídeo
Na <sup>99m</sup> TcO <sub>4</sub>	Pertecnetato de sódio
NLM	Nódulos linfáticos mesentéricos
NO	Óxido nítrico
OMS	Organização Mundial de Saúde

ONU	Organização das Nações Unidas
PEM	Desnutrição protéico-energética
PMN	Polimorfonucleares
PigR	Receptor polimérico de imunoglobulina
RNA	Ácido ribonucleico
$^{99m}\text{Tc}$	$^{99m}\text{Tc}$ Tecnécio
TNF	Fator de Necrose Tumoral
UFC	Unidade Formadora de Colônia

## **RESUMO**

Desnutrição, altamente prevalente em países em desenvolvimento, é um mal antigo que aflige a humanidade. A desnutrição energético-protéica apresenta-se como um estado de deficiência alimentar, com déficit global de proteínas e calorias, provocando menor aporte de nutrientes às células. Alguns estudos têm mostrado evidências de interação entre desnutrição e translocação bacteriana. Translocação bacteriana é um fenômeno em que ocorre a passagem de microorganismos da microbiota intestinal normal, através da mucosa intestinal, para outros órgãos. Isto pode ocorrer devido a três situações: disfunção da barreira intestinal, alteração da microbiota intestinal e deficiência imunológica do hospedeiro. Em nosso estudo, realizamos uma ligadura do íleo terminal para induzir obstrução intestinal em ratos. Associamos restrição alimentar energético-protéica, no intuito de verificar a influência da desnutrição crônica sobre a translocação bacteriana nesses animais. Como grupo controle, utilizamos animais alimentados *ad libitum*. Dois grupos de ratos, nutridos e desnutridos, foram “Sham” operados, para avaliação do estresse cirúrgico. Outros dois grupos de animais, nutridos e desnutridos, foram submetidos à ligadura ileal. Todos animais foram inoculados no íleo com <sup>99m</sup>Tc-*E.coli* (10<sup>8</sup> UFC). Os animais foram sacrificados 24 horas após a inoculação da <sup>99m</sup>Tc-*E.coli*, o sangue foi coletado e alguns órgãos foram retirados (nódulos linfáticos mesentéricos, fígado, baço e pulmões) para verificação da translocação bacteriana. A translocação bacteriana foi avaliada pela determinação da radioatividade nos órgãos e sangue. Os resultados mostraram que animais “Sham” operados e animais submetidos à ligadura do íleo apresentaram translocação bacteriana. Nos animais que sofreram a ligadura, a translocação bacteriana foi significativamente maior ( $p \leq 0,05$ ). Animais submetidos à obstrução intestinal e “Sham “ operados nutridos, comparados com os desnutridos, não apresentaram diferenças significativas nos órgãos e sangue ( $p > 0,05$ ). Portanto, os dados obtidos sugerem que a desnutrição energético-protéica imposta aos ratos não interferiu no processo de translocação bacteriana em modelo experimental de ligadura do íleo para obtenção de obstrução intestinal.

**Palavras-chave:** desnutrição energético-protéica; translocação bacteriana; obstrução Intestinal.

## **ABSTRACT**

Malnutrition, highly prevalent in developing countries, is an old suffering that afflicts the humanity. The protein-energy malnutrition is presented as a state of food deficiency, with deficit in proteins and calories, provoking lower supplying of nutrients to the cells. Some studies have shown evidences of interaction between malnutrition and bacterial translocation. Bacterial translocation is a process in which microorganisms from gut normal microbiota cross the intestinal mucosa in order to reach other organs. This can occur due to three situations: dysfunction of the intestinal mucosal barrier, alteration of intestinal microbiota and host immune deficiency. In our study, the distal ileum was ligated for induction of the intestinal obstruction in rats. Protein-energy food restriction imposed throughout the experiment had the aim of evaluating the influence of malnutrition on intestinal translocation in the animals. Control group animals fed diet *ad libitum* and the malnourished rats fed 65% of the amount consumed by the control group. In order to control for surgical stress, wellnourished and malnourished rats were “Sham” operated. Wellnourished and malnourished animals were submitted to ileum ligation. All animals were inoculated in the ileum with  $^{99m}\text{Tc-E.coli}$  ( $10^8$  CFU). The animals were sacrificed 24 hours after  $^{99m}\text{Tc-E.coli}$  inoculation, blood sample was collected and some organs removed (mesenteric lymphonodes, liver, spleen, and lungs) for verification of the bacterial translocation. The bacterial translocation was evaluated by the determination of the radioactivity in the organs and blood. The results showed that in the animals submitted to the intestinal ligation, bacterial translocation was significantly higher ( $p \leq 0,05$ ) than in “Sham” operated animals. Animals submitted to the intestinal obstruction and “Sham” operated wellnourished animals, compared to the malnourished ones, did not show significant differences in bacterial translocation to the organs and blood ( $p > 0,05$ ). Therefore, the obtained data suggest that protein-energy-malnutrition imposed to the rats did not interfere with the process of bacterial translocation in the experimental model of ileum ligation in order to obtain intestinal obstruction.

## 1- INTRODUÇÃO

Translocação bacteriana foi definida por BERG (1995) como a migração de bactérias viáveis para locais estéreis do organismo, como nódulos linfáticos mesentéricos (NLM), baço, fígado e corrente sanguínea.

Embora a translocação possa ocorrer através de mucosas e membranas, maior interesse tem sido focado no trato intestinal. Este apresenta-se como um grande reservatório de microorganismos, contidos por eficiente barreira física, formada por células epiteliais gastrointestinais que isolam o ambiente luminal intestinal do restante do organismo (DWINELL et al., 2003).

Outro dado a ser considerado é que bactérias Gram negativo, aeróbicas e facultativas (presentes em grande quantidade no intestino) translocam mais facilmente que anaeróbicas e bactérias Gram positivo (NAABER et al., 1999; SHLEGEL et al., 2000).

Estudos realizados nos EUA mostraram que em torno de 10% de pacientes hospitalizados desenvolvem infecção hospitalar. Sabe-se que parte destas infecções são de caráter exógeno, entretanto grande parte é proveniente de translocação bacteriana. Esses estudos mostram que milhões de dólares são gastos anualmente com estas infecções com o agravante de que, a mortalidade delas se apresenta alta, apesar dos esforços terapêuticos (WIEST & RATH, 2003).

Vários estudos em animais mostraram que translocação bacteriana é um fenômeno multifatorial. A translocação bacteriana pode se instalar devido ao rompimento do balanço ecológico da microbiota indígena, resultando em desequilíbrio do crescimento bacteriano. Além disso a diminuição das defesas do hospedeiro ou a ruptura da barreira mucosa intestinal podem promover translocação bacteriana (SCHLEGEL et al., 2000).

Esses fatores podem estar relacionados às condições físicas do hospedeiro, especialmente estado nutricional e imunológico. Várias situações clínicas como antibioticoterapia, choque hemorrágico, injúria térmica, icterícia obstrutiva, obstrução intestinal, desnutrição, radioterapia, quimioterapia, nutrição enteral e parenteral e outras são relacionadas com a gênese da translocação bacteriana, através de mecanismos diversos (DEITCH et al., 1987; CHUANG et al., 1993; DINIZ, 1998; RUNDLES & LIN, 1998; NAABER et al., 1999; SALVALAGGIO et al., 2002; WIEST & RATH, 2003).

Procedimentos cirúrgicos podem se associar à translocação bacteriana, estando muitas vezes relacionados a um aumento de septicemia em pós operados (WIJESINGHE et al. 2001). A translocação bacteriana aparece com maior freqüência em pacientes com



quadro de obstrução intestinal (DEITCH, 1989; SEDMAN et al., 1994; SALVALAGGIO et al., 2002).

A obstrução intestinal é uma síndrome com causas e aspectos clínicos variáveis, na qual o denominador comum é uma dificuldade ou impossibilidade ao trânsito intestinal (GALVÃO, 1978).

A obstrução intestinal favorece a estase intestinal, com grande crescimento intraluminal de bactérias e alteração da permeabilidade intestinal. As bactérias podem transpor a mucosa por vários mecanismos, lesando-a com comprometimento da barreira intestinal e subsequente translocação bacteriana para outros órgãos (DEITCH, 1989; SEDMAN et al., 1994; DANI, 2001; SALVALAGGIO et al., 2002).

A desnutrição também tem sido considerada na patogênese da translocação bacteriana. O efeito de uma alimentação deficiente na resposta imunológica intestinal tem sido observada em estados de desnutrição. Desnutrição leva à atrofia de órgãos linfóides, causando maior susceptibilidade aos patógenos ambientais (DEITCH et al., 1987; RABELO, 1997; RUNDLES & LIN, 1998; WOODWARD, 1998). Desnutrição também está intimamente correlacionada às complicações pós operatórias, em qualquer tipo de cirurgia (NAKAMURA et al., 1999).

Desnutrição energético-protéica é um mal que aflige crônicamente a humanidade. A ONU vem apresentando dramáticas estatísticas sobre a situação alimentar no mundo, destacando que 1 bilhão de pessoas na América Latina, Ásia e África, aproximadamente 1/5 da humanidade, sofrem de desnutrição crônica. O Brasil não é exceção dentro desta situação mundial. A desnutrição afeta principalmente faixas mais susceptíveis: gestantes, lactentes, crianças e velhos (ELIA, M., 2000; DOUGLAS, 2002).

Com base no que foi apresentado, este trabalho teve como objetivo geral: estudar em ratos a influência da desnutrição energético-protéica neonatal na translocação bacteriana. Para tanto, empregou-se a *Escherichia coli* marcada com <sup>99m</sup>Tecnécio. Dentro desta proposta, os objetivos específicos foram os seguintes:

- marcar a bactéria *Escherichia coli* com <sup>99m</sup>tecnécio;
- promover restrição energético-protéica em ratos, utilizando uma alimentação racionada, em torno de 35% em relação à alimentação *ad libitum* (modelo experimental de desnutrição);
- promover obstrução intestinal em ratos, na região do íleo terminal, por meio de uma ligadura intestinal simples;

- simular uma cirurgia para promoção do estresse cirúrgico nos ratos dos grupos controle ("sham" cirurgia);
- administrar a  $^{99m}\text{Tc-E.coli}$  diretamente no lúmen intestinal dos ratos, em ambos os grupos, ("sham" operado e experimental);
- avaliar o fenômeno da translocação da  $^{99m}\text{Tc-E.coli}$  determinando a radioatividade nos nódulos mesentéricos, baço e fígado de ratos desnutridos e normonutridos em ambos os grupos ("sham" operado e experimental);
- investigar uma possível correlação entre a obstrução intestinal e desnutrição energético-protética na translocação bacteriana;
- analisar estatisticamente os dados obtidos.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

## 2.1 MÁ NUTRIÇÃO ENERGÉTICO-PROTÉICA

Fome, pestilência e doenças têm atormentado a humanidade através dos tempos. A descoberta em escavações de ossos com linhas de Harrison e de dentes com faixas de Wilson, sinais de desnutrição, sugerem a existência desta condição no homem pré-histórico. O primeiro registro de famintos, data de aproximadamente 3000AC e vem do alto Egito. Trata-se de descrição feita pelo escritor Ipuwer, de um grande desastre, onde as cidades, assoladas pela fome, tornaram-se devastadas e vazias.

Foi encontrada na tumba do egípcio Ankhtifi, datada de 2000 AC, uma inscrição narrando os efeitos dramáticos da fome, levando a total desintegração da sociedade e das famílias: “Todo o alto Egito estava morrendo de fome, ao ponto das pessoas devorarem suas crianças”. A pirâmide de Unas, em Sakkara, datada da Quinta dinastia, mostra desenhos de vítimas famintas, com corpos emagrecidos, costelas protuberantes, cinturas estreitas. Outra inscrição em uma tumba na ilha de Sihel, acrescenta uma vívida descrição dos efeitos da fome: “Cada homem se transforma em um ladrão para seu vizinho. Eles desejam fugir, porém não podem caminhar. As crianças choram, os jovens rastejam, as cabeças dos homens idosos pendem, suas pernas estão curvadas e se arrastam no solo, e suas mãos repousam sobre seu peito. A corte encontra-se abandonada, sem seus conselheiros. As caixas de provisões estão escancaradas, porém encontram-se vazias. Todos estão exaustos” (ELIA, 2000).

Episódios de fome também são descritos na Bíblia, inclusive a escassez do sétimo ano (1700 AC), quando José evitou um desastre acumulando grãos na ocasião em que os alimentos eram mais abundantes e distribuindo-os quando o alimento tornou-se escasso.

O mal da fome tem influenciado a história das cidades, países e impérios. Por exemplo, a fome que surgiu com a desintegração dos sistemas de comunicação e transporte, no final do império romano, foi importante fator em sua queda. Muitos desastres produziram sofrimento, mas alguns foram devastadores. Em 1347, estima-se que 2/3 da população italiana pereceu; em 1438, 1/3 da população parisiense sucumbiu. A China tem sido considerada a “terra dos famintos”. São relatados na China antes de Cristo, 1829 episódios de grande escassez de alimentos, e 29 episódios, depois de Cristo (ELIA, 2000).

Fome, levando a má nutrição permanece como uma praga até nossos dias. Por exemplo, dados globais da OMS sobre o crescimento infantil sugerem que 28% das crianças menores que 5 anos estão abaixo do peso desejado, 35% são portadoras de desnutrição crônica e 8% sofrem de desnutrição aguda (Elia, 2000).

Evidências consideráveis sugerem que má nutrição afeta a saúde, a sobrevivência, o crescimento, morbidade e mortalidade, desenvolvimento cognitivo, reprodução, capacidade física e aumenta os riscos de doenças crônicas nos adultos (PELLETIER & FRONGILLO, 2003).

Nomenclatura e conceituação das alterações do estado nutricional não são consensuais. Alguns autores utilizam o termo desnutrição para indicar as carências nutricionais; outros preferem termos como subnutrição ou má nutrição (BRASILEIRO-FILHO, 2000). Outros autores utilizam os termos desnutrição, subnutrição ou carência nutricional, com um mesmo sentido, utilizando má nutrição com outra conotação.

Para ALLISSON (2000), má nutrição seria um termo abrangente, usado para descrever qualquer desordem nutricional, seja desordem associada a doenças, causada por excesso ou escassez de nutrição ou pelo desbalanceamento nutricional de um ou mais macro ou micronutrientes.

A FAO/OMS define desnutrição energético-protéica primária, um tipo de má nutrição, como “uma variedade de condições patológicas, decorrentes de deficiências de energia e proteínas em variadas proporções que atingem preferencialmente as crianças, sempre agravadas pelas infecções repetidas” (CARRAZZA, 1991).

ALLISON (2000) dá uma nova definição para desnutrição, mais ampla, que serve para quadros primários ou secundários a outras doenças: “estado de deficiência de energia, proteína ou outro nutriente específico, que acarreta uma alteração mensurável na função corporal e que se associa à piora de doenças, podendo ser revertida com suporte nutricional adequado”.

O termo desnutrição energético-protéica é o termo adotado pela FAO/OMS, desde 1975, para designar essa síndrome. A expressão protéico-calórica foi abandonada, para evitar confusão com o termo caloria, que designa unidade de energia e que tem sido substituído pelo joule (CARRAZA, 1991).

A desnutrição é altamente prevalente em países em desenvolvimento e faz parte da chamada “síndrome de pobreza”. Geralmente está associada a famílias de baixa renda, com muitos membros, pouca educação, baixo desenvolvimento, más condições de habitação, pouco acesso a cuidados de saúde e à comida. Os dois principais fatores

responsáveis pelo pouco acesso à comida são: escassez global de alimentos para todos ou distribuição desigual de alimentos em certas regiões, com maior privação das famílias pobres (GOPALAN, 2000).

Desnutrição energético-protéica caracteriza-se por um menor aporte de nutrientes às células em relação às necessidades destas. Afeta fundamentalmente as faixas mais susceptíveis à desnutrição: infância, velhice, gravidez e lactação (ELIA, 2000; DOUGLAS, 2002).

Quando existe um fornecimento energético adequado, mas com carência protéica, denomina-se kwashiorkor; se há um déficit global de proteínas e energia, trata-se de marasmo ou desnutrição energético-protéica (PEM- Protein-Energy Malnutrition), sendo esta a forma mais freqüente de desnutrição encontrada (WALKER-SMITH & MC NEISH, 1989; OLIVEIRA & MARCHINI, 1998; DOUGLAS, 2002).

No kwashiorkor, o que predomina é um mal balanceamento dietético, especificamente uma baixa ingestão protéica. Mobilização da gordura subcutânea é menor e menos bem sucedida no paciente com kwashiorkor que no marasmático, levando à patologia hepática evidente, acompanhada de edema patognomônico. São freqüentes as lesões de pele e alterações de cabelo. Kwashiorkor marasmático combina edema com relação peso-altura extremamente baixa (OLIVEIRA & MARCHINI, 1998; WOODWARD, 1998; ALLISON, 2000).

O marasmo é uma condição acompanhado por atrofia, com depleção de tecido adiposo e muscular. Ocorre um retardo no crescimento e no desenvolvimento físico. Geralmente são preservadas as funções viscerais essenciais, incluindo função hepática. Não é comum associação com edema, esteatose hepática, lesões de pele e cabelo. A principal característica dietética associada ao marasmo é uma baixa ingestão global de nutrientes, incluindo alimentos energéticos (WALKER-SMITH & MC NEISH, 1989; OLIVEIRA & MARCHINI, 1998; WOODWARD, 1998; BRASILEIRO-FILHO, 2000).

Na desnutrição energético-protéica, independente da forma clínica encontrada, ocorre um certo grau de deficiência protéica. Mesmo quando existe uma ingestão protéica adequada, a deficiência energética induz à utilização da proteína para fins energéticos (OLIVEIRA & MARCHINI, 1998).

A desnutrição energético-protéica pode manifestar-se de forma aguda (wasting) ou crônica (stunting). A forma aguda, caracterizada por perdas agudas, resulta em composição corporal alterada enquanto na forma crônica predomina a atrofia, com redução linear no crescimento. Em bebês e crianças mais velhas as formas agudas e

crônicas podem ser diferenciadas através das proporções peso-altura e peso-idade, respectivamente. Categorias de doenças podem ser distinguidas dentro de cada tipo de PEM através de comparação com valores de referência (WOODWARD, 1998).

A desnutrição pode ser classificada em primária ou secundária. A desnutrição primária é aquela em que a falta de nutrientes necessários ao funcionamento normal do organismo decorre da ingestão deficiente de alimentos. Resulta de: 1) causas sócio econômicas (pobreza, analfabetismo, deficiência de produção de alimentos, monocultura, tabus alimentares, etc.); 2) doenças físicas ou psíquicas ( anorexia nervosa, bulimia), que dificultam a ingestão de alimentos.

A desnutrição secundária representa uma anormalidade de utilização dos nutrientes ingeridos. Pode ser devida a: 1) digestão insuficiente de nutrientes causada por insuficiência hepática, pancreática, gástrica ou intestinal; 2) deficiência de absorção por alterações da mucosa gástrica ou intestinal; 3) utilização inadequada de alimentos como no diabetes e erros congênitos do metabolismo; 4) aumento do metabolismo com aumento da utilização dos nutrientes no hipertireoidismo; 5) aumento da excreção de nutrientes como por exemplo a proteína nas lesões renais; 6) destruição da microbiota intestinal por antibióticos (BRASILEIRO-FILHO; 2000). Esta situação poderia levar à carência de vitaminas em animais que praticam a coprofagia.

Todas as formas de PEM podem desenvolver-se primariamente ou em condições secundárias (OLIVEIRA & MARCHINI, 1998; WOODWARD, 1998; ALLISON, 2000).

De acordo com o grau de severidade, a desnutrição pode ser classificada em 3 categorias distintas: grau 1, leve; grau 2, moderada; grau 3, grave. O grau 3, representa o estágio final da doença e pode manifestar-se em 3 formas distintas: marasmo, kwashiorkor e kwashiorkor marasmático (WOODWARD,1998).

### **2.1.1 Alterações fisiopatológicas na desnutrição energético- protéica**

No transcorrer das etapas do crescimento dos animais, nas fases pré e pós natal, os níveis de RNA, DNA e proteínas vão variar de acordo com os diferentes órgãos, em etapas diversas do seu desenvolvimento. Em uma fase inicial, há predominância da multiplicação celular ou hiperplasia, com altos níveis de DNA. Posteriormente, vão ocorrer tanto a multiplicação quanto o aumento da tamanho celular (hipertrofia), que vem

acompanhado por uma aumento nos níveis protéicos. Finalmente, a fase de divisão celular termina, persistindo apenas a hipertrofia celular.

Restrição alimentar durante o desenvolvimento do animal, pode provocar efeitos irreversíveis, dependendo do período e do órgão em desenvolvimento. Se esta restrição se der durante a multiplicação celular, os animais não alcançarão níveis normais no peso de alguns órgãos, mesmo após recuperação nutricional, devido ao decréscimo no número de células ( Rabelo, 1997).

Caso a desnutrição persista após o nascimento, o organismo lança mão de mecanismos adaptativos. Existem evidências, embora de difícil comprovação, que o primeiro mecanismo adaptativo que ocorreria na desnutrição seria uma atividade diminuída do desnutrido quando comparado com a atividade de crianças alimentadas adequadamente. Este mecanismo teria por objetivo equilibrar o balanço energético (CARRAZZA, 1991).

Quando a baixa ingestão alimentar, com um balanço negativo, é mantida, o organismo vai tentar diminuir outros componentes da atividade metabólica. Vai ocorrer então uma desaceleração do crescimento. Esta seria a mais importante alteração funcional devido ao aporte insuficiente de nutrientes às células. Pode ser tão intensa que leve à regressão demonstrável nos terrenos bioquímico, funcional e anatômico, podendo situar os indivíduos em padrões de idade bem aquém de sua idade real (MARCONDES, 1976; CARRAZA, 1991).

O processo de divisão celular fica alterado. Ocorre diminuição do índice mitótico do epitélio intestinal em lactentes marasmáticos, fato que está relacionado à presença de alterações na absorção intestinal. O mesmo pode ser observado na medula óssea, daí ocorrerem freqüentes anemias (DOUGLAS, 2002).

A duração nas fases de reprodução celular foi avaliada em cultura de células da medula óssea de ratos gravemente desnutridos. Os resultados mostraram que, determinadas fases da mitose celular, de células ósseas, em ratos desnutridos tinham uma maior duração (GÓMEZ et al., 1996).

No plexo mioentérico do intestino delgado, em ratos desnutridos, foi observado que a privação protéica altera as características histológicas, mostrando arranjo irregular de fibras elásticas nos gânglios mioentéricos e uma diminuição do conteúdo da acetilcolinesterase nesses gânglios ( BRANDÃO et al., 2003).

Experiências em animais submetidos à restrição alimentar, demonstraram alterações permanentes na capacidade de aprender. Crianças, desnutridas durante a

vida intra uterina, apresentam desempenho baixo nos testes de inteligência e menor capacidade de aprendizado, fenômeno tanto mais acentuado quanto mais precoce for a desnutrição. Isto parece ser devido à interferência no desenvolvimento orgânico adequado do indivíduo, afetando o número de células cerebrais que são formadas durante a vida fetal (MORAES-SANTOS, 1980; BRASILEIRO-FILHO, 2000; DOUGLAS, 2002).

Com a persistência das condições adversas nos seus variados graus, vão se instalando mecanismos fisiopatológicos, determinando adaptações metabólicas de diferentes intensidades, desencadeadas e mantidas por controles hormonais (CARRAZZA, 1991; WOODWARD, 1998).

Com uma restrição energética prolongada, para sobreviver, o organismo lança mão de: glicogenólise, gliconeogênese e lipólise. A musculatura esquelética, maior compartimento corporal de proteínas, e o tecido adiposo, principal reserva energética, são consumidos às expensas da manutenção da homeostase (MARCONDES, 1976; CARRAZZA, 1991; DOUGLAS, 2002).

Estudos em ratos submetidos às dietas com restrição calórica mostraram que o organismo lança mão indiscriminadamente do catabolismo das proteínas miofibrilares musculares, mantendo níveis séricos normais de aminoácidos necessários para funções vitais (ALMEIDA et al., 2002).

Neste processo, os hormônios desempenham importante papel. Em resposta às baixas concentrações de glicose e aminoácidos, os níveis de insulina diminuem. Em contrapartida, devido ao estresse causado por infecções freqüentes e pela própria restrição alimentar, o córtex adrenal aumenta a secreção de cortisol. Isto vai ocasionar maior liberação de aminoácidos musculares, que serão utilizados por órgãos mais nobres como o fígado, pâncreas e o intestino (CARRAZZA, 1991; WOODWARD, 1998).

Integridade visceral mantida a custo de consumo muscular é vista no marasmo. É importante ressaltar que os perfis hormonais diferem no marasmo e kwashiorkor. O cortisol plasmático e a resposta adrenal estão mais elevados no marasmo. Nos marasmáticos a curva de glicemia possui características diabéticas: alta e prolongada, por diminuição da insulina e talvez por bloqueio metabólico enzimático da glicólise (CARRAZZA, 1991; DOUGLAS, 2002).

Insuficiência adrenal e ineficiência da utilização do músculo levariam a uma queda do mecanismo de adaptação condicionando o kwashiorkor. A secreção aumentada do hormônio de crescimento e epinefrina induzem a lipólise, fornecendo ácidos graxos e



corpos cetônicos como combustível para o metabolismo cerebral. Embora os depósitos lipídicos estejam reduzidos no tecido adiposo, a deficiência protéica predispõe a fígado gorduroso. O acúmulo de gorduras no fígado se deve à diminuição da saída dos ácidos graxos, causada por carência da proteína transportadora (CARRAZZA, 1991; WOODWARD, 1998; DOUGLAS, 2002).

Baixas concentrações de triiodotironina são vistas em quadros de desnutrição aguda, mas não nos quadros crônicos de marasmo (WOODWARD, 1998). O cortisol plasmático e a resposta adrenal à corticotropina estão mais elevados no marasmo. Níveis de hormônio do crescimento encontram-se elevados no kwashiorkor, mas são normais no marasmo (CARRAZZA, 1991).

### **2.1.2 Desnutrição energético-protéica e mecanismos de defesa do hospedeiro**

Diversos componentes da dieta exercem efeitos sobre os mecanismos de defesa inata do sistema imunológico. Estes mecanismos atuam contra bactérias, vírus, parasitas, células malignas e auto-anticorpos. O fato de quase todas as superfícies expostas dos seres humanos serem colonizadas por micróbios desde o momento do nascimento até depois da sua morte mostra a magnitude dessa interação (BARNES, 1993).

Embora o organismo seja constantemente exposto aos agentes infecciosos, a doença infecciosa é rara. As invasões por microorganismos nos vertebrados são inicialmente contidas por mecanismos de defesa inata que preexistem e agem minutos após o início da infecção. Somente quando estas defesas são sobrepujadas, evadidas ou dominadas, irá atuar uma resposta induzida. Os agentes infecciosos deverão superar as defesas inatas do hospedeiro para estabelecer a infecção (JANEWAY et al., 2002).

As superfícies epiteliais estão entre as primeiras barreiras contra a infecção. O epitélio que recobre as superfícies internas é conhecido como mucosa epitelial, porque secreta um fluido denominado muco. Este muco é rico em glicoproteínas, conhecidas como mucinas. Os microorganismos recobertos pelo muco terão dificuldade de se aderirem ao epitélio e atacá-lo (JANEWAY et al., 2002).

Nossos epitélios são mais que uma simples barreira física contra a infecção: eles também produzem substâncias químicas que são microbicidas. Por exemplo a enzima antibactericida lisozima é secretada nas lágrimas e na saliva. No trato gastrointestinal, o pH ácido do estômago e as enzimas digestivas formam uma barreira química contra a infecção (JANEWAY et al., 2002).

O efeito prejudicial do desbalanceamento de nutrientes sobre os mecanismos de defesa ou resposta imunitária é muito visível na desnutrição. O excesso ou deficiência de quase todos os macro ou micronutrientes estão associados às anormalidades nas funções de defesa. O inverso também é verdadeiro: a infecção tem um forte impacto sobre o estado nutricional (BARNES, 1993).

Alguns autores acreditam que desnutrição estaria associada à atrofia da mucosa intestinal. Isto ocasionaria um aumento da permeabilidade intestinal e uma diminuição das enzimas intestinais, podendo assim contribuir para uma alteração na barreira mecânica intestinal (RABELO, 1997; RUNDLES & LIN, 1998; MANHART et al., 2000; LINCOLN, 2001; ULLUSOY, 2003).

Deficiências nutricionais deprimem simultaneamente várias barreiras imunológicas. Alguns estudos têm demonstrado que em processos de má nutrição que ocorrem em pacientes com injúria traumática, ocorre uma diminuição da barreira funcional do intestino, aumento da permeabilidade aumentando risco de translocação bacteriana e septicemia (WOODWARD, 1998; ULLUSOY et al., 2003).

Outros autores, que estudaram pacientes com desnutrição e atrofia de mucosa intestinal, associadas ou não a outros processos patológicos, não encontraram relação entre desnutrição e aumento da permeabilidade intestinal (SEDMAN et al., 1994; BJARNASON et al., 1995; WIEST & RALPH, 2003).

E ainda, outros autores acreditam que alterações na mucosa intestinal estariam relacionadas ao tipo de desnutrição apresentado pelo hospedeiro. WALKER-SMITH & MC NEISH (1989) afirmam que no marasmo a arquitetura da mucosa intestinal permanece em geral inalterada. Porém, no Kwashiorkor, a lesão é muito intensa. Ocorre irregularidade das microvilosidades, várias alterações estruturais celulares, com acúmulo gorduroso nas células mucosais.

Informação sobre as barreiras físicas em PEM (Protein Energy Malnutrition) é fragmentada, a despeito de seu papel primário na defesa contra infecções oportunistas. Estudos demonstram uma tendência das células epiteliais bucais e nasofaríngeas de crianças marasmáticas aumentarem adesão às células bacterianas coliformes, in vitro.

PEM alteraria a expressão dos receptores glicoprotéicos da membrana, modificaria a quantidade de muco mantido nas superfícies epiteliais e a natureza química das lectinas presentes no muco. Estas observações poderiam justificar um maior risco da colonização bacteriana nas superfícies mucosas em PEM (WOODWARD, 1998).

Alterações enzimáticas, resultantes de subnutrição no período pré-natal, foram observadas na atividade da tripsina, lipase, amilase, lactase, sacarase e maltase (YOUNG et al., 1987).

RABELO (1997) encontrou, em ratos submetidos à restrição energético-protéica, uma resposta diminuída do pâncreas aos estímulos hormonais, principalmente colecistocinina e secretina. Isto resultou em uma liberação reduzida de enzimas hidrolíticas.

Se um microorganismo atravessa a barreira epitelial e se replica nos tecidos do hospedeiro, ele deverá ser reconhecido pelo fagócito tissular ou macrófago. As células fagocíticas podem reconhecer, ingerir e destruir vários patógenos. Os macrófagos são os primeiros a atacar os patógenos nos tecidos, porém, rapidamente são reforçados pela afluência dos neutrófilos (JANEWAY et al., 2002; GUYTON & HALL, 2002).

Além da fagocitose, os macrófagos e neutrófilos produzem uma variedade de substâncias que ajudam a matar o microorganismo englobado. Os mais importantes são; peróxido de hidrogênio, o ânion superóxido e o óxido nítrico que são diretamente tóxicos contra as bactérias (WOODWARD, 1998; JANEWAY et al., 2002; MARLETTA & SPIERING, 2003).

KEUSCH et al. (1978) estudaram aspectos celulares e humorais da atividade antibacteriana de macrófagos em ratos submetidos à grave desnutrição energético-proteica. Concluíram que algumas funções antibacterianas, como fagocitose e quimiotaxia dos macrófagos, medidas in vitro não estavam alteradas na má nutrição energético-proteica. Porém, fatores séricos, possivelmente derivados do complemento, encontravam-se alterados.

REDMOND et al. (1991) estudaram o papel de macrófagos peritoneais e células de Kupfer na defesa do hospedeiro, em camundongos desnutridos. Suas conclusões foram que os macrófagos peritoneais encontravam-se reduzidos em camundongos submetidos à intensa restrição protéica. Além disto, sua capacidade de fagocitose estaria diminuída, assim como sua capacidade em gerar ânion superóxido após estímulo por LPS (lipopolissacarídeo - endotoxina bacteriana).

DOUGLAS & SCHOPFER (1974) investigaram, in vitro, a atividade funcional de fagócitos sangüíneos provenientes de 16 crianças africanas vítimas de kwashiorkor. Foi notado que a capacidade bactericida destes fagócitos era normal nos primeiros 30 minutos da infecção e encontrava-se significativamente diminuída após 60 min., quando comparada à atividade de fagócitos de crianças nutridas.

STAPLETON et al. (2001), em uma série de estudos sobre a atividade de macrófagos de camundongos submetidos à restrição calórica aguda em torno de 22%, demonstraram aumento da produção de citocinas e de Prostaglandina E2 pelo macrófago em resposta ao desafio por LPS (lipopolissacarídeo). Foi constatada alteração do metabolismo do ácido araquidônico e aumento na produção de óxido nítrico que atua sobre as barreiras mucosas

Ficou demonstrado em outro estudo sobre atividade de macrófagos que nível de restrição em torno de 25% aumentaria o grau de fagocitose de partículas de látex. Estes estudos sugerem que grau e duração da restrição calórica determinariam os efeitos sobre a imunidade celular e sobre a atividade de macrófagos (STAPLETON et al., 2001).

Contagem de neutrófilos é um dos mais significativos índices prognósticos em imunodeprimidos. Segundo WOODWARD (1998) processos infecciosos na forma aguda de PEM produziram neutropenia, atribuída à involução do pool de PMN na medula óssea.

DAVIS & STENVENSON (2003) investigaram o papel de neutrófilos na resistência à *Candida albicans*, em camundongos submetidos à restrição protéica aguda. Observaram que abscessos provocados pela infecção de *C. albicans* progrediam lentamente. Segundo esses autores, a migração de neutrófilos e a fagocitose se equivaliam em animais restritos e controles, porém ocorreria uma diminuição na quantidade de leucócitos circulantes durante o período da restrição dietética.

Alguns autores têm negado a influência de dietas restritivas sobre PMN (leucócitos polimorfonucleares). AMADI & ADENIYI (1994) estudaram os efeitos de dietas variadas, (rica em proteína, rica em carboidrato, sem gordura, pobre em proteínas e calorias e balanceada, *ad libitum*). Foi demonstrado que os ratos depletados em proteína tiveram seus órgãos significativamente menores que os dos animais nutridos. Porém todos os grupos dietéticos, apresentaram contagem de leucócitos normais e proporção neutrófilos/linfócitos similar.

HUANG & FRAKER (2003) investigaram o processo hematopoiético em camundongos submetidos à restrição protéica crônica. Seus resultados não demonstraram alterações nem no número nem na distribuição de células na medula óssea. Tampouco encontraram alterações nas séries de linfócitos. Concluíram que baixo consumo protéico crônico não prejudica o processo hematopoiético em camundongos.

Quando respostas inatas induzidas falham na eliminação do patógeno, os macrófagos e outras células ativadas ajudam a iniciar o desenvolvimento de uma

resposta imunológica adaptativa. Serão então liberadas substâncias como as citocinas quimiocinas e outras. Poderão também ser acionadas outras células como os linfócitos B, produtores de anticorpos, e linfócitos T, responsáveis pela imunidade celular (JANEWAY et al., 2002).

Na opinião de alguns pesquisadores, desnutrição levaria a uma significativa atrofia de órgãos linfóides, com prejuízo de sua função e aumento de susceptibilidade a patógenos ambientais e a infecções oportunistas (REDMOND et al, 1991; ULUSOY et al, 2003).

Segundo WOODWARD (1998), uma avaliação do pool de linfócitos circulantes, baseada em uma medida no tamanho dos órgãos ocasionaria uma idéia errada da involução linfóide em PEM. Assim, os compartimentos linfóides exibem complexidades específicas ainda pouco esclarecidas.

Para alguns autores, a diminuição no tamanho do timo e dos órgãos linfóides periféricos, verificada no Kwashiorkor, interferiria na imunidade celular, mediada pelos linfócitos T (derivados do timo). Ocorreria diminuição numérica destes linfócitos e desproporção entre os linfócitos T auxiliares, T supressores e citotóxicos, alterando sua função (MAFFEI, 1983; BARNESS, 1993; WOODWARD, 1998; KEUSH, 2003).

Estudos mostraram a existência de 2 séries distintas de linfócitos T auxiliares, TH1 e TH2, com diferentes funções. BHASKARAM et al. (2003) mostraram que, crianças com Kwashiorkor marasmático apresentavam respostas dos linfócitos TH1 deprimidas. Estes linfócitos desempenham importantes funções nas infecções bacterianas intracelulares, já que eles são capazes de ativar a função microbicida dos macrófagos. Alguns fatores liberados por linfócitos permaneciam normais (IFN, IL4, IL5 e IL10); a interleucina IL2, mesmo após a recuperação nutricional, mostrava-se diminuída.

Nas crianças com marasmo, não são observadas alterações na transformação linfocítica normal e o número e a distribuição dos linfócitos B são normais (MAFFEI, 1983; BARNESS, 1993).

Segundo WOODWARD (1998), as respostas inflamatórias de fase aguda em PEM grau 3 estariam atenuadas, tanto em animais quanto em crianças. Um dos possíveis motivos seria a depressão na liberação (e provavelmente na síntese) de citocinas liberadas pelo monócitos, tais como IL1, TNF $\alpha$ , e IL6.

Dados obtidos usando roedores com PEM, forma crônica, mostraram uma intensificação da imunocompetência mediada por células (WOODWARD, 1998). Uma

provável explicação para este fenômeno seria a capacidade preservada ou elevada de células T esplênicas liberar IL-2 e INF- $\gamma$ , embora a capacidade de liberar IL-4 fosse deprimida (WOODWARD, 1998).

Estudos em camundongos têm mostrado que as proteínas dietéticas atuam sobre a produção de IgA da mucosa, e sobre o nível de IgG (WOODWARD, 1998). Este efeito parece não se relacionar à restrição calórica porque privação específica de proteína afeta a expressão imunitária do intestino de maneira dose dependente e pode ser revertida por recuperação nutricional (BRANDTZAEG, 1998; RUNDLES & LIN, 1998).

O anticorpo IgA, secretado pelas mucosas, é tido como mais sensível à PEM (Protein Energy Malnutrition), forma aguda, que os anticorpos sistêmicos. Investigações em camundongos sugerem a persistência da produção de anticorpos sistêmicos e mucosos, mesmo em depleções protéicas profundas. O que parece ocorrer é uma diminuição na produção da proteína transportadora de IgA (PIgR), provocando baixa concentração de IgA nas secreções intestinais de camundongos e nas lágrimas e lavados gástricos de crianças (WOODWARD, 1998).

Foi demonstrado por GOOD & LORENZ (1992), que restrição calórica moderada ou grave em ratos inibe o desenvolvimento de linfócitos B, produtores de anticorpos. Porém, na opinião deles, esta inibição estaria associada à deficiência de zinco na dieta. Segundo estes autores, quando todos nutrientes são oferecidos em proporções adequadas, restrição calórica de até 40% manteria vigorosa função imunitária em roedores, principalmente em relação a uma melhora na resposta imunitária celular.

CHANDRASEKAR et al. (1995) também partilham da opinião desses autores. Relatam melhor atividade imunológica em camundongos susceptíveis às doenças auto-imunes, submetidos a dietas nutricionalmente balanceadas, com restrição calórica de 40%. A conclusão destes autores é que restrição calórica reduziria a produção de citocinas inflamatórias (IL6 e TNF $\alpha$ ), prevenindo doenças auto-imunes nos camundongos.

O sistema imunológico evolui pelo contato microbiano e os nutrientes influenciam esta interação. Balanço nutricional é essencial para o desenvolvimento do sistema imunológico. Nutrientes específicos também parecem atuar como cofatores na expressão da resposta imunitária (BRANDTZAEG, 1998; RUNDLES & LIN, 1998).

Macro e micronutrientes influenciam defesas do hospedeiro durante resposta imunitária a processo agudo porque é requerida imediata mobilização de células em

estado de ativação, proliferação e diferenciação (CHANDRA & SARCHIELLI, 1996; RUNDLES & LIN, 1998).

Deficiência de vitamina A é uma das mais comuns ligadas à PEM (RUNDLES & LIN, 1998). Estudo sobre avitaminose A, demonstrou várias alterações sobre os enterócitos. Foi observado diminuição na produção de enzimas intestinais, aumento de incidência de diarreia com má absorção, translocação bacteriana e em ratos gnotobióticos, septicemia (KOZAKOVA et al., 2003).

Os ácidos graxos essenciais parecem afetar vários parâmetros imunológicos, como a proliferação de linfócitos, síntese de citocinas, atividade de células NK. Eles também atuam sobre a fluidez das membranas, formação lipídica de peróxido e produção de eicosanóides (DE PABLO & DE CIENFUEGOS, 2000).

BARTON et al. (1991) estudaram o papel da deficiência de ácidos graxos essenciais na translocação bacteriana, em camundongos. Foi observado que a dieta restritiva de ácidos graxos essenciais, isolada, aumenta a incidência de translocação bacteriana. A associação da restrição dietética com injeção de LPS também aumenta a incidência de translocação, porém não interfere no grau de translocação bacteriana em animais tratados com metronidazol, que é bastante elevada, independentemente da dieta.

Influência do fator nutricional isolado ou em combinação com endotoxemia na promoção de translocação bacteriana foi verificada por DEITCH et al. (1987). Em seu trabalho, foram avaliados camundongos mantidos em jejum por 72 h e camundongos submetidos à dieta restrita em proteínas por 21 dias. Aliado a estes fatores, alguns destes animais receberam injeção intraperitoneal de endotoxina (LPS) de *E. coli*.

Foi observado que o jejum e a dieta restritiva aumentaram a incidência de translocação nos animais que receberam endotoxina. Porém, nem o jejum nem a dieta restritiva, isoladamente, levaram à translocação bacteriana.

Alterações imunológicas em PEM começam a ser entendidas como uma constelação coordenada de eventos envolvendo as diversas células e tecidos do sistema imunitário. Grande enfoque tem sido dado às citocinas que regulam algumas reações de defesas inatas. Estudos indicam o balanço de citocinas como essencial na imunocompetência mediada por células (WOODWARD, 1998; KEUSH, 2003).

Parece existir um fino controle no nível de transcrição protéica, quando restrição dietética é imposta a roedores. Assim, são encontrados níveis baixos de RNA mensageiro para algumas proteínas, como a albumina, ao passo que para outras os níveis ou não

são afetados ou estão aumentados, como para a Ubiquitina. Então o modelo clássico ligando baixa ingestão de proteína e energia a uma redução global na síntese proteica não pode ser generalizado (WOODWARD, 1998).

O mecanismo associando imunodepressão e PEM vem sendo entendido como componente de uma doença sindrômica sistêmica. A resposta fisiológica para PEM é orquestrada pelo sistema endócrino hormonal que governa a taxa e direção de fluxo de substratos e energia. A imunobiologia de PEM deve ser estudada no contexto de reorganização do metabolismo mediada por hormônios (CARRAZZA, 1991; WOODWARD, 1998; DOUGLAS, 2001).

Várias alterações imunológicas, associadas a PEM, são orquestradas por hormônios. Por exemplo, a diminuição de síntese de IL6 pelo macrófago, em camundongos com PEM, parece ser causada pelos altos níveis de glicocorticóides encontrados no sangue.

Outra evidência do papel metabólico na imunodepressão ligada à PEM, vem dos baixos níveis de triiodotironina encontrados nesta doença. Roedores, que recebem suplementação do hormônio tireoideano, melhoram a atividade de células NK e de linfócitos T (WOODWARD, 1998; PASSOS et al., 2001).

STAPLETON et al.(2004) estudaram a relação dos altos níveis de glicocorticóides, encontrados em PEM aguda, com a função do macrófago. Camundongos com dieta sem proteína, durante 7 dias, apresentaram níveis elevados de glicocorticóides, que alteraram a ativação do fator nuclear  $\kappa$  dos macrófagos, levando à diminuição de sua estimulação.

Outro aspecto do metabolismo de PEM com o qual o fenômeno de imunocompetência encontra-se integrado é a defesa antioxidante, que vai mostrar-se comprometida. Nível de glutathiona diminuído é uma característica de PEM e pode contribuir para imunodepressão nesta doença. (WOODWARD, 1998; RONCHI et al., 2004).

BECKER et al. (1995) estudaram vários antioxidantes sanguíneos (glicose-6-fosfato-desidrogenase, G6PDH, glutathiona redutase, GR, e seu cofator, dinucleotídeo flavina-adenina-FAD) em pacientes com marasmo e kwashiorkor. Demonstraram que havia diferenças significativas entre os níveis de glutathiona eritrocitária em pacientes controle, marasmáticos e com kwashiorkor, sendo que os últimos apresentavam níveis significativamente menores que os demais. Os outros antioxidantes estudados não mostraram diferenças significativas.



Níveis de glutathiona hepáticos são muito sensíveis ao conteúdo protéico da dieta. OLIVEIRA & FUJIMORI (1996) mostraram que dietas com restrição protéica, baixando o nível sanguíneo de aminoácidos, afetam o nível de glutathiona hepático. Entretanto, dietas com restrição de calorias de 40%, balanceadas, não alteraram significativamente os níveis hepáticos de glutathiona (OLIVEIRA & FUJIMORI, 1996).

A influência da má nutrição na resposta imunitária intestinal e sistêmica, somatória dos vários fatores apresentados, poderia comprometer seriamente a integridade da barreira mucosa intestinal contribuindo para a translocação bacteriana (REDMOND et al., 1991; BARTON et al., 1992; DINIZ, 1998).

## **2.2 TRANSLOCAÇÃO BACTERIANA**

### **2.2.1 Definição e causas**

A alta incidência de infecções sistêmicas em diversas situações de injúria orgânica, aliada à presença de uma microbiota específica para cada tipo de infecção, levou à formação do conceito de translocação bacteriana. O intestino foi considerado o local mais importante na origem destas infecções, pelo fato de ser um grande reservatório de microorganismos. Estes permanecem no lúmen intestinal pois são contidos por uma eficiente barreira mucosa (SCHLEGEL et al., 2000; WIEST & RATH, 2003).

Inicialmente, translocação bacteriana foi definida como sendo a passagem de bactérias viáveis através do revestimento mucoso e da lâmina própria para os linfonodos e, possivelmente, para outros tecidos estéreis (BERG & GARLINGTON, 1979; BERG, 1995). Entretanto, este conceito foi reavaliado e ampliado, definindo-se então translocação microbiana como a passagem de micróbios viáveis e não viáveis, assim como de produtos microbianos como as endotoxinas através de barreira mucosa intestinal (WIEST & RATH, 2003).

Embora a translocação bacteriana possa ocorrer através de várias membranas mucosas, maior interesse tem sido focalizado sobre o trato intestinal, por seu maior potencial de translocação (NAABER et al. 1999; WIEST & RATH, 2003).

O trato intestinal possui grande atividade imunológica, contendo muitos tipos de leucócitos. Seu sistema imunitário antigênico local (GALT\_ Gut Associated Lymphatic Tissue) atua como maior órgão imunitário do organismo, ocupando 25% da massa celular

da mucosa. Compreende metade das células linfáticas do corpo, contém numerosas células plasmáticas, macrófagos, neutrófilos, células de Paneth e células especializadas M que têm papel chave no controle da translocação bacteriana (BRANDTZAEG, 1998; JEPSON & CLARK, 1998; JANEWAY et al., 2002; WIEST & RATH, 2003).

As bactérias mais comumente encontradas em processos de translocação são bactérias presentes na microbiota intestinal normal, principalmente bacilos Gram negativo aeróbicos e facultativos, bactérias que normalmente colonizam em grande número o intestino (DINIZ, 1998; NAABER et al., 1999).

Segundo WIEST & RATH (2003), bactérias aeróbicas Gram negativo podem translocar com certa facilidade, até mesmo em indivíduos não injuriados, com enterócitos intactos. Bactérias anaeróbicas, translocam apenas em situações em que o intestino se encontra estruturalmente danificado. Além disto, estas bactérias formariam um tapete, revestindo a superfície mucosa, impedindo assim a colonização por micróbios potencialmente invasores (JANEWAY et al., 2002).

Recentemente foi visto que a capacidade de translocação é maior em linhagens específicas de bactérias. Estas linhagens possuem maior capacidade de aderência e fixação ao epitélio produtor de muco. Esta capacidade geralmente está associada aos bacilos entéricos portadores de fímbrias, como por exemplo alguns tipos de *E. coli* (AÍBA et al., 2002; WIEST & RATH, 2003).

Vários estudos em animais têm demonstrado que translocação bacteriana é um fenômeno multifatorial. A translocação bacteriana pode ser resultado do rompimento do equilíbrio normal da microbiota indígena, o que contribui para um excessivo crescimento de determinadas bactérias. O sistema imunológico do hospedeiro debilitado ou a ruptura física da barreira intestinal podem, isoladamente ou em associação, facilitar a translocação de bactérias (NAABER et al., 1999; SCHLEGEL et al., 2000; DWINELL et al., 2003; WIEST & RATH, 2003).

Desequilíbrio da microbiota bacteriana intestinal levando a um maior crescimento de determinadas bactérias, principalmente Gram negativo facultativas, pode ser causado por administração oral de antibióticos, uso de metronidazol, ressecção hepática, ligadura de ducto biliar, alimentação parenteral, obstrução intestinal, redução da acidez gástrica (DEITCH, 1989; DINIZ, 1998; NAABER et al., 1999; SAVALAGGIO et al., 2002; WIEST & RATH, 2003), uso de fruto-oligossacarídes em altas doses (BRUGGENCATE et al., 2003) e outras causas menos comuns.

A barreira celular epitelial intestinal, composta pelas células epiteliais com suas junções intercelulares previne ou limita a entrada de antígenos alimentares e micróbios. Existem outros fatores locais que atuam em conjunto com a barreira na defesa contra invasores: Ig A, muco, ácido gástrico, enzimas pancreáticas, bile, peptídeos antibacterianos e antifúngicos, motilidade intestinal, criptidinas e  $\alpha$  defensinas, sintetizadas pelas células de Paneth ( JANEWAY et al., 2002; DWINELL et al., 2003; WIEST & RATH, 2003).

As secreções mucosas são ricas em imunoglobulina A, que protege a mucosa, previne a aderência e colonização por microorganismos. As mucinas secretadas pelas células epiteliais criam barreira de gel mucoso que protege contra micróbios invasores, ácidos e toxinas. O transporte ativo de cloretos pela célula promove fluxo líquido intraluminal que lava agentes nocivos. As junções intercelulares entre enterócitos são altamente especializadas, permitem a permeabilidade paracelular, mantêm a adesão intercelular, permitem a comunicação intercelular (junções Gap), porém impedem a passagem de microorganismos e macromoléculas (WIEST & RATH, 2003).

Dano da barreira mucosa intestinal pode ocorrer devido a diversos fatores, dentre estes podem se destacar choque hemorrágico, choque induzido por endotoxinas, injúria térmica, obstrução intestinal, choque cardiogênico. Nestas situações pode ocorrer baixa perfusão dos enterócitos, hipóxia e acidose.

Isquemia intestinal é um evento comum em injúrias traumáticas ou em qualquer grande cirurgia. Período prolongado de isquemia pode promover prejuízo na função intestinal e uma restauração da perfusão pode levar a uma resposta inflamatória. Restauração da perfusão intestinal também leva a alterações na função de outros órgãos, como os pulmões, fígado e medula óssea (GROSSIE JUNIOR et al., 2003).

A pressão de oxigênio é normalmente baixa no ápice das vilosidades da mucosa intestinal, tornando seus enterócitos particularmente sensíveis à isquemia. Uma diminuição na perfusão poderia levar a um aumento de permeabilidade intestinal, facilitando à translocação bacteriana (BJARNASON et al., 1995; WIEST & RATH, 2003).

Dentre outros fatores que se relacionam a um dano na barreira intestinal, destacam-se a má nutrição, radioterapia, administração sistêmica de agentes antiinflamatórios, nutrição parenteral, toxemia e outros (DINIZ, 1998; AÍBA et al., 2002; SAKAMOTO et al., 2004).

A nutrição parenteral leva a alterações na morfologia intestinal, como atrofia de vilus da mucosa e diminuição da produção de muco pelas células epiteliais. Estes seriam alguns dos prováveis mecanismos responsáveis pelo favorecimento de translocação bacteriana na nutrição parenteral (SAKAMOTO et al., 2004).

Diversas células intestinais produzem óxido nítrico. Este participa dos processos fisiológicos do intestino: secreção de muco gastrointestinal; transporte de cloretos e de fluidos; fluxo sanguíneo; atividade motora intestinal; agregação de neutrófilos; eliminação de metabólitos reativos de oxigênio O óxido nítrico é importante na reparação e na permeabilidade da mucosa intestinal. Alteração na sua produção, em situações como endotoxemia, choque hemorrágico, injúria térmica, desnutrição e outros, explicaria dano à barreira intestinal (STAPLETON et al., 2001; JANEWAY et al., 2002; MARLETTA & SPIERING, 2003; WIEST & RATH, 2003; NAITO et al., 2004).

Estudos mostram que bactéria intestinal pode causar doença sistêmica em indivíduos imunodeprimidos, sem outras condições associadas. Isto leva a crer que disfunção imune promove primariamente translocação bacteriana (JANEWAY et al., 2002; WIEST & RATH, 2003).

Sistema imunológico debilitado do hospedeiro pode associar-se com as seguintes patologias: uso de imunossupressores, radioterapia, linfomas, leucemias, endotoxemia, injúria térmica, choque hemorrágico, diabetes, má nutrição, AIDS (BARTON et al., 1992; NAABER et al., 1999; SCHLEGEL et al., 2000).

### **2.2.2 Papel do sistema imunológico na translocação bacteriana**

O eficiente funcionamento imunológico do trato gastrointestinal dos mamíferos é resultante de um processo evolutivo ocorrido em milhões de anos até culminar em sua atual carga genética. Esse sistema imunológico aprimorou-se pelo contato com micróbios e com dietas diversificadas (BRANDTZAEG, 1998; RUNDLES & LIN, 1998; JANEWAY et al., 2002).

Durante sua evolução, o sistema imunológico da mucosa intestinal aparentemente desenvolveu duas armas de defesa adaptativas: a) exclusão imunitária, realizada por anticorpos secretados, particularmente imunoglobulina A (IgA), que inibe colonização de microorganismos patogênicos e penetração de antígenos luminiais; b) mecanismos auto regulatórios que visam evitar uma excessiva reação (hipersensibilidade) local e periférica

aos inúmeros micróbios e substâncias que bombardeiam constantemente a superfície da mucosa intestinal, mecanismo conhecido como tolerância oral (BRANDTZAEG; 1998; RUNDLES & LIN, 1998; MANHART et al., 2000; JANEWAY et al., 2002).

Resposta primária por meio de linfócitos B que secretam anticorpos parece originar-se principalmente em tecido linfoepitelial especializado que entra em contato com o antígeno na superfície mucosa. A estrutura de GALT inclui agregados de células conhecidos como placas de Peyer, e folículos solitários de células B secundárias (MANHART et al., 2000; JANEWAY et al., 2002).

Em humanos, as placas de Peyer são encontradas principalmente no íleo distal enquanto a maioria dos folículos solitários estão no apêndice e intestino grosso distal. Todos os componentes de GALT parecem ter funcionalidade similar; eles contêm epitélio folicular associado (FAE), com células de membrana (M) capazes de transportar antígenos vivos ou mortos para dentro do tecido linfóide (BRANDTZAEG, 1998; MANHART et al., 2000).

Linfócitos T e B, assim como macrófagos e outras células apresentadoras de antígenos (APCs) de variedade dendrítica, ocorrem imediatamente abaixo de FAE, sempre dentro da lâmina basal de suas células M. Antígenos que são transportados para dentro de GALT serão apresentados às células B como imunocomplexos retidos em células foliculares dendríticas (FDCs), dentro de centros germinais dos folículos linfóides secundários. Desta maneira, GALT é crucial para a indução de resposta imune a agentes infecciosos encontrados na superfície da mucosa (BRANDTZAEG, 1998; JANEWAY et al., 2002).

Embora diferentes regiões do sistema imunitário do trato gastrointestinal sejam compostas pelos mesmos tipos de células, como macrófagos, células T e B, dendríticas e M, elas são reguladas de forma diferente, de acordo com seu ambiente. Atividades regionalizadas como a passagem de nutrientes, digestão de grandes moléculas até pequenas moléculas, absorção de proteínas, vitaminas, elementos traço, água e a presença de material não absorvido que formará as fezes, influenciam a resposta imunitária das células em vários níveis (BRANDTZAEG, 1998; RUNDLES & LIN, 1998).

A função principal da resposta imunitária da mucosa é protegê-la, bloqueando a entrada de micróbios, toxinas e antígenos através de secreção e transporte ao lúmen intestinal de IgA. Este processo é mediado por um tipo especial de célula T de memória com capacidade proliferativa reduzida, que ativa células B auxiliares. Estes linfócitos T, diferentemente dos linfócitos T sanguíneos periféricos, são desenvolvidos com relativa

independência do timo e possuem função diversa. Estudos sugerem que a mucosa normal regula a atividade destas células T e que sua ativação produz uma resposta inflamatória (RUNDLES & LIN, 1998; MANHART et al., 2000; JANEWAY et al., 2002; DWINELL et al., 2003).

### **2.2.3 Rota e local de translocação bacteriana**

Ocorrência de translocação bacteriana para NLM (Nódulos Linfáticos Mesentéricos) em animais saudáveis foi observada por pesquisadores e tem sido considerada como parte de estimulação normal antigênica do tecido linfóide associado ao intestino, mesmo na ausência de injúria (SCHLEGEL et al., 2000; SALVALAGGIO et al., 2002; STEINBERG, 2003; WIEST & RATH, 2003).

Para BERG (1995), a translocação bacteriana ocorreria em 3 estágios; no primeiro estágio, a bactéria transporia a mucosa intestinal, alcançando os linfonodos mesentéricos; no segundo estágio, a bactéria migraria dos linfonodos mesentéricos para outros órgãos como fígado, baço, pulmões e rins e no terceiro e último estágio a bactéria se disseminaria pela cavidade peritoneal e sangue, provocando quadro septicêmico.

Existem várias rotas possíveis por meio das quais um microorganismo poderia translocar do intestino para outros locais. Estudos de translocação, usando partículas inertes, sugerem que estas partículas poderiam translocar através do epitélio intestinal, possivelmente como passageiros passivos dentro de fagócitos moveis (ALEXANDER et al., 1990; WIEST & RATH, 2003).

Tem sido sugerido que o mecanismo pelo qual as bactérias atravessariam a barreira mucosa seria principalmente através do próprio enterócito. ALEXANDER et al. (1990) demonstraram que a taxa de translocação bacteriana é maior através dos enterócitos do que entre eles e que isto ocorreria por um processo diferente do processo clássico de fagocitose ou exocitose, sendo observado em enterócitos morfologicamente intactos.

Acreditava-se que a capacidade de internalização através destes enterócitos estaria ligada ao grau de diferenciação destes e à sua produção de integrinas. Porém estudos recentes mostram que nem a maturidade do enterócitos e tampouco sua produção de integrinas aumentariam a capacidade de penetração de microorganismos.

Porém, mostrou-se que os microorganismos internalizam-se mais facilmente quando são expostas às membranas laterais dos enterócitos (HESS et al., 2001).

Existem evidências que sugerem papel chave do macrófago intestinal no processo de translocação bacteriana. Bactérias *E. coli* marcadas mostraram translocar através de trânsito direto pelos enterócitos, alcançando a lâmina própria onde são fagocitadas por macrófagos. Estes macrófagos transportam a bactéria até os nódulos linfáticos mesentéricos, onde as bactérias sobreviventes são liberadas (WELLS et al., 1987; WIEST & RATH, 2003).

Transporte direto de *Salmonella* do trato gastrointestinal até a corrente sangüínea também se daria através de macrófagos, presentes na lâmina própria. A partir daí viajariam até nódulos linfáticos, fígado, baço e medula óssea, alcançando assim a corrente sangüínea. O macrófago, muitas vezes, se mostra incapaz de matar o microorganismo, servindo então como seu meio de transporte (RUNDLES & LIN, 1998; WIEST & RATH, 2003).

Outra porta de entrada microbiana sugerida seria através das células M. Estas são células epiteliais de membrana, encontradas em porcentagens variáveis no intestino de diferentes espécies. As células M podem ser facilmente identificadas pela microscopia eletrônica, devido à sua borda em escova incomum. Pesquisas mostram que elas transportam antígenos através da mucosa até o tecido linfóide, onde ocorrem as respostas imunitárias (BRANDTZAEG, 1998).

Estudos *in vivo* e *in vitro* envolvendo células M e bactérias enteropatogênicas têm demonstrado que algumas utilizam a célula M como porta de entrada para infecção da mucosa intestinal. Já foi demonstrado que a *Salmonella typhimurium* adere e invade seletivamente células M, causando infecção em murinos. Neste caso, podem ocorrer destruição de células M, colonização e danos às placas de Peyer, levando à ulceração e perfuração da parede intestinal.

Também estudos com espécies de *Yersinia* mostraram que células M de murinos são alvos preferenciais para invasão, podendo também ocorrer colonização e lesão das placas de Peyer. O mesmo tem sido relatado com a *Shigella flexneri*, que também invade células M de coelho, com subsequente dano às placas de Peyer (JEPSON & CLARCK, 1998; JANEWAY et al., 2002).

Existem outras evidências em animais que bactérias patogênicas invadem células M e danificam placas de Peyer, podendo ser esta uma das prováveis rotas que levariam à internalização de bactérias. No entanto, na opinião de JEPSON & CLARK, as células M

constituem pequena proporção da superfície da mucosa e portanto, os autores acreditam na existência de outras rotas de igual importância.

Em humanos, translocação além de nódulos linfáticos, raramente tem sido estudada. O principal impacto fisiológico da translocação bacteriana além dos nódulos linfáticos até o ducto torácico seria a passagem através do sistema reticuloendotelial do fígado, que atuaria como um filtro de toxinas e bactérias. Alguns autores têm relatado translocação de toxina através do ducto torácico em pacientes com falência sistêmica de órgãos.

Em modelos experimentais com grande injúria, tem sido mostrado predominância de translocação via veia porta, demonstrando-se a presença de bactérias na circulação portal após sua detecção em grande quantidade nos linfonodos mesentéricos.

O local onde ocorre a translocação bacteriana varia conforme o modelo experimental empregado. Na endotoxemia, a injúria intestinal parece ser maior no íleo e ceco; durante nutrição parenteral total, em todo intestino delgado e ceco; em queimados, íleo, jejuno e cólon proximal mostram taxas iguais de translocação. Taxas maiores de *E. coli* marcadas viáveis foram detectadas em NLM quando estas foram inoculadas no jejuno, se comparadas à inoculação no íleo ou intestino grosso. Isto ocorreria porque, em contraste com o trato gastrointestinal alto que possui menos bactérias próximo à junção ileo-cecal, o número e quantidade de espécies aumentam consideravelmente. Portanto, estas regiões estariam mais aptas em impedir a translocação de bactérias viáveis. O cólon possui características de permeabilidade diferentes do intestino delgado: apresenta maior resistência elétrica e menor permeabilidade ao movimento passivo de íons. Estas características explicariam a maior susceptibilidade do intestino delgado à translocação bacteriana (WIEST & RATH, 2003).

## **2.3 OBSTRUÇÃO INTESTINAL**



Podemos definir obstrução intestinal como uma síndrome gerada pelo bloqueio mecânico total ou parcial à progressão do conteúdo intestinal (DANI, 2001). As aderências abdominais, seguidas pelas hérnias, são as maiores responsáveis pelos casos de obstrução intestinal do delgado em adultos. Os tumores malignos constituem a principal causa de obstrução intestinal do intestino grosso, em adultos. A invaginação intestinal é a causa mais freqüente de obstrução intestinal em crianças (ROCHA et al., 1993; DANI, 2001; TAN et al., 2002).

As obstruções intestinais podem ser classificadas conforme a predominância do seu quadro clínico. Como critérios de classificação, podemos usar: localização, grau de oclusão, modo de instalação do quadro, presença ou não de estrangulamento e presença de doenças intercorrentes do paciente (DANI, 2001).

Segundo a localização, a obstrução pode ser alta ou baixa. Existem divergências em relação a esta classificação. Alguns autores consideram obstrução alta, aquela que se localiza acima da válvula ileocecal e obstrução baixa, aquela que se localiza abaixo da válvula ileocecal (GALVÃO, 1978; BRASILEIRO-FILHO, 2000). Outros empregam o termos obstrução alta e baixa, para as obstruções em níveis diferentes do intestino delgado, que apresentam quadros clínicos diversos. Reservam os termos obstrução do cólon e do intestino delgado para as obstruções abaixo e acima da válvula ileocecal, respectivamente (ROCHA et al., 1993; DANI, 2001).

Quanto ao grau de oclusão, a obstrução pode ser completa ou incompleta. A parada de eliminação de fezes geralmente ocorre após algum tempo, podendo haver inicialmente eliminação de fezes retidas abaixo do segmento obstruído. Caso esta eliminação persista, há indicação de que a obstrução é incompleta.

Segundo o modo de instalação vamos classificar a obstrução em aguda ou crônica. Obstrução com estrangulamento é aquela em que ocorre comprometimento vascular da parede intestinal; sem estrangulamento, quando não ocorre este comprometimento (DANI, 2001).

Em linhas gerais, pode-se afirmar que qualquer patologia do intestino, seja congênita ou adquirida, neoplásica ou inflamatória, orgânica ou funcional, é passível de provocar uma obstrução. Em vista de tal multiplicidade de fatores causais, a oclusão intestinal situa-se entre as mais freqüentes emergências abdominais (GALVÃO, 1978).

Na história da cirurgia, a primeira laparotomia descrita para tratar obstrução intestinal, um caso de intussuscepção, data de 1679 e é atribuída ao suíço Theophile Bonetus (1620-1689); em 1710, foi realizada pelo médico francês Alexis Littre (1658-1726) a primeira colostomia para tratar obstrução do intestino grosso; o francês Guillaume Dupuytren (1777-1835) realizou a primeira enterostomia para tratar obstrução do intestino delgado.

Em 1819, Maunoury, jovem cirurgião parisiense, criticou Dupuytren por não operar mais precocemente, em vez de aplicar sanguessugas sobre o abdômen e anus de pacientes obstruídos. Entretanto, cabe ao médico francês Auguste Nélaton (1807- 1835), o nome e a divulgação da técnica de enterostomia descompressora, que se tornou popular quase na entrada do século 20.

A fisiopatologia clássica da obstrução intestinal, com seu quadro toxêmico, passou a ser melhor entendida no início do século 20. Isto é evidenciado através do clássico texto publicado pelo barão Moynihan, em 1904, que escreveu: “O impedimento mecânico ao avanço do fluxo do conteúdo intestinal não é a causa da condição grave do paciente. Ela ocorre devido à sobrecarga, distensão e absorção do conteúdo na qual a virulência bacteriana é bastante aumentada, o que forçaria sua rápida liberação” (SCHEIN, 2000).

Na fisiopatologia da obstrução intestinal são encontrados 3 distúrbios básicos: estase do conteúdo intestinal, distensão do intestino e isquemia da parede intestinal (ROCHA et al., 1993).

A estase intestinal é causada pela diminuição da absorção intestinal e do aumento paradoxal da secreção entérica. Como conseqüências da estase teremos: vômitos, seqüestro de água e eletrólitos, hipovolemia, distúrbios ácido básicos, proliferação bacteriana e ausência de eliminação de gases e fezes (ROCHA et al., 1993). A proliferação bacteriana intraluminal, especialmente de bacteróides e bactérias Gram negativo anaeróbicas, torna o conteúdo do intestino delgado malcheiroso, levando a vômitos fecalóides.

A distensão intestinal é causada pela falta de propulsão do conteúdo entérico, assim como do acúmulo de gases (ar deglutido e gases produzidos pela microbiota) e secreções lançadas na luz intestinal. Tem como conseqüências: aumento da pressão intraluminal, peristaltismo de luta e insuficiência respiratória aguda.

A isquemia resulta do comprometimento da circulação sangüínea da alça intestinal afetada. O fluxo vascular intestinal pode ser afetado pelo aumento da pressão intraluminal, pela compressão dos vasos mesentéricos por bridas, aderências, anel

herniário, pela compressão extrínseca da parede intestinal ou pela obstrução vascular aguda, geralmente trombose ou embolia dos vasos mesentéricos. Como conseqüências da isquemia poderão ocorrer perdas sangüíneas e de plasma para a luz intestinal, peritonite e finalmente, como condição mais grave, choque misto hipovolêmico e toxêmico (ROCHA et al., 1993; DANI, 2001).

A mucosa é a camada mais sensível à diminuição do fluxo sanguíneo, descamando-se e levando à exsudação e hemorragia para a luz intestinal, ao mesmo tempo em que permite a penetração de bactérias e produtos tóxicos através da parede intestinal para a cavidade peritoneal. Uma alça distendida com paredes adelgaçadas, também contribui para propiciar a passagem de bactérias e toxinas de seu interior ao peritônio. A peritonite tende a ser a complicação mais precoce nas obstruções intestinais (GALVÃO, 1978; DANI, 2001).

Quando ocorre isquemia de alça intestinal e passagem rápida de fluidos para a cavidade peritoneal, pode ocorrer também o fenômeno da translocação bacteriana. Esta conduz ao estado de toxemia, que pode resultar em choque (hipotensão, alto débito cardíaco, baixa resistência periférica, acidose metabólica e insuficiência respiratória grave); (BRASILEIRO-FILHO, 2000).

A incidência de translocação bacteriana em pacientes operados devido a obstrução intestinal é significativamente maior que em pacientes submetidos à cirurgia por outros motivos (DEITCH, 1989; SEDMAN et al., 1994; SALVALLAGIO et al., 2002; TAN et al., 2002).

Alguns autores têm tentado correlacionar evolução da obstrução intestinal, com estado nutricional do hospedeiro. SALVALLAGIO et al. (2002) demonstraram que suplementação dietética com glutamina não impediria translocação bacteriana em ratos submetidos à obstrução intestinal, com injeção de *E. coli* no íleo. Porém, diminuiria a disseminação bacteriana com quadro septicêmico nestes animais.

OLIVEIRA (2004), também utilizando um modelo experimental de obstrução intestinal em ratos, mostrou que a glutamina na dose de 500 mg/kg/dia não impedia a translocação bacteriana, mas reduzia significativamente a disseminação da *E. coli*.

DUERBSEN et al., (2004) estudaram translocação bacteriana intestinal em humanos. Não observaram melhora clínica nem maior sobrevida em pacientes com obstrução intestinal, ocasionada por patologias malignas submetidos à nutrição parenteral total. No entanto, a nutrição parenteral foi relacionada a um aumento de complicações sépticas nesses pacientes.

Tendo por base vários estudos prévios em animais, acredita-se que a obstrução intestinal induz translocação bacteriana por promoção de um excessivo crescimento bacteriano, isquemia com aumento da permeabilidade da parede intestinal, podendo ocorrer rompimento físico da barreira mucosa. Se os fatores atuam isoladamente, ou um se superpõe ao outro, são questionamentos que necessitam maiores investigações. (DEITCH, 1989, BRASILEIRO- FILHO, 2000).

## 2.4 ISÓTOPO RADIOATIVO

O isótopo radioativo  $^{99m}\text{Tc}$  é um radionuclídeo artificial proveniente da desintegração radioativa do elemento  $^{99}\text{Mo}$  que por sua vez é um isótopo radioativo originado da fissão nuclear do urânio (DINIZ, 1998). O nome tecnécio é procedente do grego *tecnetos*, que significa "artificial". Foi descoberto por Carlo Perrier e Emilio Segré na Itália em 1937, numa amostra de molibdênio, enviada por Ernest Lawrence, que foi bombardeada com núcleos de deutério em um ciclotron em Berkeley, na Universidade da Califórnia. O tecnécio foi o primeiro elemento a ser produzido artificialmente (MARK WINTER, 2003).

Dimitri Mendeleiev previu que faltava na tabela periódica um elemento que seria similar ao manganês e o denominou ekamanganês. Em 1925, quando foi descoberto o rênio acreditou-se que havia sido encontrado o elemento de número atômico 43, e foi dado a ele o nome de masurio. Porém logo ficou comprovado que aquele não era o elemento previsto. O desenvolvimento da energia nuclear nos meados do século XX permitiu gerar as primeiras amostras deste elemento através de reações nucleares (MARK WINTER, 2003).

Desde que foi descoberto o tecnécio, numerosas buscas em materiais terrestres procedentes de fontes naturais têm sido realizadas. Em 1982, o  $^{99}\text{Tc}$  foi isolado e identificado no mineral pechblenda, procedente da África em quantidades muito pequenas, como produto da fissão espontânea do  $^{99}\text{Mo}$ . Esta descoberta foi feita por B.T. Kenna e P.K. Kuroda (MARK WINTER, 2003).

O gerador do  $^{99m}\text{Tc}$  consiste de uma coluna de vidro onde o radionuclídeo  $^{99}\text{Mo}$  encontra-se adsorvido em resina de alumina. No processo de desintegração radioativa ocorre emissão de radiação  $\beta^-$  pelo  $^{99}\text{Mo}$  originando os átomos de

$^{99m}\text{Tc}$ tecnécio. Estes átomos são eluídos do gerador com solução de cloreto de sódio 0,9%, na forma de pertecnetato de sódio ( $\text{Na}^{99m}\text{TcO}_4$ ). Como nesta forma o  $^{99m}\text{Tc}$  não é reativo, sendo necessário reduzi-lo para  $^{99m}\text{TcO}_2$  o que se faz com uso de cloreto estano (DINIZ, 1998).

O  $^{99m}\text{Tc}$  tecnécio tornou-se um radioisótopo muito utilizado devido ao seu baixo custo, alta disponibilidade, tempo de meia vida curto, emissão de radiação gama e energia de radiação (140 Kev). Este radioisótopo tem sido amplamente utilizado em pesquisas que envolvem uso de radiotraçadores, inclusive em bactérias como a *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* e *Salmonella abortusovis*. (DINIZ, 1998).

Devido ao  $^{99m}\text{Tc}$ tecnécio ser um metal deficiente em elétrons, ele vai reagir com grupos doadores de elétrons. No caso da marcação de bactérias, o mais provável é que o  $^{99m}\text{Tc}$ tecnécio reaja com estruturas protéicas bacterianas, da parede celular ou mesmo citoplasmáticas, já que estas possuem grupos doadores de elétrons (DINIZ, 1998).

A *E. coli* marcada com  $^{99m}\text{Tc}$ tecnécio, permanece estável por um período de até 36 horas. Este dado mostra que a ligação do  $^{99m}\text{Tc}$ tecnécio com as células bacterianas permite a realização de experimentos com 24 horas de duração. Caso não existisse esta estabilidade, poderia ocorrer a liberação de átomos de  $^{99m}\text{Tc}$ tecnécio durante a realização dos experimentos, o que comprometeria a determinação da radioatividade, porque passaríamos a ter radiação proveniente da  $^{99m}\text{Tc}$ -*E. coli* e de átomos de  $^{99m}\text{Tc}$ tecnécio livres (DINIZ, 1998).

Outro aspecto importante a ser ressaltado é que a bactéria marcada permanece viável. Estudos mostraram que, após o processo de marcação, não são encontradas diferenças significativas entre o número de unidades formadoras de colônias de *E. coli* marcada e *E. coli* controle, não marcada (DINIZ, 1998).

## 3 MATERIAL E MÉTODOS

### 3.1 Material

#### 3.1.1 Reagentes

- cloreto de sódio – Merck
- caldo de soja tripticaseína – Merck
- cloreto estânico – Sigma
- éter etílico – Merck
- Dopalen<sup>®</sup> (Agribands do Brasil)
- Rompun<sup>®</sup> (Bayer)
- ração para ratos (LABINA<sup>®</sup>)
- soro albumina bovina grau V (BSA)

#### 3.1.2 Equipamentos

- centrífuga Fanem
- cintilador automático, Ansr, Abbot
- espectrofotômetro CELM E-205 D
- espectrofotômetro Coleman Júnior II
- banho-maria Fanem
- agitador orbital com temperatura Robertshaw
- estufa com temperatura Forma – Scientific
- estufa para esterilização e secagem modelo
- balança analítica BP 221S SARTORIUS
- vortex mixer II THERMOLYNE

#### 3.1.3 Outros

- gerador de <sup>99</sup>molibdênio/<sup>99m</sup>tecnécio – IPEN/CNEN – São Paulo
- Fio de sutura de nylon 4.0

- Fio de sutura catgute 4.0
- Material cirúrgico: tesouras, lâmina de bisturi, bisturi, pinças hemostáticas.
- Programa para computador BioEstat versão 3.0 (Sociedade Civil Mamirauá/MCT-CNPq)

### 3.1.4 Animais e Rações

O presente estudo foi aprovado pelo *Comitê de Ética em Experimentação Animal* (CETEA/UFMG) da Universidade Federal de Minas Gerais. Foram utilizados nos experimentos 2 grupos de ratos Wistar, machos, criados no Biotério Experimental da Faculdade de Farmácia da UFMG em condições nutricionais como descrito a seguir:

Grupo normonutrido (GNN) - Em torno de 18 dias após o acasalamento dos animais, as fêmeas foram separadas e alimentadas com uma dieta composta por ração comercial para ratos (Tabela 7). Ração e água foram fornecidas *ad libitum*. O consumo foi determinado diariamente e o número de filhotes por fêmea foi fixado em 8. Aos 21 dias, os filhotes foram desmamados e as fêmeas sacrificadas (em câmara de gás CO<sub>2</sub>). Os animais machos foram mantidos em gaiolas individuais, recebendo água e ração *ad libitum* até completarem 70 dias de idade, quando passaram a ser submetidos aos ensaios biológicos.

Grupo em restrição alimentar (GRA) – Em torno de 18 dias após o acasalamento dos animais, as fêmeas foram separadas e alimentadas com dieta idêntica àquela oferecida ao grupo controle, porém em quantidade correspondente a 65% do consumo dos animais normonutridos. Água foi oferecida *ad libitum*. O número de filhotes por fêmea foi fixado em 8. Aos 21 dias os filhotes foram desmamados e as fêmeas sacrificadas (em câmara de gás CO<sub>2</sub>). Os animais machos foram mantidos em gaiolas individuais e permaneceram sujeitos à restrição alimentar de 35% até a idade de 70 dias, quando então foram submetidos aos ensaios biológicos.

Os animais foram subdivididos da seguinte maneira para avaliação da translocação bacteriana:

- a) grupo controle normonutrido (GNNa), nove animais que foram “sham” operados para obtenção de estresse cirúrgico e que receberam  $^{99m}\text{Tc-E.coli}$  no lúmen intestinal;
- b) grupo normonutrido (GNNb), nove animais que foram submetidos à ligadura de íleo terminal (modelo de obstrução intestinal, SALVALLAGIO,2002) e que receberam  $^{99m}\text{Tc-E.coli}$  no lúmen intestinal;
- c) grupo desnutrido (GRAa), nove animais que foram “sham” operados para obtenção de estresse cirúrgico e que receberam  $^{99m}\text{Tc-E.coli}$  no lúmen intestinal;
- d) grupo desnutrido (GRAb), nove animais que foram submetidos à ligadura de íleo terminal (modelo de obstrução intestinal, SALVALLAGIO,2002) e que receberam  $^{99m}\text{Tc-E.coli}$  no lúmen intestinal.

## 3.2 MÉTODOS

### 3.2.1 Preparação da bactéria

A bactéria utilizada no estudo foi a *Escherichia coli* (ATCC-10536), não patogênica. *E. coli* são enterobactérias, Gram-negativo, do grupo enterobacteraceae, facultativas, que fazem parte da microbiota normal do trato gastrointestinal.

De uma cultura dessas bactérias, fornecida pelo Laboratório de Controle de Qualidade Biológico da Faculdade de Farmácia da UFMG, crescida durante 18 horas a 37°C, foi retirada uma alíquota de 0,1 mL e adicionada em 10 mL de caldo soja tripticaseína. Esta cultura foi mantida a 37° C sob aeração por 4 horas. A concentração bacteriana foi ajustada espectrofotometricamente (Coleman Júnior II) em 31% de transmitância a 580 nm que corresponde aproximadamente  $10^8$  unidades formadoras de colônia por mL (UFC/mL).

### 3.2.2 Procedimento da marcação

Alíquotas de 2,0 mL da suspensão bacteriana descrita no item 3.2.1 foram incubadas a 37°C com cloreto estano na concentração de 580  $\mu\text{M}$  (1,3 mg/mL), pH 7,0, por 10 minutos. Após este período, 15 a 74 MBq de  $^{99m}\text{Tc}$  foram adicionados a cada preparação e mantidos a 37°C por mais 10 minutos. Os tubos foram centrifugados a 3000 rpm por 25 minutos (Centrífuga Fanem, modelo 206 R) e uma alíquota de 100 $\mu\text{L}$  do

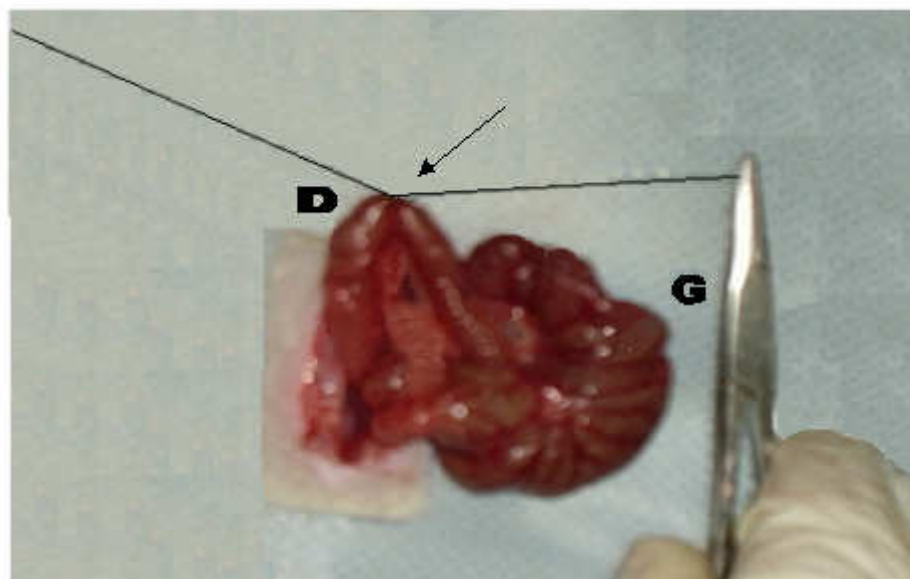


sobrenadante foi retirada para a determinação da radioatividade. O precipitado foi ressuspenso em 3,0 mL de salina estéril e em seguida retirou-se uma alíquota de 100µL para contagem da radioatividade. Este procedimento foi repetido por três vezes (DINIZ, 1998). A porcentagem de  $^{99m}\text{Tc}$  incorporado nas células bacterianas foi determinada do seguinte modo:

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

### 3.2.3 Modelo experimental de obstrução intestinal

Dezoito ratos, nove do grupo GNN e nove animais do grupo GRA foram pesados, anestesiados com uma mistura de cloridrato de tiazina (Rompun)/cloridrato de quetamina (Dopalen), na dosagem de 12,5mg/kg e 31,25 mg /kg, respectivamente, administrados via intraperitoneal. Uma incisão mediana de aproximadamente 3 cm foi feita no abdômen dos animais com exposição do íleo terminal. Em seguida, o íleo terminal sofreu uma ligadura com nó simples utilizando fio de nylon 4.0 (Figura 1). Posteriormente, 1,0 mL de  $^{99m}\text{Tc}$ -*E. coli* (74 MBq = 2 mCi) foi administrado no lúmen intestinal imediatamente na porção anterior à ligadura que foi realizada a 1 cm da válvula íleo-cecal. Após verificação visual de que não houve vazamento foi realizada a sutura da camada muscular abdominal com fio de sutura catgute 4.0 e da pele com fio de nylon 4.0 (SALVALLAGIO et al., 2002).



**Figura 1 - Ligadura do íleo terminal.** (D)-intestino delgado – (G) Intestino grosso. Na ponta da seta, íleo distal onde foi realizada a ligadura simples do intestino, para promoção da obstrução intestinal experimental.

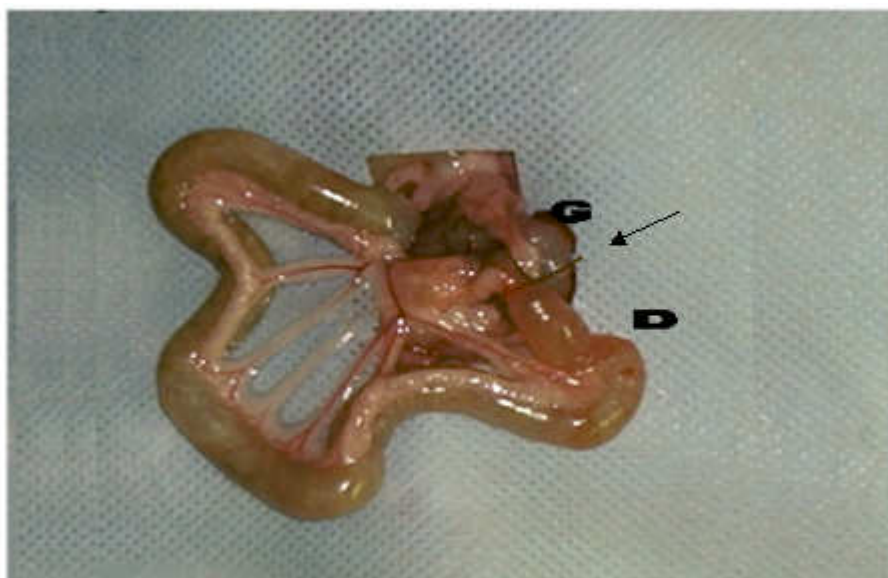
### 3.2.4 Grupos “Sham”operados

Dezoito ratos, nove do grupo GNN e nove animais do grupo GRA foram pesados, anestesiados com uma mistura de cloridrato de tiazina (Rompun)/cloridrato de quetamina (Dopalen), na dosagem de 12,5mg/kg e 31,25 mg /kg, respectivamente, administrados via intraperitoneal. Uma incisão mediana de aproximadamente 3 cm foi feita no abdômen dos animais com a única finalidade de promover estresse cirúrgico. Posteriormente, 1,0 mL de  $^{99m}\text{Tc-E. coli}$  (74 MBq = 2 mCi) foi administrado no lúmen intestinal na região correspondente ao íleo terminal. Constatado que não houve vazamento, foi realizada a sutura do abdômen.

### 3.2.5 Estudo da translocação bacteriana

Após os procedimentos cirúrgicos supracitados e a administração da  $^{99m}\text{Tc-E. coli}$  diretamente no lúmen intestinal, os animais foram colocados em gaiolas e mantidos por 24 horas no mesmo regime alimentar pré cirúrgico. Após esse período, os animais foram

novamente anestesiados e o sangue coletado da veia cava inferior para a determinação da radiação. No sangue coletado (6 mL), foram adicionados 2,0 mL de anticoagulante (ACD-A), sendo que 1 mL foi retirado para a contagem da radioatividade. Foi efetuada abertura da cavidade abdominal, com exposição de vísceras (Figura 2). Os nódulos linfáticos mesentéricos (NLM), fígado, baço e pulmões foram coletados, lavados e pesados para a determinação da radioatividade em um cintilador de poço. A contagem da radioatividade foi corrigida por um fator de decaimento para o tecnécio, considerando a Tabela 8. Foram excluídos do experimento os resultados de três animais, 2 do grupo GRA e 1 do grupo GNN, porque ocorreu ruptura do intestino delgado com extravasamento de conteúdo fecal e contaminação de outros órgãos.



**Figura 2 – Intestino delgado 24 hs após ligadura do íleo terminal.** (D)-intestino delgado – (G) Intestino grosso. Pode ser observado dilatação do intestino delgado acima da área submetida à ligadura simples (seta), com mudança da coloração vermelho- róseo normal deste órgão.

### **3.2.6 Avaliação do efeito da restrição energético protéica sobre o peso corporal**

Cada animal foi pesado semanalmente, desde o nascimento, até a nona semana quando foram iniciadas as cirurgias para a obtenção da obstrução intestinal. Os pesos dos animais dos dois grupos (alimentado *ad libitum* e submetido à restrição alimentar ) foram expressos como média e erro padrão da média.

### **3.2.7 Avaliação do efeito da restrição energético protéica sobre o peso dos órgãos estudados**

Os órgãos retirados, fígado, baço, pulmões e nódulos linfáticos mesentéricos foram minuciosamente examinados e pesados após o sacrifício dos ratos.

### **3.2.8 Análises estatísticas**

Os pesos dos animais obtidos semanalmente durante o período de desnutrição foram expressos em média  $\pm$  erro padrão da média e analisados por análise de variância e pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade, para verificar se houve diferença significativa entre os tratamentos. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas para valores de  $p \leq 0,05$ .

Considerando que os resultados obtidos da translocação bacteriana não seguiram uma distribuição normal, eles foram analisados pelo teste não paramétrico de Mann-Whitney para amostras independentes. As diferenças foram consideradas significativas para valores de  $p \leq 0,05$ .

## 4 RESULTADOS

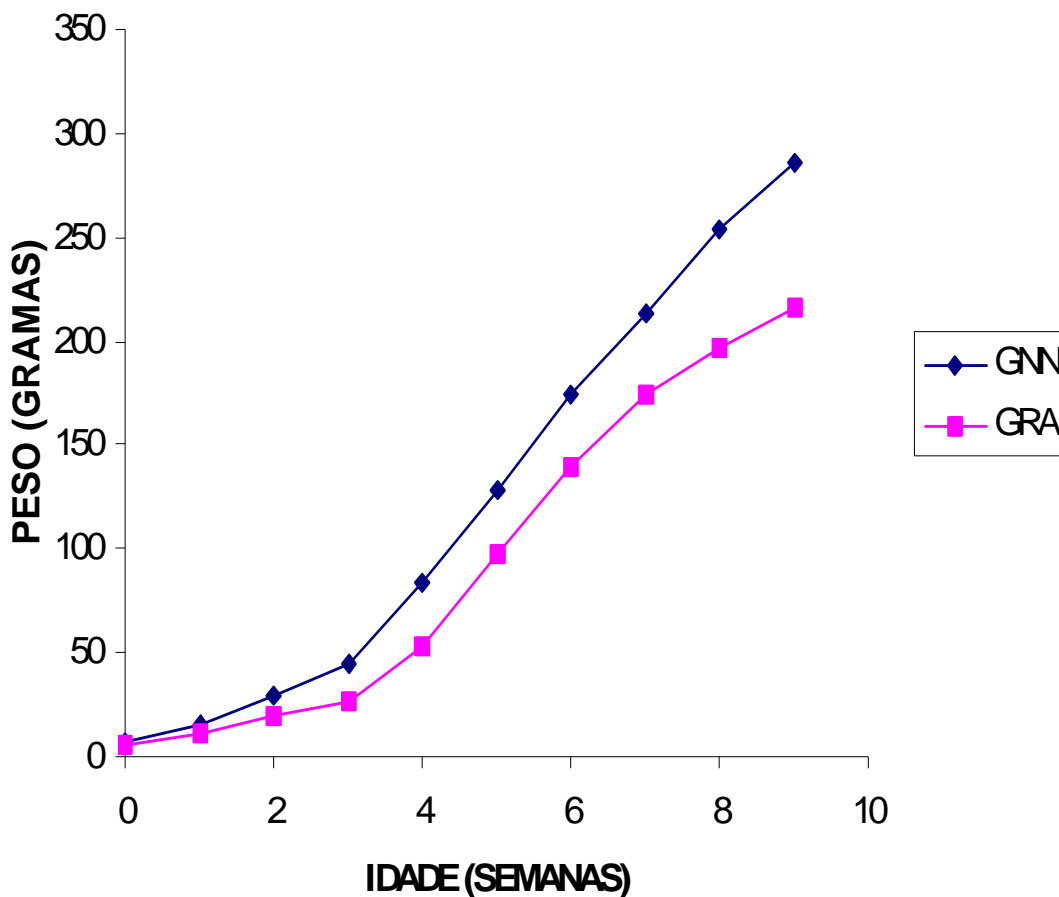
### 4.1 EFEITO DA RESTRIÇÃO ALIMENTAR ENERGÉTICO-PROTÉICA SOBRE O PESO CORPORAL

Observa-se pelos valores da Tabela 1, que o peso médio dos animais submetidos à restrição alimentar de 35% mostrou ser significativamente menor quando comparado ao peso médio dos animais que receberam ração *ad libitum*. Esta diferença foi observada desde o nascimento até a nona semana de vida, ocasião em que foram iniciadas as cirurgias ( $p \leq 0,05$  - Teste de Duncan).

**Tabela 1 \_ Média dos pesos corpóreos semanais, em gramas, dos animais dos grupos estudados, GNN (normonutrido) e GRA (desnutrido).**

Idade	GNN	GRA	<i>p</i>
<b>Semanas nascimento</b>	6,74 ± 0,64	5,68 ± 0,44	} $p \leq 0,05$
1	15,18 ± 0,76	11,33 ± 1,14	
2	28,71 ± 1,48	19,71 ± 1,01	
3	44,38 ± 1,29	26,29 ± 2,29	
4	83,09 ± 1,89	53,58 ± 3,49	
5	128,79 ± 3,69	97,76 ± 3,90	
6	174,86 ± 2,58	139,71 ± 3,17	
7	213,92 ± 3,80	173,71 ± 3,62	
8	253,74 ± 3,40	196,52 ± 2,31	
9	286,53 ± 3,40	216,55 ± 1,96	

Os valores representam a média dos pesos ± desvio padrão, n=36. Todos os pesos obtidos semanalmente mostraram diferenças estatisticamente significativas entre os grupos GNN e GRA (Teste de Duncan,  $p \leq 0,05$ ).



**Figura 3- Gráfico do peso corpóreo médio semanal dos animais dos grupos GNN (normonutridos) e GRA (desnutridos), em gramas. O peso foi medido desde o nascimento.**

As médias com desvio padrão dos pesos corpóreos dos animais dos grupos GRA e GNN, quando foram submetidos às cirurgias (“Sham” cirurgia e ligadura simples de íleo terminal) foram  $316,70 \pm 22,25$  e  $207,90 \pm 14,74$ , respectivamente. As médias dos pesos dos animais dos grupos operados GRA, mostraram-se estatisticamente menores que as do grupos GNN operados ( $p \leq 0,05$  - Teste de Duncan).

## 4.2 EFEITO DA RESTRIÇÃO ALIMENTAR ENERGÉTICO-PROTÉICA SOBRE O PESO DOS ÓRGÃOS ESTUDADOS

A Tabela 2 mostra que os pesos médios dos órgãos dos animais que sofreram restrição alimentar foram estatisticamente menores que os pesos médios dos órgãos daqueles animais que não sofreram restrição alimentar, ( $p \leq 0,05$  - Teste de Duncan). Entretanto, o valor das proporções entre os pesos médios dos órgãos e pesos médios corpóreos grupos GNN e GRA não apresentaram diferenças significativas (tabela 13 (pag. 78)). Os órgãos foram examinados e comparados macroscopicamente. A única alteração macroscópica observada foi em seu tamanho, não sendo observadas diferenças em sua coloração, consistência e elasticidade.

**Tabela 2 – Média dos pesos, em gramas, dos órgãos dos animais dos grupos estudados GNN (nomonutrido) e GRA (desnutrido).**

Órgãos	GNN	GRA	<i>p</i>
Fígado	10,91 ± 1,63	7,85 ± 0,86	} $p \leq 0,05$
Baço	0,64 ± 0,12	0,47 ± 0,06	
Pulmões	1,46 ± 0,23	1,01 ± 0,06	
NLM	0,51 ± 0,11	0,29 ± 0,08	

Os valores representam a média dos pesos ± desvio padrão, n=36. Todos os pesos dos órgãos, mostraram diferenças estatisticamente significativas (Teste de Duncan  $p \leq 0,05$ ).

## 4.3 ESTUDOS DE BIODISTRIBUIÇÃO DA <sup>99m</sup>Tc-*E.Coli* NOS RATOS NORMONUTRIDOS (GNN)

Os dados da Tabela 3 mostram que houve maior contagem da <sup>99m</sup>Tc-*E.coli*, estatisticamente significativa, no sangue e em todos os órgãos investigados dos animais do grupo GNN que foram submetidos a obstrução intestinal ( $p \leq 0,05$  - Teste de Mann-Whitney).

**Tabela 3 \_ Biodistribuição da  $^{99m}\text{Tc-E. coli}$ , 24 horas após injeção no íleo dos ratos normonutridos (GNN), dos grupos “Sham” operado e com obstrução intestinal.**

Órgãos	“Sham”operado (cpm/g)	Obstrução intestinal (cpm/g)	<i>p</i>
Fígado	417,53	1993,36	0,004
Baço	249,82	1108,64	0,050
Pulmão	102,73	408,38	0,003
NLM	748,02	4354,52	0,010
Sangue	113,57	362,08	0,010

Os valores representam as médias (cpm/g).

“Sham”operados, n=8.

Obstrução intestinal, n=9.

Diferenças estatisticamente significativas, teste de Mann-Witney ( $p \leq 0,05$ ).

#### 4.4 ESTUDOS DE BIODISTRIBUIÇÃO DA $^{99m}\text{Tc-E.Coli}$ NOS RATOS QUE SOFRERAM RESTRIÇÃO ALIMENTAR (GRA)

Os dados da Tabela 4 mostram que houve maior contagem da  $^{99m}\text{Tc-E.coli}$ , estatisticamente significativa, no sangue e em todos os órgãos investigados dos animais do grupo GRA que foram submetidos a obstrução intestinal. ( $p \leq 0,05$  - Teste de Mann-Whitney)

**Tabela 4 – Biodistribuição da  $^{99m}\text{Tc-E. coli}$ , 24 horas após injeção no íleo dos ratos que sofreram restrição alimentar (GRA), dos grupos “Sham” operado e com obstrução intestinal.**

Órgãos	“Sham”Operado (cpm/g)	Obstrução intestinal (cpm/g)	<i>p</i>
Fígado	294,02	1522,20	0,001
Baço	176,45	1029,91	0,012
Pulmão	144,54	463,96	0,046
NLM	598,54	2512,44	0,021
Sangue	95,32	489,91	0,002

Os valores representam as médias (cpm/g).

“Sham”operados, n=8.

Obstrução intestinal, n=9.

Diferenças estatisticamente significativas  $p \leq 0,05$ , teste de Mann-Witney.



#### 4.5 EFEITO DA RESTRIÇÃO ALIMENTAR ENERGÉTICO-PROTÉICA SOBRE A TRANSLOCAÇÃO BACTERIANA, NOS ANIMAIS “SHAM “ OPERADOS

Observa-se pela Tabela 5 que não houve diferenças, estatisticamente significativas, na distribuição biológica da  $^{99m}\text{Tc-E.coli}$  entre os órgãos e o sangue dos ratos "Sham" operados normonutridos (GNN) e aqueles "Sham" operados que sofreram restrição alimentar (GRA).

**Tabela 5 – Biodistribuição da  $^{99m}\text{Tc-E. coli}$  , 24 horas após injeção no íleo dos ratos dos grupos GNN (normonutrido) e GRA (desnutrido), "Sham" operados.**

Órgãos	"Sham" Operado GNN (cpm/g)	"Sham" Operado GRA (cpm/g)	<i>p</i>
Fígado	417,53	294,02	0,460
Baço	249,82	176,45	0,251
Pulmão	102,73	144,54	0,292
NLM	748,02	598,54	0,290
Sangue	113,57	95,32	0,921

Os valores representam as médias (cpm/g).

"Sham"operados, (GNN), n=9.

"Sham" operados, (GRA), n= 8.

Diferença estatisticamente significativa para  $p > 0,05$ , teste de Mann-Witney.

#### 4.6 EFEITO DA RESTRIÇÃO ALIMENTAR ENERGÉTICO-PROTÉICA SOBRE A TRANSLOCAÇÃO BACTERIANA, NOS ANIMAIS SUBMETIDOS À OBSTRUÇÃO INTESTINAL

Quando se compara os resultados da biodistribuição da  $^{99m}\text{Tc-E.coli}$  nos ratos, com obstrução intestinal, do grupo normonutrido (GNN) com aqueles obtidos nos ratos, com obstrução intestinal, que sofreram restrição alimentar(GRA) , Tabela 6, não se observa diferença estatisticamente significativa entre ambos.

**Tabela 6 \_ Biodistribuição da  $^{99m}\text{Tc-E. coli}$  , 24 horas após injeção no íleo dos ratos dos grupos GNN (normonutrido) e GRA (desnutrido) que apresentavam obstrução intestinal.**

<b>Órgãos</b>	<b>Obstrução intestinal GNN (cpm/g)</b>	<b>Obstrução intestinal GRA (cpm/g)</b>	<b><i>p</i></b>
Fígado	1993,36	1522,20	0,145
Baço	1108,64	1029,91	0,825
Pulmão	408,38	463,96	0,508
NLM	4354,52	2512,44	0,757
Sangue	362,08	489,01	0,965

Os valores representam as médias (cpm/g).

Obstrução intestinal, (GNN), n=9.

Obstrução intestinal, (GRA), n= 8.

Diferença estatisticamente significativa para  $p > 0,05$ , teste de Mann-Witney.

## 5 DISCUSSÃO

A restrição energético-protéica, com o intuito de provocar um estado de desnutrição no animal, pode ser imposta de diferentes maneiras. Os animais podem ser alimentados *ad libitum* porém recebendo uma ração desbalanceada em nutrientes. Frequentemente, com um conteúdo protéico baixo em relação ao total de calorias, aquém das necessidades preconizadas para aquele determinado animal. Outro tipo de restrição energético-protéica é o fornecimento de uma ração nutricionalmente balanceada, porém em quantidade inferior àquela consumida por animais controle alimentados *ad libitum* (RABELO, 1997).

A restrição alimentar vai variar também conforme o período em que é iniciada. Algumas restrições são impostas a partir do período gestacional (intra útero), persistindo durante o aleitamento e em alguns casos até após o mesmo. Certos tipos de restrições podem ser iniciadas após o nascimento e outras podem ser impostas na idade adulta. As restrições podem durar dias, meses ou até anos, dependendo da espécie e da sobrevivência do animal.

As características da restrição alimentar vão determinar modificações bem diversificadas no desenvolvimento do animal, no seu crescimento, nas suas alterações bioquímicas e fisiológicas (RESNICK et al., 1982; RABELO, 1997; HUANG & FRAKER, 2003).

Neste estudo optou-se por uma restrição alimentar iniciada no final do período gestacional, com restrição de 35% da quantidade de ração em relação àquela consumida pelos ratos alimentados *ad libitum*, com a finalidade de menor produção de leite.

Os dados obtidos mostraram que os animais que sofreram restrição alimentar apresentaram uma média de peso significativamente menor, quando comparada com aquela obtida para os animais do grupo normonutrido. Estes dados encontram respaldo na literatura (RABELO, 1997). Entretanto, a diferença significativa de pesos dos animais entre os grupos normonutridos e desnutridos observada logo após o nascimento, em um modelo de restrição imposta a partir do décimo oitavo dia de gestação, mostra-se em desacordo com os relatos de RABELO (1997).

Esta controvérsia ocorrida no peso dos animais ao nascimento, poderia ser explicada pela ocorrência de ninhadas no grupo nutrido (GNN), com pequeno número de

animais e com peso acima da média. Durante os experimentos constataram-se algumas ninhadas de até 16 filhotes para o Grupo GRA (desnutrido) enquanto que para os normonutridos o máximo foram 12 filhotes por ninhada. Evidentemente que, este fato contribuiu para uma média de peso menor para os filhotes das ratas submetidas à restrição alimentar. Outra hipótese também a ser considerada diz respeito ao horário de pesagem dos filhotes após o nascimento. Pode ter acontecido que alguns filhotes tenham sido pesados já devidamente amamentados, enquanto que outros foram pesados sem terem ainda sido amamentados. Este fato pode ter contribuído para promover uma diferença significativa nos pesos dos animais.

Observaram-se também diferenças significativas nos pesos médios de todos órgãos retirados e investigados, entre os grupos normonutridos e grupos submetidos à restrição alimentar. No exame destes órgãos, a única diferença observada foi em seu tamanho. Não foram detectadas outras diferenças macroscópicas, tais como áreas de fibrose ou esteatose hepática.

Portanto, o peso total e os pesos dos órgãos dos ratos que sofreram restrição alimentar apresentaram uma redução significativa quando comparados com os respectivos controles. No entanto, quando verificamos as proporções média dos pesos dos órgãos/ média dos pesos dos animais, dos dois grupos (Tabela 13), percebemos que elas são semelhantes. Observa-se que houve uma diminuição proporcional em todo no crescimento do animal.

Os dados obtidos sugerem que os animais do grupo GRA estavam cronicamente desnutridos, já que apresentaram uma redução linear de crescimento resultando em baixo peso para a sua idade. Estes achados se inserem dentro das características de desnutrição crônica, energético-protéica global, semelhante à forma *stunting* de desnutrição em humanos, quadro este que apresenta menor comprometimento do sistema imunológico (WOODWARD, 1998).

DANI (2001) define obstrução intestinal como uma síndrome gerada pelo bloqueio mecânico total ou parcial à progressão do conteúdo intestinal.

O quadro de obstrução intestinal situa-se entre as mais freqüentes e graves emergências abdominais. A fisiopatologia da obstrução intestinal envolve grandes alterações hemodinâmicas, desequilíbrio hidroeletrólítico importante e estado tóxico crítico. O encadeamento destas anormalidades pode evoluir para a translocação bacteriana, algumas vezes com um desfecho fatal (GALVÃO, 1978; BRASILEIRO-FILHO, 2000).

O fenômeno da translocação bacteriana intestinal tem sido largamente estudado em vários modelos experimentais empregando animais. O método mais utilizado para se avaliar translocação bacteriana do intestino para outros órgãos tem sido a cultura microbiana de órgãos e tecidos (WIEST & RALTH, 2003). Entretanto, trata-se de um método laborioso e que requer condições adequadas para o manuseio das amostras, já que freqüentemente ocorrem contaminações das mesmas. Portanto, com base em resultados anteriormente obtidos pelo nosso grupo de pesquisa optamos por utilizar nos estudos de translocação bacteriana um método mais simples e prático. Este método consiste no emprego da *E. coli* radiomarcada ( $^{99m}\text{Tc-E.coli}$ ) que mostrou ser reprodutivo, rápido, prático e não requer qualquer exigência de assepsia durante o manuseio dos órgãos (DINIZ, 1998; ANDRADE, 2004),

Os resultados obtidos neste estudo mostraram que os animais que sofreram a cirurgia para a promoção da obstrução intestinal apresentaram nível significativamente maior de  $^{99m}\text{Tc-E.coli}$  presente no sangue e nos órgãos investigados, quando comparados com os respectivos controles ("Sham" operados). Este fenômeno foi observado tanto nos animais normonutridos quanto naqueles que sofreram restrição alimentar. Estudos anteriores, realizados por SALVALAGGIO et al. (2001), mostraram que ratos que sofreram uma obstrução intestinal, provocada pela ligadura do íleo terminal, apresentaram translocação bacteriana. Os dados obtidos por estes pesquisadores mostraram a presença da *Escherichia coli* nos nódulos linfáticos mesentéricos, sangue e nos órgãos fígado, baço e pulmões.

Cumprе ressaltar que, na literatura está bem documentado que a obstrução intestinal promove um crescimento bacteriano exarcebado, dentro da luz intestinal, aumenta a permeabilidade da mucosa intestinal, acarretando a translocação de bactérias (BERG, 1995; WIEST & RATH, 2003). Portanto, os resultados obtidos neste trabalho como de outros pesquisadores mostram que o modelo experimental de obstrução intestinal promove a translocação de bactérias do intestino para tecidos estéreis.

A "Sham" cirurgia teve como finalidade provocar estresse cirúrgico em um grupo, para que fosse feita uma comparação de outros tipos de injúria com a injúria provocada pelo quadro de obstrução intestinal. Em qualquer cirurgia em que é aberta a cavidade abdominal, como no caso da "Sham" cirurgia, pode induzir-se um quadro de desidratação, perda de íons como potássio e cloro, culminando com distúrbios hidroeletrolíticos (BRASILEIRO-FILHO, 2000). Estes fatores podem levar ao íleo paralítico, quadro em que ocorre cessação temporária do trânsito intestinal (BRASILEIRO

FILHO, 2000).

SIMMY et al. (2001) demonstraram que pacientes, submetidos à manipulação de alças intestinais, apresentam alterações no intestino, a nível celular, com lesão dos enterócitos e a nível bioquímico. Estas alterações levam a um dano temporário e rapidamente reversível da barreira intestinal.

Além disto, a injeção ileal de <sup>99m</sup>Tc-*E. coli* (10<sup>8</sup> UFCi) poderia ocasionar um desequilíbrio na microbiota intestinal (SCHLEGEL et al, 2002; WIEST & RATH, 2003). Esses fatores justificariam a ocorrência da translocação bacteriana tanto para os animais normonutridos quanto para os desnutridos “Sham” operados.

Cabe aqui relatar que em estudo anterior realizado em nosso laboratório, ratos submetidos à administração por gavagem da <sup>99m</sup>Tc-*E. coli* (10<sup>8</sup> UFC), sem o estresse cirúrgico, não apresentaram translocação bacteriana para NLM e outros órgãos. A bactéria usada nesse estudo foi extraída da mesma colônia e marcada nas mesmas condições de nosso trabalho (DINIZ, 1998)

O presente trabalho teve como principal proposta avaliar o papel da desnutrição energético-protéica sobre a translocação bacteriana em ratos submetidos à obstrução intestinal. Neste contexto, esperava-se que os animais desnutridos pudessem apresentar as suas barreiras imunológicas comprometidas, proporcionando um acentuado processo de translocação de bactérias com disseminação pelos órgãos como fígado, baço, pulmões e sangue. Entretanto, isto não foi verificado neste trabalho já que os animais que sofreram restrição alimentar comportaram-se da mesma forma que os animais que foram alimentados *ad libitum*, ou seja, apesar das evidências de desnutrição nos ratos do grupo GRA estes não apresentaram níveis mais elevados de translocação bacteriana.

Os dados obtidos mostraram que a restrição energético-protéica imposta a esses animais não aumentou o nível de translocação bacteriana intestinal, nem em animais “Sham” operados e nem mesmo naqueles que foram submetidos à obstrução intestinal. O comportamento dos dois grupos, GNN e GRA foi o mesmo frente às injúrias propostas.

Uma hipótese que poderia ser considerada para justificar o comportamento similar entre os animais normonutridos e desnutridos frente à translocação bacteriana é que o tipo de restrição alimentar que foi utilizado pudesse atuar aumentando o nível de translocação bacteriana, caso fosse associado a outro modelo experimental, que não o modelo de obstrução intestinal. Resultados de estudos demonstram que um modelo específico de restrição alimentar imposto a um animal, poderá atuar sobre a translocação bacteriana, em um determinado modelo de injúria e não atuar em outro

modelo de injúria proposto (BARTON et al., 1991; KOSAKOVA et al., 2003; WIEST & RATH, 2003). BARTON et al. (1991), mostraram que a restrição dietética de ácidos graxos essenciais associado a injeção intraperitoneal de endotoxina bacteriana (LPS) aumentou a translocação bacteriana. No entanto, a mesma restrição de ácidos graxos essenciais quando associada ao uso de metronidazol não elevou o nível de translocação neste modelo.

Outra hipótese a ser cogitada é que a restrição energético-protéica imposta não tenha comprometido o sistema imunológico dos animais desnutridos. Os resultados obtidos em nosso estudo estão de acordo com trabalhos de autores que verificaram uma melhoria na imunidade mediada por células, em roedores submetidos à restrição calórica crônica (GOOD & LORENZ, 1992; CHANDRASEKAR et al., 1995; WOODWARD, 1998;).

Também estão amparados por estudos que mostram preservação de mecanismos de defesa das barreiras naturais em ratos desnutridos. Exemplo disto são os níveis normais de antioxidantes, tais como a glutatona, observados em ratos com restrição calórica crônica (OLIVEIRA & FUJIMORI, 1996). Sabe-se que a glutatona exerce um importante papel na manutenção da integridade das barreiras imunológicas, entre elas a barreira intestinal.

Os resultados obtidos por AMADI & ADENIYI (1994) e HUANG & FRAKER (2003), mostraram que ratos Wistar com deficiência protéica apresentavam proporção de linfócitos e neutrófilos dentro de limites normais. FILTEAU & HALL (1991) não observaram prejuízo na produção de citocinas de macrófagos em camundongos cronicamente desnutridos. KEUSH et al. (1978) e STAPLETON et al., não encontraram alteração na capacidade de fagocitose de macrófagos de camundongos desnutridos.

Estudos realizados em seres humanos com desnutrição energético-protéica crônica não mostraram comprometimento da resposta imunológica celular. MAFFEI (1983) e BARNESS (1993) são unânimes em afirmar que, nos quadros de marasmo em crianças, não são observadas alterações na transformação linfocítica. De forma análoga, RIVERA et al. (1986) e WOODWARD (1998) concluíram em estudos que desnutrição crônica, em humanos, não deprime a imunocompetência mediada por células.

SEDMAN et al. (1994) mostraram que pacientes desnutridos que se encontravam hospitalizados apresentavam atrofia intestinal. Entretanto, nem a desnutrição nem a atrofia intestinal se associavam a um aumento de translocação bacteriana intestinal.

A observação que ratos cronicamente desnutridos tiveram comportamento similar aos nutridos no que diz respeito à translocação bacteriana reforça a idéia de que uma redução calórica crônica, de moderada intensidade, balanceada, no modelo investigado não comprometeu as defesas imunitárias. Desta forma, pode-se considerar que o sistema imunológico dos ratos subnutridos estava atuante de modo a não propiciar um aumento da translocação da  $^{99m}\text{Tc-}E.coli$  para os tecidos investigados.



*“Se você puder chegar através da neve, da tempestade e da chuva, saberá que poderá chegar quando brilhar o sol e tudo estiver bem.”*

Malcom X