

Rosana das Graças Carvalho dos Santos

**A AÇÃO DA GLUTAMINA NO PROCESSO DE
TRANSLOCAÇÃO BACTERIANA EM MODELO
EXPERIMENTAL DE OBSTRUÇÃO INTESTINAL
EM CAMUNDONGOS**

Faculdade de Farmácia da UFMG
Belo Horizonte, MG
2007

Rosana das Graças Carvalho dos Santos

A AÇÃO DA GLUTAMINA NO PROCESSO DE TRANSLOCAÇÃO BACTERIANA EM MODELO EXPERIMENTAL DE OBSTRUÇÃO INTESTINAL EM CAMUNDONGOS

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

Orientador: Prof. Valbert Nascimento Cardoso

Co-orientador: Prof^a. Dr^a. Maria Isabel Toulson
Davisson Correia

Faculdade de Farmácia da UFMG
Belo Horizonte, MG
2007

Dedico este trabalho aos meus pais,
Pedro e Maria das Graças, que contribuíram
para que minha vontade se tornasse realidade.
E aos meus irmãos, Rita e Ricardo, que estiveram
comigo dividindo os momentos de alegria e dificuldades.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por mais essa etapa vencida.

Ao meu orientador, Valbert Nascimento Cardoso, pela confiança, atenção, incentivo e ensinamentos.

À minha co-orientadora, Prof^a Maria Isabel Toulson Davisson Correia, pela atenção, dedicação ao trabalho, ensinamentos e valiosas sugestões.

Aos professores Tasso Moraes e Santos e prof^a Elziria de Aguiar Nunan por disponibilizarem materiais e equipamentos de seus laboratórios.

À prof^a Simone Odília Diniz, pela atenção no laboratório.

À todos os colegas de laboratório, em especial, Iara, Dani e Luciene por disponibilizar tempo e atenção para ensinar as técnicas do laboratório.

Aos funcionários do biotério, Adelaide e Batista, que sempre estiveram disponíveis a ajudar.

Às minhas amigas e colegas de trabalho, Mirelle e Simone, que contribuíram em todas as etapas deste trabalho.

Aos meus pais e irmãos, que estiveram comigo para a concretização deste trabalho.

Ao meu namorado, Bruno, que me apoiou e incentivou em todos os momentos.

À AJINOMOTO do Brasil pelo fornecimento da glutamina.

À CAPES pelo apoio financeiro.

E a todos que de alguma maneira, contribuíram para a realização e conclusão deste trabalho.

“Se procurar bem você acaba encontrando.
Não a explicação, duvidosa, da vida,
Mas a poesia, inexplicável, da vida.”
(Carlos Drummond de Andrade)

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	9
LISTA DE FIGURAS	10
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	11
RESUMO	13
ABSTRACT	14
1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO DA LITERATURA	17
2.1 GLUTAMINA	17
2.1.1 Considerações Gerais	17
2.1.2 Metabolismo	18
2.1.3 Funções metabólicas da glutamina	21
2.1.4 Ação intestinal e imunológica da glutamina	23
2.2 TRANSLOCAÇÃO BACTERIANA	26
2.2.1 Considerações gerais	26
2.2.2 Mecanismos de translocação bacteriana	27
2.2.2.1 Alteração da microbiota intestinal	27
2.2.2.2 Alteração da resposta imunológica	29
2.2.2.3 Alteração da barreira intestinal e permeabilidade	31
2.2.2.3.1 Métodos de avaliação da permeabilidade intestinal	34
2.2.3 Glutamina e translocação bacteriana	35
2.3 OBSTRUÇÃO INTESTINAL	37
2.3.1 Considerações gerais	37
2.3.2 Fisiopatologia	37
2.3.3 Conseqüências sistêmicas da obstrução	39
2.4 BACTÉRIA MARCADA COM ISÓTOPO RADIOATIVO	41
3 OBJETIVOS	42
3.1 Objetivo Geral	42
3.2 Objetivos Específicos	42
4 MATERIAL E MÉTODOS	43
4.1 Animais	43
4.2 Dietas	43
4.2.1 Preparo das dietas	43
4.2.1.1 Ração controle com caseína	43
4.2.1.2 Ração especialmente modificada	44
4.2.1.3 Preparo da Glutamina	45
4.2.2 Composição em macronutrientes e calorias das rações preparadas ...	45
4.3 Preparação da bactéria	45
4.3.1 Procedimento de Marcação da Bactéria com ^{99m}Tecnécio	45
4.3.2 Estabilidade da marcação da ^{99m}Tc-<i>E. coli</i>	46
4.4 Tratamento dos Animais	46
4.5 Modelo experimental de obstrução intestinal	47
4.6 Estudo da translocação bacteriana	48
4.7 Percentual de inibição da translocação	48

4.8	Estudo da permeabilidade intestinal	48
4.9	Análise Estatística	49
5	RESULTADOS	50
5.1	Avaliação da ingestão e ganho de peso	50
5.2	Determinação do rendimento de marcação da bactéria com ^{99m} tecnécio (^{99m} Tc- <i>E. coli</i>)	51
5.3	Estabilidade de marcação da ^{99m} Tc- <i>E. coli</i>	51
5.4	Validação do modelo experimental e o efeito da glutamina no processo de translocação bacteriana	52
5.5	Inibição da translocação bacteriana pela glutamina	53
5.6	Validação do modelo experimental e o efeito da glutamina sobre a permeabilidade intestinal.....	53
6	DISCUSSÃO	55
7	CONCLUSÕES	61
8	PERPECTIVAS FUTURAS	62
9	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	63

LISTA DE TABELAS

1	Níveis de radioatividade presente na tireóide	52
2	Biodistribuição da ^{99m}Tc - <i>E.coli</i> (cpm/g) nos animais dos grupos <i>SHAM</i> , <i>OINT</i> e <i>GLUT</i>	52

LISTA DE FIGURAS

1	Estrutura química da glutamina	17
2	Interconversão glutamina – glutamato	18
3	Cinética da glutamina corporal obtida por isótopos estáveis em condições fisiológicas	19
4	Metabolismo da glutamina e glutamato	21
5	Mecanismos e componentes envolvidos no processo de translocação bacteriana	28
6	Fisiopatologia da obstrução intestinal	39
7	Ingestão média (g/dia) dos animais dos grupos experimentais	50
8	Ganho de peso médio (g/semana) dos animais dos grupos experimentais	51
9	Porcentagem de inibição da translocação bacteriana exercida pela glutamina em relação ao grupo OINT	53
10	Permeabilidade intestinal dos animais dos grupos <i>SHAM</i> , OINT e GLUT	54

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

^{99m}Tc	- 99m Tecnécio
^{99m}Tc - <i>E.coli</i>	- <i>Escherichia coli</i> marcada com tecnécio
ATP	- Adenosina trifosfato
BKG	- Background ou radiação de fundo
cpm	- Contagens por minuto
DTPA	- Ácido dietileno-triaminopentaacético
<i>E.coli</i>	- <i>Escherichia coli</i>
EROS	- Espécies reativas de oxigênio
GALT	- Tecido linfóide associado à mucosa gastrointestinal
GLN	- Glutamina
GSH	- Glutathiona reduzida
GSSG	- Glutathiona oxidada
H ⁺	- Íon hidrogênio
HCO ₃ ⁻	- Bicarbonato
Ig A	- Imunoglobulina A
IL	- Interleucina
L-NAME	- NG-nitro-L-arginina metil - ester
LPS	- lipopolissacarídeo
MBq	- Megabecquerel
MHC	- Complexo maior de histocompatibilidade
NaOH	- Hidróxido de sódio
NH ₃	- Amônia
NH ₄ ⁺	- Íon amônio
NLM	- Nódulo linfático mesentérico
NPT	- Nutrição parenteral total
OINT	- Obstrução intestinal
PEG	- polietilenoglicol
PMN	- Neutrófilo polimorfonucleares
slgA	- Imunoglobulina A secretória

SIRS	- Síndrome da resposta inflamatória sistêmica
SOD	- Superóxido dismutase
T CD4+	- Linfócitos T auxiliares
T CD8+	- Linfócitos T citotóxicos
TGF	- Fator de crescimento tumoral
Th	- T helper
UFC	- Unidade formadora de colônia

RESUMO

A glutamina é aminoácido essencial em situações de injúria, nas quais a disfunção da barreira intestinal predispõe ao aumento da permeabilidade do intestino e promove a translocação bacteriana. O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos da glutamina na translocação bacteriana e na permeabilidade intestinal. Para estudo da translocação bacteriana, 21 camundongos machos Swiss foram divididos aleatoriamente em três grupos: grupo glutamina (GLUT), grupo *sham* e grupo obstruído (OINT). O grupo GLUT recebeu solução de glutamina ($500\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$), por gavagem, e ração especial. Os demais grupos receberam ração adicionada de caseína a fim de manter as dietas isocalóricas e isoprotéicas. O tratamento foi realizado durante 7 dias antes da operação. No oitavo dia, os animais receberam 10^8 UFC/mL of *E. coli* marcada com $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ($^{99\text{m}}\text{Tc-E.coli}$). Após 90 minutos da administração, os animais foram anestesiados e submetidos à ligadura do íleo terminal. O grupo *sham* sofreu apenas laparotomia mediana. Dezoito horas após a operação, os animais foram anestesiados para coleta do sangue e os órgãos foram removidos para a determinação da radioatividade. A permeabilidade intestinal foi avaliada em outro grupo de 45 animais divididos conforme descrição acima e recebendo o mesmo tipo de tratamento e procedimento cirúrgico. Após 7 dias, os animais receberam 0,1 mL de ácido dietilenotriaminopentaacético (DTPA) marcado com $^{99\text{m}}\text{Tc}$ por gavagem e, decorridos 90 minutos, foram submetidos à operação. Nos tempos de 4, 8 e 18 horas, os animais foram anestesiados para a coleta do sangue e determinação da radioatividade. Para cada tempo investigado foram utilizados cinco animais. Para análise estatística foram utilizados os testes t, Kruskal-Wallis e ANOVA. Os animais do grupo glutamina apresentaram ingestão e ganho de peso menor que os demais grupos avaliados ($p<0,05$). O nível de translocação bacteriana e permeabilidade intestinal foi maior no grupo OINT do que nos demais grupos ($p<0,05$). A glutamina reduziu a translocação bacteriana e a permeabilidade intestinal para níveis fisiológicos quando comparados com o grupo OINT ($p<0,05$). Os resultados obtidos sugerem que a glutamina reduz a permeabilidade intestinal e, conseqüentemente, a translocação bacteriana.

Unitermos: glutamina, obstrução intestinal, translocação bacteriana, permeabilidade intestinal, $^{99\text{m}}\text{Tc}$.

ABSTRACT

Glutamine is an essential amino acid in injury situations, when an intestinal barrier dysfunction predisposes to increase of the mucosal permeability and promote bacterial translocation. The aim of this study was to evaluate the effect of glutamine on bacterial translocation and intestinal permeability. Swiss male mice (21) were randomly divided into three groups to bacterial translocation studies: glutamine group (GLUT), *sham* group and intestinal obstruction group (OINT). The glutamine animals received glutamine solution ($500\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$) by gavage for seven days before surgery and received a specially prepared chow. The other groups received a chow added of casein to keep it isocaloric and isoproteic. On the 8th day, the animals received 10^8 CFU/mL of *E. coli* labeled with $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ($^{99\text{m}}\text{Tc}-E.coli$). After 90 min of administration the animals were anesthetized and the terminal ileum was isolated and ligated. The *sham* group underwent laparotomy only. Eighteen hours after, the animals were anesthetized to the blood collect and the organs were removed for radioactivity determination. Intestinal permeability was evaluated in another group of 45 animals, divided into similar groups and receiving the same treatment and surgical procedure described above. After seven days, all mice received by gavage 0.1 mL of diethylenetriamine pentaacetate (DTPA) labeled with $^{99\text{m}}\text{Tc}$. After 90 min, the animals were submitted to surgical procedure. 4, 8 and 18h after, the animals were anesthetized and the blood collected for radioactivity determination. Five animals were used for each period investigated. Statistical analyses were performed using the test of Kruskal-Wallis, ANOVA and the t test. The animals in the glutamine group presented with decreased chow intake and weight gain. The level of bacterial translocation and intestinal permeability was higher in the OINT group than in the other groups ($p<0.05$). Glutamine supplementation reduced the bacterial translocation and the intestinal permeability to physiologic levels when compared with the OINT group ($p<0.05$). The results obtained suggest that the glutamine reduces the intestinal permeability and, consequently, the bacterial translocation.

Key Words: glutamine, intestinal obstruction, bacterial translocation, intestinal permeability, $^{99\text{m}}\text{Tc}$.

1 INTRODUÇÃO

Dietas especializadas contendo nutrientes imunomoduladores, como a glutamina, têm mostrado efeitos benéficos na diminuição da incidência de complicações sépticas. Esses efeitos são resultantes da possibilidade de modulação de funções metabólicas, imunológicas e inflamatórias (CHIOLERO and BERGER, 2002; MACFIE and McNAUGHT, 2002).

A glutamina, tradicionalmente considerada aminoácido não essencial, é o aminoácido mais abundante no plasma e músculo esquelético de indivíduos saudáveis. No entanto, em situações de injúria, se torna nutriente condicionalmente essencial (THOMAS *et al.*, 2005). É a fonte preferencial de combustível para enterócitos, linfócitos e macrófagos, melhorando a resposta imunológica e a função da barreira intestinal, com conseqüente redução da translocação bacteriana. Participa também do equilíbrio ácido-básico e é precursor para a glutatona (MACFIE, 2000; MELIS *et al.*, 2004; GARCIA-DE-LORENZO *et al.*, 2003).

A ação da glutamina na proteção da barreira intestinal pode ser exercida pelo aumento da glutatona, que age como varredora das espécies reativas de oxigênio, diminuindo assim a formação de radicais livres. Além disso, o balanço oxidante-antioxidante leva à expressão de genes envolvidos na resposta pró-inflamatória (FILLMANN *et al.*, 2007).

Diminuição na concentração de glutamina circulante em estados catabólicos contribui para quebra na barreira da mucosa intestinal e possível translocação bacteriana, com desenvolvimento de sepse e falência múltipla dos órgãos (HWANG *et al.*, 2003; GATT *et al.*, 2007).

A translocação bacteriana é um processo definido como a passagem de bactérias viáveis e não viáveis, bem como seus produtos, do lúmen intestinal para linfonodos mesentéricos, corrente sanguínea e órgãos distantes, como fígado e baço. O trato gastrointestinal é potencialmente a fonte mais importante da translocação bacteriana. Geralmente, bactérias Gram-negativas facultativas translocam mais facilmente do que bactérias anaeróbicas e gram-positivas. (NAABER *et al.*, 2000; WIEST & RATH, 2003; CHIN *et al.*, 2007).

A prevalência da translocação bacteriana em humanos é de 15% e os fatores que promovem o processo são o crescimento bacteriano exagerado, imunossupressão, alteração da barreira intestinal, atrofia da mucosa e/ou aumento da permeabilidade. Na

clínica, a translocação está associada a traumas diversos, uso de alimentação intravenosa por longo período de tempo, obstrução intestinal e isquemia intestinal. Em pacientes operados, a translocação aumenta a incidência de morbidade por sepse (NAABER *et al.*, 2000; MACFIE, 2000; WOODCOCK *et al.*, 2001; DING and LI, 2003; MACFIE, 2006).

A obstrução intestinal é caracterizada pela parada do trânsito intestinal e tem como distúrbios fisiopatológicos básicos, a estase do conteúdo entérico, a distensão do intestino e a isquemia da parede intestinal. Esses fenômenos, em conjunto, resultam no seqüestro de água e eletrólitos, distúrbio do equilíbrio ácido-básico, proliferação bacteriana e aumento da pressão intraluminal, levando a quadro clínico de dor, náuseas, vômitos, obstipação, distensão, desidratação, febre e dispnéia (BRESCHIA, 2002; MOREIRA *et al.*, 2005).

CHANG *et al.* (2001) avaliando o efeito da glutamina em animais com obstrução intestinal, observaram que os animais tratados com este aminoácido apresentaram menor taxa de distensão intestinal e redução de acúmulo de líquidos no seguimento obstruído.

Nesse contexto, a proposta deste trabalho foi avaliar a suplementação da glutamina (500mg/kg/dia), durante 7 dias antes da promoção da obstrução intestinal, na translocação bacteriana e na permeabilidade intestinal de camundongos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 GLUTAMINA

2.1.1 Considerações Gerais

Glutamina é um L- α -aminoácido neutro, também conhecido como ácido 2-aminoglutarâmico. Este aminoácido possui cinco átomos de carbono e dois de nitrogênio (Figura 1) constituindo 30% a 35% dos aminoácidos no sistema circulatório, com papel fundamental no transporte de nitrogênio entre os órgãos (COSTER *et al.*, 2003).

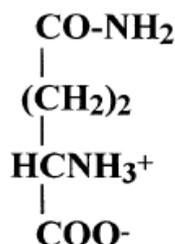


Figura 1: Estrutura química da glutamina (TAPIERO *et al.*, 2002).

É o aminoácido mais abundante no plasma dos mamíferos e é ativamente transportado e metabolizado em quase todos os tecidos. Sua fonte primária é o músculo esquelético, sendo liberado na corrente sanguínea e transportado para uma variedade de tecidos (CURI *et al.*, 2005; XU *et al.*, 2006). Como a glutamina pode ser sintetizada *de novo* é classificada como aminoácido não essencial. No entanto, apesar do organismo ter grande reserva de glutamina e poder sintetizá-la em grande quantidade, estados catabólicos como trauma e sepse são caracterizados por maior taxa de consumo deste nutriente, o que excede sua produção máxima. Sendo assim, o termo aminoácido condicionalmente essencial é o mais apropriado para designar a glutamina (LABOW and SOUBA, 2000; ZIEGLER *et al.*, 2003; OGUZ *et al.*, 2007).

Vários tecidos e células no organismo utilizam a glutamina em alta taxa. Entre eles incluem-se o intestino, os rins, o fígado, os neurônios no sistema nervoso central, as células hematopoiéticas e do sistema imunológico e células β - pancreáticas (NEWSHOLME *et al.*, 2003; IWASHITA *et al.*, 2005). Sob condições fisiológicas e em

estado pós-operatório, o intestino delgado é o principal órgão consumidor de glutamina. Metabolicamente, a mucosa do intestino delgado é caracterizada por alto consumo de glutamina, que serve como fonte metabólica para os enterócitos e é fator principal para a manutenção da função e da integridade da mucosa intestinal (PLAETH *et al.*, 1999; POWELL-TUCK, 2007).

2.1.2 Metabolismo

A biossíntese de glutamina a partir do glutamato e da amônia é catalisada pela glutamina sintetase numa reação dependente do trifosfato de adenosina (ATP) (Figura 2) (WATFORD *et al.*, 2002).

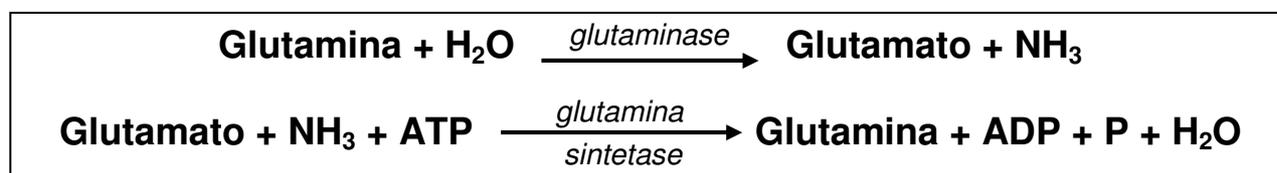


Figura 2: Interconversão glutamina-glutamato (WATFORD *et al.*, 2002)

O metabolismo da glutamina pode ser modulado pela atividade de duas principais enzimas, a glutaminase e a glutamina sintetase. O fígado expressa ambas enzimas e tem papel principal na homeostase da glutamina, podendo adicionar ou remover a mesma da circulação. Músculos e pulmões são capazes de produzir quantidades significativas deste aminoácido devido à alta expressão da glutamina sintetase. Entretanto, órgãos que são ávidos por este aminoácido, como rins e pulmões, têm alta atividade da enzima glutaminase (WATFORD *et al.*, 2002; COSTER *et al.*, 2003).

A glutamina é liberada pelos músculos e pulmões. O tecido muscular é o maior sítio de síntese de glutamina no organismo e contém mais de 90% do “pool” de glutamina corporal (Figura 3). A liberação de glutamina a partir dos músculos esqueléticos é estimulada durante condições de estresse como operações e queimaduras, o mesmo ocorre nos pulmões (NEWSHOLME *et al.*, 2003). Embora os pulmões não tenham a massa tecidual ou o conteúdo de proteína dos músculos, ainda

contém concentrações equivalentes da enzima glutamina sintetase (LABOW and SOUBA, 2000).

A concentração de glutamina nas células musculares é de aproximadamente 25 mmol/L enquanto que os níveis plasmáticos alcançam apenas 650µmol/L. Esta concentração está relacionada com a saturação do sódio (Na⁺) e o mecanismo de co-transporte. Em situações de estresse metabólico, as concentrações no plasma e intramusculares caem para aproximadamente 300 a 500µmol/L e 15 mmol/L respectivamente (POWELL-TUCK, 2007).

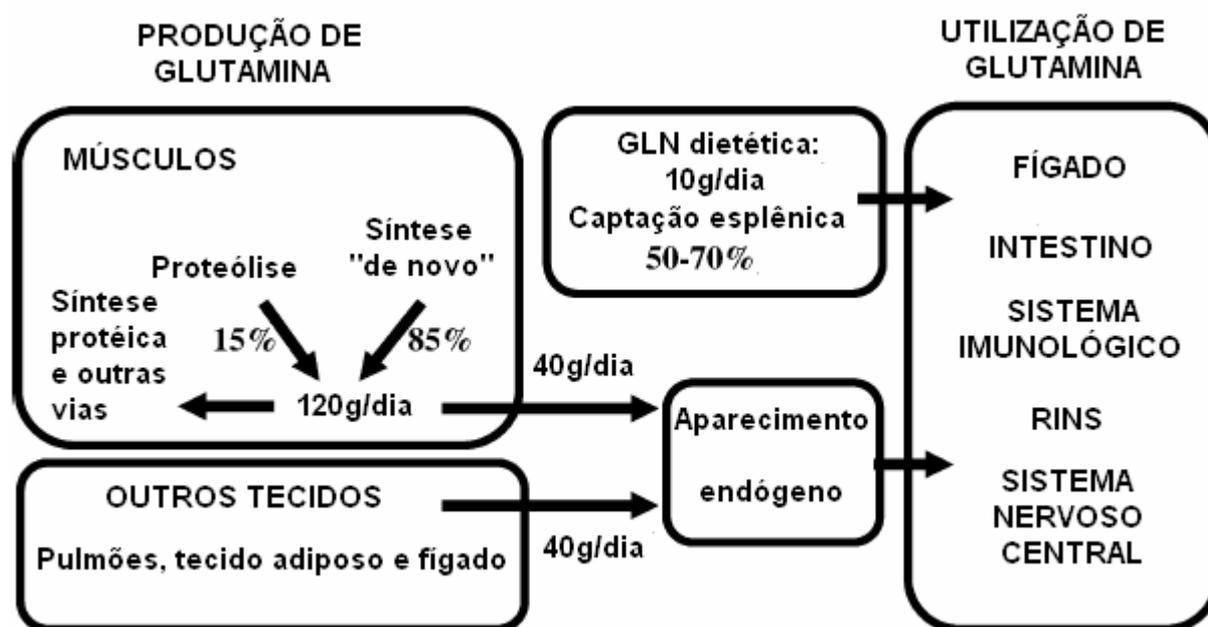


Figura 3: Cinética da glutamina corporal obtida por isótopos estáveis em condições fisiológicas. GLN: glutamina (BIOLO *et al.*, 2005).

O glutamato é sintetizado pela transaminação de aminoácidos de cadeia ramificada como leucina, isoleucina e valina, que são descarboxilados nos músculos esqueléticos (Figura 4). Nesta reação, o aminoácido de cadeia ramificada reage com α -cetoglutarato para produzir α -cetoácidos e glutamato pela enzima aminotransferase (VARY and LYNCH, 2004; BIOLO *et al.*, 2005).

O glutamato é também precursor da síntese de ornitina em macrófagos e monócitos, o que o conecta com o ciclo da uréia e resulta na formação de arginina, substrato para a enzima óxido nítrico sintase (NEWSHOLME *et al.*, 2003).

Em condições fisiológicas, os sistemas de transporte mantêm extenso gradiente transmembrana, mantendo a concentração intracelular de glutamina em 25 a 30 vezes superior à concentração extracelular. Não há um transportador que seja absolutamente específico para a glutamina e, em cada caso, este aminoácido é apenas um dos quais são reconhecidos por um transportador em particular. Geralmente, a especificidade do transportador, em particular, é caracterizada pela competição entre a captação de glutamina e outros aminoácidos (BODE, 2001; McGIVAN and BUNGARD, 2007).

O transporte pode ser sódio dependente (sistema ASC ou B^0 , $B^{0,+}$ y^+L , A e N) ou independente (sistema L, $b^{0,+}$ e n). No primeiro, o gradiente eletroquímico é mantido pela bomba de sódio/potássio ATPase, conduzindo o aminoácido contra o gradiente de concentração por meio dos transportadores sódio dependentes. Dessa forma, mantém-se assim os níveis citoplasmáticos de aminoácidos acima do equilíbrio transmembrana (BODE, 2001; NEWSHOLME *et al.*, 2003; BILOLO *et al.*, 2005).

O L-glutamato, presente dentro da célula, não pode atravessar a membrana devido à sua carga líquida de -1 no pH de 7,4 e à baixa disponibilidade de transportadores na membrana plasmática (NEWSHOLME *et al.*, 2003).

Após injúria, a oxidação de aminoácidos de cadeia ramificada é acelerada no músculo esquelético, ocorrendo aumento na expressão e atividade da enzima glutamina sintetase. No entanto, a taxa de liberação de glutamina excede a de síntese, resultando em depleção do “pool” intracelular deste aminoácido (MOSKOVITZ *et al.*, 1994; TAPIERO *et al.*, 2002).

O metabolismo de glutamina nos rins é essencial para o controle ácido-básico do plasma, e combate à acidose pela produção de amônia (NH_3) urinária. A amônia é obtida pela quebra da glutamina em glutamato. A NH_3 é exportada do lúmen do tubo coletor e combina-se com o H^+ para formar o íon amônio (NH_4^+) que é perdido na urina. O H^+ é obtido do ácido carbônico que se dissocia e forma bicarbonato (HCO_3^-) e H^+ . O HCO_3^- entra na circulação e mantém o pH sanguíneo (NEWSHOLME *et al.*, 2003; McGIVAN and BUNGARD, 2007).

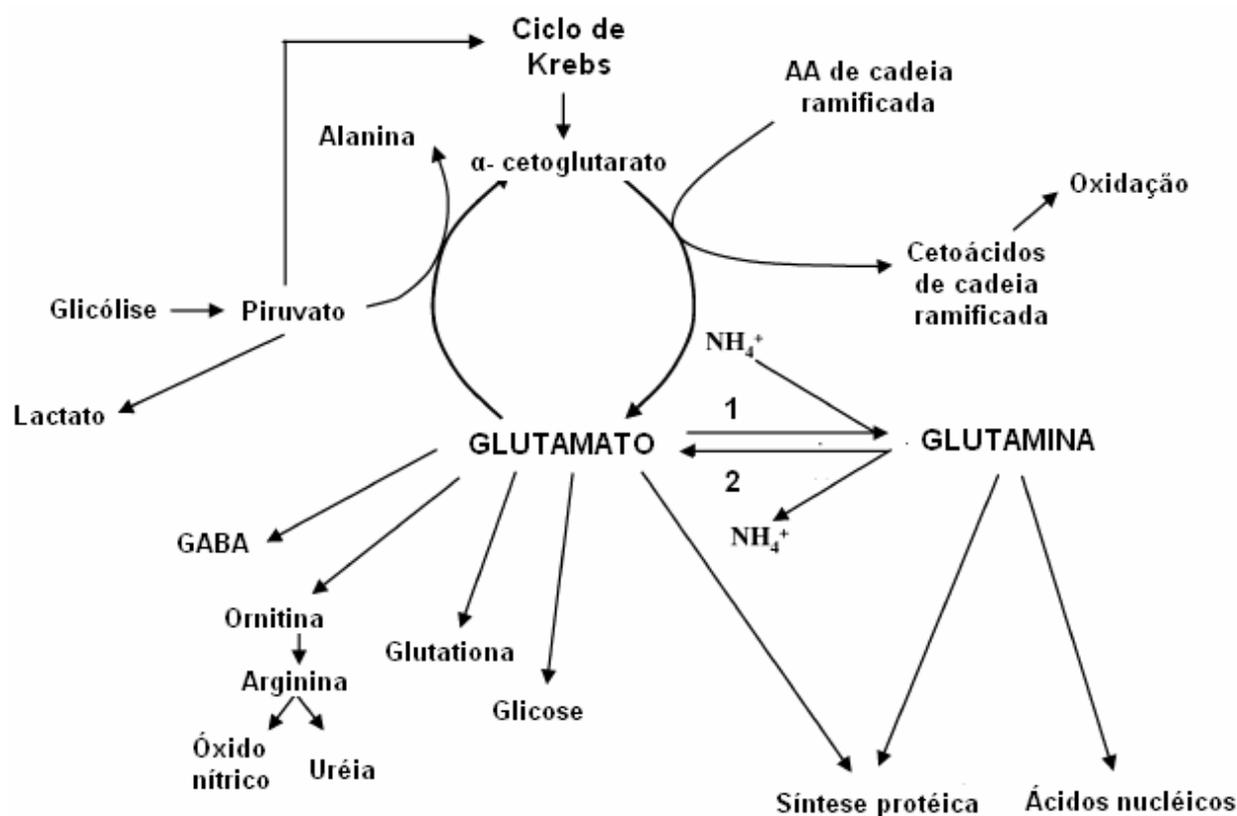


Figura 4: Metabolismo da glutamina e glutamato. AA: aminoácido; GABA: ácido gama aminobutírico; 1: glutamina sintetase; 2: glutaminase (BIOLO *et al.*, 2005).

No intestino a glutamina serve como substrato energético e é convertida em amônia e glutamato que são liberados na veia porta e extraídos pelo fígado antes de alcançar a circulação sistêmica (LABOW and SOUBA, 2000; NOSE *et al.*, 2002).

2.1.3 Funções metabólicas da glutamina

A glutamina age como carreadora de nitrogênio para vários órgãos e células. Tem papel fundamental na promoção e na manutenção da função dos rins, intestino, fígado, coração, neurônios e células do sistema imunológico (CONEJERO *et al.*, 2002; LIMA *et al.*, 2002; KHOGALI *et al.*, 2002; MATES *et al.*, 2002). É importante como precursora da síntese de peptídeos, proteínas, nucleotídeos e ácidos nucleicos, e também é fonte de carbono para a oxidação em várias células (NEWSHOLME *et al.*, 2003; XU *et al.*, 2006). Atua no transporte de nitrogênio, como metabólito intermediário e como fonte de energia, exercendo função antioxidante por meio da glutathiona (LABOW and SOUBA, 2000).

Aproximadamente um terço do nitrogênio derivado do metabolismo da proteína é transportado na forma de glutamina, o que provê uma maneira não tóxica de transportar amônia dos tecidos periféricos para as vísceras. Após atingir o órgão alvo, a amônia pode ser regenerada para formação de uréia. O fígado tem a função principal de manter a homeostase da amônia no organismo e os rins em manter o equilíbrio ácido-base (BIOLO *et al.*, 2005; LABOW and SOUBA, 2000).

A glutamina tem importante papel na gliconeogênese, no fígado e nos rins. Embora a gliconeogênese a partir da glutamina ocorra principalmente nos rins, a conversão da alanina está limitada ao fígado. A gliconeogênese renal contribui em 20% a 25% da produção de glicose total do organismo. Em estados pós-absortivos a glutamina é importante precursora de glicose e contribui na adição de um novo carbono para formar glicose, sendo, portanto, a ligação entre o metabolismo de carboidratos e de proteínas (YONG and AJAMI, 2001; TAPIERO *et al.*, 2002; CURI *et al.*, 2005; CURI *et al.*, 2007).

A função antioxidante da glutamina é exercida pela glutathiona, formada por glutamina, cisteína e glicina, podendo se apresentar no estado oxidado (GSSG) ou reduzido (GSH). O conteúdo de glutathiona na mucosa intestinal pode diminuir em casos de doença inflamatória do intestino ou após período de restrição protéica, ocasionando depleção da GSH na mucosa e favorecendo o estresse oxidativo (TOWNSEND *et al.*, 2003; MELIS *et al.*, 2004; BELMONTE *et al.*, 2007; POWELL-TUCK, 2007).

A glutathiona é capaz de contrabalançar a injúria oxidativa causada pelas espécies reativas de oxigênio (EROS), que são importantes mediadores da inflamação e responsáveis pelo aumento da permeabilidade intestinal, depleção do ATP intracelular e inibição da troca de sódio/potássio. O aumento do estresse oxidativo é a maior causa de danos teciduais e pode levar ao desenvolvimento de falência múltipla dos órgãos (FLARING *et al.*, 2005; WESTMAN *et al.*, 2006; POWELL-TUCK, 2007).

Após trauma cirúrgico, a concentração fisiológica de glutathiona no músculo esquelético diminui, o que pode indicar estresse oxidativo com potente injúria tecidual. No entanto, FLARING *et al.* (2003) observaram que pacientes com suplementação de 0,5g/kg/dia de glutamina, sete dias antes de operação abdominal, não apresentaram diminuição significativa na glutathiona total e reduzida.

2.1.4 Ação intestinal e imunológica da glutamina

A mucosa intestinal dos mamíferos é o tecido corporal de mais rápida replicação. A renovação (*turnover*) das células epiteliais do intestino (proliferação, migração, diferenciação e apoptose) e dos constituintes da barreira intestinal são processos dinâmicos afetados pelo estado nutricional e, pela adequação de nutrientes específicos da dieta (ZIEGLER *et al.*, 2003).

A glutamina é reconhecida como importante componente dietético e atua como agente trófico para enterócitos, mantém a integridade da mucosa e, conseqüentemente, reduz a possibilidade de quebra da barreira intestinal (MACFIE and McNAUGHT, 2002).

Em situações de estresse a utilização de glutamina pelas células intestinais aumenta significativamente, devido ao estresse oxidativo e à depressão das defesas imunológicas (XU *et al.*, 2006; KUMAR *et al.*, 2007).

A suplementação de glutamina em nutrição enteral e parenteral melhora o crescimento, o reparo, a função da mucosa intestinal e o balanço nitrogenado em casos de atrofia intestinal e injúria em animais (ZIEGLER *et al.*, 2000).

Durante o estado de morbidade o intestino é o órgão alvo da injúria, que se manifesta pela alteração da função das células intestinais e aumento da permeabilidade, seguido de hipóxia, estresse oxidativo e exposição a citocinas (WISCHMEYER, 2006).

OGUZ *et al.* (2007) demonstraram em estudo clínico randomizado, que a suplementação parenteral de glutamina diminuiu a incidência de infecção pós-operatória e de abscesso intra-abdominal.

Segundo WISCHMEYER (2006), a terapia ideal para prevenir a injúria e a subsequente síndrome da resposta inflamatória sistêmica (SIRS), deve ser aquela que atenua a elaboração de mediadores pró-inflamatórios pelas células do sistema imunológico associada ao intestino. Sendo assim, a imunonutrição tem papel fundamental na terapia nutricional, por influenciar na resposta imunológica.

A glutamina é conhecida por modular a função imunológica celular e a produção de citocinas. Desta forma, deficiência de glutamina em estados críticos está associada com resposta imunológica prejudicada e aumento da susceptibilidade à infecção. Isso ocorre em função da utilização da glutamina, em altas taxas, por células isoladas do sistema imunológico como os macrófagos, os linfócitos e os neutrófilos (ANDREWS and GRIFFITHS, 2002; MACFIE, 2004a; CURI *et al.*, 2007).

A ativação dos macrófagos, *in vivo* ou *in vitro* leva ao aumento significativo da utilização de glutamina (NEWSHOLME, 2001; GOEL and GANGOLLY, 2007). O fornecimento de glutamina exógena para animais ou humanos infectados ou estressados pode elevar a concentração plasmática ao nível fisiológico e melhorar a resposta imunológica (NEWSHOLME, 2001).

Fatores inflamatórios, como citocinas, leucotrienos e catecolaminas contribuem para a resposta ao catabolismo (TAPIERO *et al.*, 2002). Células estimuladas por moléculas pró-inflamatórias amplificam a elaboração de outras citocinas e o efeito combinado resulta em aumento da permeabilidade intestinal (FINK, 2003).

A permeabilidade intestinal após injúria é a causa potencial de mediadores pró-inflamatórios sistêmicos, que pode contribuir para a patogênese da síndrome da resposta inflamatória sistêmica (VELASCO *et al.*, 2001).

O intestino, além de ser importante na absorção de nutrientes, age também na defesa do organismo. A superfície do enterócito funciona como um sensor do micro ambiente luminal. Secreta quimiocinas e citocinas que alertam e direcionam a resposta imunológica para o local da infecção (RESCIGNO *et al.*, 2001). Aproximadamente um quarto da mucosa intestinal é tecido linfóide. O tecido linfóide associado ao intestino (GALT) é formado por quatro componentes: os linfócitos intra-epiteliais, as células linfóides da lâmina própria, as placas de Peyer e o linfonodo mesentérico. As funções do GALT estão associadas a características peculiares, representando em torno de 50% do total da imunidade corporal e produzindo a maior parte das imunoglobulinas na forma de IgA. Esta é a principal componente da imunidade específica contra a invasão de patógenos (MELIS *et al.*, 2004).

O GALT é o principal contribuinte para a proteção imunológica primária da mucosa. A gênese para a imunidade da mucosa está na placa de Peyer, que processa antígenos intraluminais e estimula as células B e T a esses antígenos. As placas de Peyer são agregados linfóides especializados. Os linfócitos são sensibilizados dentro das placas de Peyer proliferam no linfonodo mesentérico e migram, via ducto torácico, para a lâmina própria de vários sítios na mucosa onde é produzida a IgA secretória. LAI *et al.*, 2004 mostraram que a suplementação de glutamina aumenta a IgA secretória e a proliferação dos linfócitos totais no GALT após ligação e punção cecal.

IKEDA *et al.* (2003) investigaram a capacidade funcional e a exudação de neutrófilos polimorfonucleares (PMNs) e macrófagos na cavidade peritoneal em resposta ao estímulo inflamatório, em ratos suplementados com GLN na nutrição parenteral total (NPT). Observaram que a glutamina aumenta a funcionalidade do

GALT e atenua a resposta inflamatória na cavidade peritoneal, visto que, em relação ao grupo alimentado com glutamina, o grupo sem suplementação apresentou menor exudação de PMNs e macrófagos. Estes são importantes na eliminação de bactérias no estágio precoce da infecção peritoneal.

2.2 TRANSLOCAÇÃO BACTERIANA

2.2.1 Considerações gerais

A translocação bacteriana é a passagem de bactérias viáveis e não viáveis, assim como endotoxinas, do lúmen intestinal, através do epitélio da mucosa, para os nódulos linfáticos mesentéricos e outros órgãos e tecidos normalmente sem bactérias (WIEST & RATH, 2003; MACFIE, 2004b; REDDY *et al.*, 2006).

O processo de translocação envolve o contato inicial da bactéria com a parede intestinal, que pode levar à produção de citocinas e, subsequente resposta inflamatória. Uma vez que a bactéria penetra na mucosa, ela pode ser transportada a órgãos distantes por meio da circulação sistêmica (SAMIR *et al.*, 2004).

A translocação bacteriana está aumentada em pacientes com obstrução intestinal, isquemia/reperfusão, câncer intestinal ou doença inflamatória do intestino. Além disso, pacientes imunossuprimidos, com desnutrição ou em uso de nutrição parenteral prolongada e alcoolistas com cirrose também apresentam risco aumentado de translocação bacteriana (BERG, 2001; De-SOUZA and GREENE, 2005; GATT *et al.*, 2007). A translocação está associada ao risco aumentado de sepse, suportando a hipótese do intestino como o causador da mesma. Esta hipótese propõe que a bactéria, que normalmente reside dentro do lúmen intestinal, possa translocar pela barreira do epitélio intestinal e atuar como propagadora da sepse aos sítios distantes (MACFIE *et al.*, 1999; MACFIE, 2000; REDDY *et al.*, 2006).

A prevalência de translocação em humanos é de 15% em pacientes submetidos a operação eletiva. Apesar da evidência de que a translocação está associada com o aumento da incidência de complicações sépticas, essa não se relaciona com a mortalidade (MACFIE, 2000; MACFIE, 2004b; MACFIE, 2006).

Vários métodos, diretos e indiretos, têm sido usados para avaliar a translocação bacteriana. Entre os métodos diretos, tem-se a contagem de unidades formadoras de colônias (UFC) por cultura dos nódulos linfáticos mesentéricos (MLNs) e outros órgãos e a contagem da radioatividade pelo processo de marcação da bactéria. O uso da radioatividade para detecção da translocação bacteriana é o método mais sensível uma vez que a translocação pode ocorrer mesmo se a cultura de MLNs falhar em identificar algum microorganismo. Isto ocorre porque a maioria das bactérias que rompem a barreira epitelial é morta pelo GALT e, portanto não identificadas em meios de cultura (WIEST, 2004; BALZAN *et al.*, 2007). Segundo WHITE *et al.* (2006), menos de 0,1% da

Escherichia coli marcada encontrada nos nódulos linfáticos mesentéricos corresponde à bactéria viável.

As secreções pancreáticas, a bile e o ácido gástrico impedem a colonização do estômago e da parte proximal do intestino delgado pela maioria das bactérias. No entanto, a proporção de bactéria na porção distal do intestino delgado está aumentada. No intestino grosso é de aproximadamente 10^{11} a 10^{12} bactérias/ grama de conteúdo colônico, o que contribui em 60% da massa fecal. A microbiota do intestino grosso é a mais densa e complexa. As bactérias viáveis são, em sua maior parte (99%), representadas por bactérias anaeróbicas e as espécies mais comuns são do gênero das *Bacteróides*, *Peptostreptococcus*, *Bifidobacterium*, *Clostridium*, *Lactobacillus*, *Eubacterium* e *Fusobacterium* (WIEST & RATH, 2003; O'HARA & SHANAHAN, 2006).

Estudos experimentais têm mostrado que a translocação bacteriana pode ocorrer pela via paracelular ou transcelular (MACFIE, 2000). No entanto, sob condições fisiológicas, uma série de mecanismos de proteção, local e sistêmica, previne a passagem de bactérias para além do lúmen intestinal (XING *et al.*, 2005).

2.2.2 Mecanismos de translocação bacteriana

Os mecanismos relacionados com a translocação bacteriana envolvem: alteração da microbiota gastrointestinal, o que acarreta em crescimento bacteriano exagerado; alteração da resposta imunológica e rompimento físico da barreira da mucosa intestinal, pela injúria direta aos enterócitos ou redução do fluxo sanguíneo ao intestino; (Figura 5) (BERG, 1995; WIEST & RATH, 2003).

2.2.2.1 Alteração da microbiota intestinal

O trato gastrointestinal contém grande variedade de bactérias aeróbicas e anaeróbicas. A parte superior do intestino e o estômago, em geral, contém população escassa de bactérias não virulentas, devido ao ambiente luminal que é hostil e à atividade motora propulsiva que dificulta a colonização estável. As mais comuns são as bactérias Gram-positivas e aeróbicas. No entanto, no íleo distal, as bactérias gram-negativas excedem as gram-positivas (MACFIE *et al.*, 1999; BALZAN *et al.*, 2007).

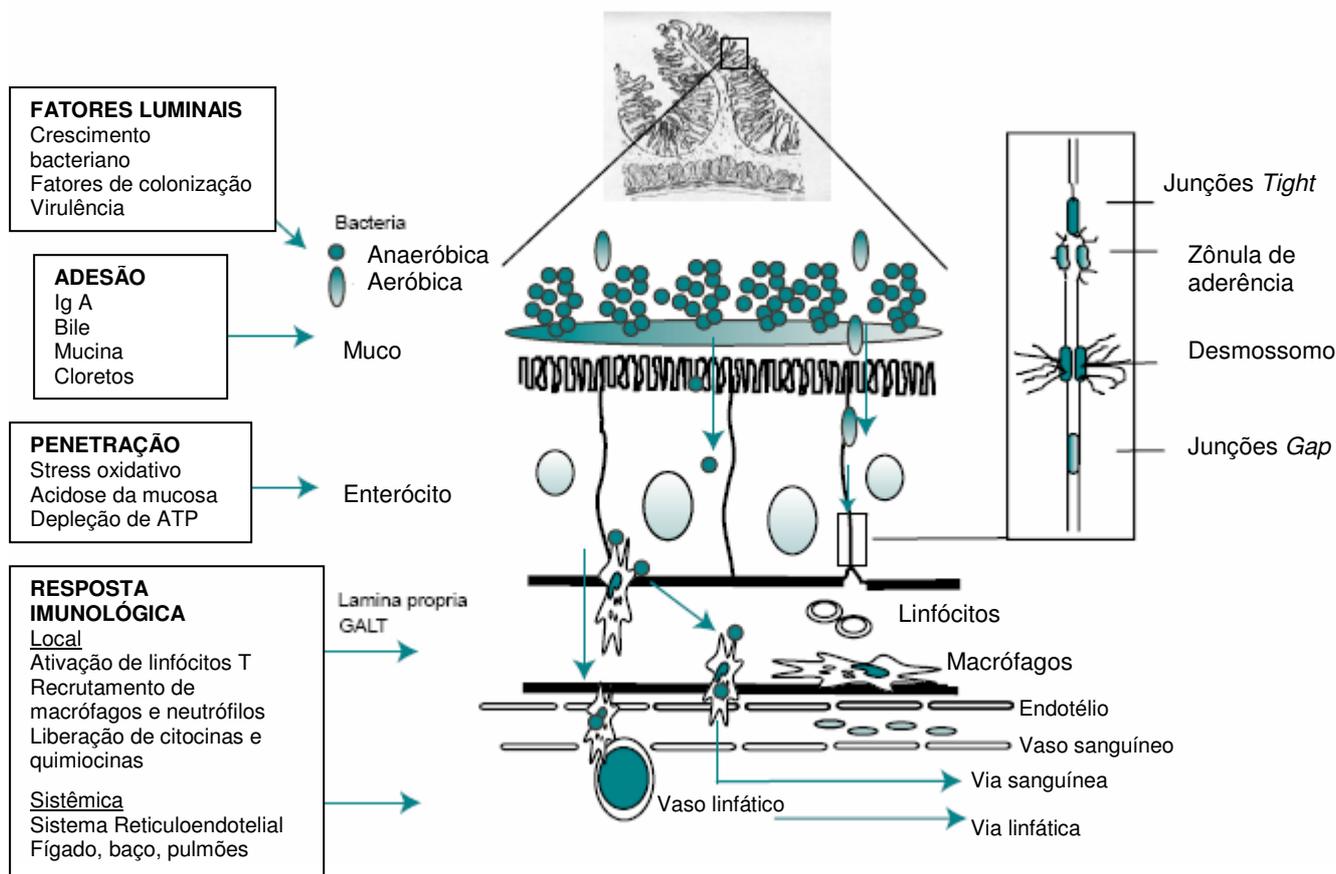


Figura 5: Mecanismos e componentes envolvidos no processo de translocação bacteriana (WIEST & RATH, 2003).

A barreira intestinal possui vasta população de bactérias nativas, presente na parte inferior do intestino saudável, não causando dano. Essa microbiota nativa é importante na prevenção da colonização por bactérias patogênicas exógenas, por influenciar no desenvolvimento de componentes humorais no sistema imunológico do intestino e modular o perfil de citocinas Th1 ou Th2. O rompimento da microbiota fisiológica pode predispor à quebra na resistência à colonização (O'HARA & SHANAHAN, 2006; BALZAN *et al.*, 2007). Normalmente, estas bactérias são mortas pelo sistema reticuloendotelial do hospedeiro *in situ* ou quando estão a caminho dos órgãos linfóides. Sendo assim, o linfonodo mesentérico e outros sítios extra-intestinais permanecem sem bactérias (BERG, 1995).

As bactérias que translocam prontamente são aquelas resistentes à morte por fagocitose. No entanto, as espécies entéricas fisiológicas morrem facilmente após este processo, sobrevivendo apenas quando as defesas do hospedeiro estão baixas (WIEST & RATH, 2003).

Os tipos de bactérias intestinais capazes de translocar para os MLNs são as bactérias Gram-negativas anaeróbicas facultativas, como *Escherichia coli*, *Klebsiela pneumoniae* e outras *Enterobacteraceae*, assim como *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococci* e várias *Streptococci*. *Escherichia coli* é a bactéria mais eficiente em translocar, o que pode ser atribuído à sua melhor aderência e fixação à camada mucosa epitelial do que uma bactéria não patogênica. Bactérias Gram-positivas, tolerantes ao oxigênio, como *Enterococcus* e *Lactobacillus brevis* translocam num padrão intermediário e bactérias anaeróbicas estritas são as menos efetivas em translocar para o linfonodo mesentérico, mesmo se colonizarem o trato gastrointestinal em altas taxas (BERG, 1995; LJUNGDAHL *et al.*, 2000; REDDY *et al.*, 2007).

Embora as bactérias anaeróbicas ultrapassem as aeróbicas em quantidade, as primeiras translocam apenas em situações graves, em que o trato intestinal está danificado estruturalmente. Em condições fisiológicas agem como um tapete na superfície da mucosa, limitando a colonização e o super crescimento de outros microorganismos potencialmente invasivos (WIEST and RATH, 2003). A administração de antibióticos orais provoca redução na população de bactérias nativas anaeróbicas estritas, ocasionando o supercrescimento bacteriano e a translocação das *Enterobacteriaceae* no ceco. Sendo assim, o supercrescimento de bactérias no intestino não ocorre apenas em condições experimentais, mas em uma variedade de situações, incluindo pacientes que recebem antibioticoterapia, causando desequilíbrio da microbiota nativa (BERG, 1995; BERG, 2001).

Alimentação parenteral, desnutrição, fome, obstrução intestinal, diabetes e choque endotóxico também induzem ao supercrescimento bacteriano, promovendo subsequente translocação (BERG, 2001).

2.2.2.2 Alteração da resposta imunológica

A defesa imunológica do hospedeiro é componente integral na dinâmica da translocação bacteriana, envolvendo a imunidade sistêmica (imunoglobulinas séricas), a imunidade da mucosa (IgA secretória) e a imunidade mediada por células (células T e macrófagos) (BERG, 2001).

A IgA da mucosa intestinal é a primeira linha de defesa da barreira imunológica intestinal. Pode remover os antígenos do espaço subepitelial por se ligar aos antígenos livres enquanto estes estão sendo transportados da superfície basolateral para

superfície apical da célula epitelial. Ao se ligar aos patógenos, a IgA previne o ataque destes às células epiteliais (DING and LI, 2003; ACHESON and LUCCIOLI, 2004).

A translocação bacteriana ocorre normalmente em animais e humanos saudáveis. No entanto, ocorre em pequena proporção, sendo que bactérias mortas também podem translocar. Desta forma, a translocação bacteriana é um processo fisiológico e essencial para regular a imunidade sistêmica e local (WIEST and RATH, 2003; MACFIE, 2004b; SALZEDAS-NETO, 2006).

Sob condições fisiológicas, a bactéria translocada pode ser fagocitada antes de alcançar o linfonodo mesentérico ou vasos linfáticos. Presume-se que, se o hospedeiro estiver imunossuprimido, há falha dos mecanismos de defesa, permitindo a entrada e sobrevivência da bactéria em sítios extra-intestinais distantes. Desta forma, com o aumento da gravidade da doença, a translocação bacteriana ocorre pela inabilidade do hospedeiro em combater adequadamente o número de bactérias presentes (MACFIE, 2004b). Sendo assim, a modulação de algumas citocinas antiinflamatórias, como IL-10 e TGF e/ou a interação entre células T regulatórias e a expressão de MHC classe II pelas células apresentadoras de antígeno parecem favorecer a tolerância a esse processo (ACHESON and LUCCIOLI, 2004).

Por outro lado, o intestino também pode modular a resposta local e sistêmica, mesmo na ausência de translocação bacteriana detectável. Desta forma, a manifestação clínica da sepse pode ser conseqüência da liberação de mediadores endógenos pelo hospedeiro, ao invés de conseqüência da bactéria ou de seus produtos. A evidência de que o intestino atue como órgão liberador de citocinas, tem sido reforçada em diferentes modelos experimentais, como por exemplo, na injúria por isquemia/reperfusão, quando a reperfusão é fonte de mediadores pró-inflamatórios que podem amplificar a resposta precoce da SRIS independente da translocação bacteriana (MOORE, 1999).

A resposta ao estresse induzido pela sepse grave resulta em diminuição na produção de imunoglobulina pelas células plasmáticas da mucosa, facilitando a aderência da bactéria luminal à superfície do enterócito, evento inicial da translocação (WOODCOCK *et al.*, 2001).

A imunidade mediada por células (macrófagos e células T) na lâmina própria e órgãos linfóides, como o linfonodo mesentérico, provê uma segunda linha de defesa do hospedeiro contra a translocação bacteriana. Imunoglobulinas séricas provavelmente agem como opsoninas, para aumentar a efetividade da fagocitose por macrófagos e leucócitos polimorfonucleares, matando a bactéria que sofreu translocação. Acredita-se

que a resposta das células B no GALT seja relacionada à produção da IgA protetora. (BERG, 1995; CLAVEL and HALLER, 2007).

No processo de translocação bacteriana, o papel das espécies reativas de oxigênio, derivadas de neutrófilos ativados, por exemplo, é suportada pela função de varredores de radicais livres (como a glutamina) ou inibidores de xantina, que diminuem a injúria da mucosa e reduzem a incidência de translocação bacteriana em vários modelos animais. (WIEST and RATH, 2003).

Em modelos animais, o jejum e a nutrição parenteral promovem o crescimento bacteriano exagerado, a diminuição na produção de mucina intestinal, a diminuição dos níveis de IgA, a atrofia da mucosa e a atenuação do número e da função dos linfócitos do GALT, além de acelerar o estresse oxidativo. A falta de alimentação, oral ou enteral, afeta o padrão celular e imunológico desenvolvido para proteger o hospedeiro da translocação bacteriana (NETTELBLADT *et al.*, 1997).

2.2.2.3 Alteração da barreira intestinal e permeabilidade

Os enterócitos, as células M e as células dendríticas intestinais são as células que respondem aos antígenos e seguem a linha de defesa (O'HARA and SHANAHAN, 2006).

As células M carregam partículas do ambiente luminal para as células dendríticas subjacentes e outras células apresentadoras de antígenos, como os macrófagos, por exemplo. Apenas bactérias invasivas podem induzir sua própria fagocitose pelas células M e as bactérias não-invasivas têm menor eficiência para entrar no epitélio. As células dendríticas, que são a terceira linha de defesa, abrem as junções "tight" entre as células epiteliais e lançam os dendritos para fora do epitélio, capturando partículas estranhas (RESCIGNO *et al.*, 2001).

As células dendríticas são células apresentadoras de antígeno, agem como sentinelas, capturando os antígenos e transportando-os para o tecido linfóide, onde ativam células T imaturas. Dessa forma, atuam na interseção entre a resposta inata e adaptativa, pela habilidade em ativar células T imaturas e diferenciá-las em células Th1 ou Th2 (STAGG *et al.*, 2003).

A barreira intestinal direcionada contra a invasão de microorganismos é influenciada por fatores locais como muco, ácido gástrico, enzimas pancreáticas, bile, barreira celular epitelial, representada pelas junções, e pela motilidade intestinal (WIEST & RATH, 2003; MACFIE, 2004b). Esses fatores, em conjunto, agem

prevenindo o ataque de bactérias ao endotélio. Secreções da mucosa, ricas no anticorpo IgA, atuam por ligação ou agregação à bactéria, prevenindo a aderência e a colonização da mucosa, enquanto que a exposição de bactérias à bile, diminui a interiorização epitelial de bactérias entéricas quando as mesmas estão na fase de crescimento. A ausência de bile no trato gastrointestinal prejudica a distribuição dos linfócitos T no GALT, diminuindo o número de linfócitos T CD4+ e CD8+ (SANO *et al.*, 2004; WIEST, 2004).

O epitélio intestinal intacto permite a absorção de solutos e serve como barreira efetiva que previne a saída, do lúmen, de bactérias e toxinas entéricas e a conseqüente liberação de citocinas inflamatórias (KOZAR *et al.*, 2004a).

A função da barreira intestinal é alterada quando há modificação da permeabilidade intestinal, em situações de jejum ou quando o fluxo sanguíneo esplênico é reduzido. Em situações fisiológicas, a tensão de oxigênio no topo da vilosidade intestinal é menor que no sangue arterial, e assim, qualquer redução no fluxo sanguíneo pode diminuir a oxigenação tecidual levando à acidose da mucosa, aumentando a permeabilidade pela produção de radicais livres e, conseqüentemente, injúria da célula epitelial (MACFIE, 2000; MACFIE, 2004; BALZAN *et al.*, 2007).

O epitélio é uma barreira seletiva entre o ambiente do lúmen intestinal e a lâmina própria. É constituído por simples camada de células epiteliais, que são especializadas na formação de complexos juncionais, e que sofrem rápida e contínua renovação celular (CLAVEL and HALLER, 2007).

Embora o intestino seja uma barreira funcional entre as bactérias intestinais e o hospedeiro, o crescimento bacteriano exacerbado, associado com a patogenicidade, constituem fatores importantes que podem induzir a translocação bacteriana superando a função da barreira intestinal (SALZEDAS-NETO, 2006).

A falha da barreira intestinal está caracterizada primariamente pela absorção prejudicada de nutrientes, comprometimento da reposta imunológica intestinal e aumento da permeabilidade do intestino (De-SOUZA and GREENE, 2005).

Vários agentes luminiais, incluindo os produtos da parede celular da bactéria, bactérias aderentes e invasivas e citocinas estimulam as células epiteliais intestinais a liberar produtos pró-inflamatórios (quimocinas, citocinas e moléculas de adesão) (CLAVEL and HALLER, 2007).

Células especializadas, como o complexo de células de junção, permitem permeabilidade seletiva ao epitélio, mantém a adesão entre as células (junções

intermediárias e desmossomos) e permitem a comunicação intracelular (junções do tipo “gap”) (WIEST and RATH, 2003; KOZAR *et al.*, 2004a).

A permeabilidade paracelular é um processo fisiológico e regulado que ocorre em todo o epitélio em diferentes graus. Entre as células epiteliais existem as junções “tight”, que mantêm as células juntas e permitem a permeabilidade paracelular seletiva, o que exclui, normalmente, o movimento passivo de compostos hidrofílicos não carregados, como as bactérias e as macromoléculas. O aumento da permeabilidade paracelular envolve a abertura das junções “tight” dos enterócitos e pode induzir a cascata inflamatória (MACFIE, 2000; KOZAR *et al.*, 2004a; BALZAR *et al.*, 2007).

A migração transcelular da bactéria ou de outras partículas ocorre pela captação inicial pelo ápice do enterócito seguido de interiorização da bactéria num vacúolo citoplasmático e migração através do citoplasma do enterócito. A abertura das junções “tight” também permite a captação da bactéria na membrana lateral do enterócito, com subsequente migração transcelular por meio do citoplasma do enterócito (MACFIE, 2000).

Outro fator que contribui para o aumento da permeabilidade é a interleucina-6 e a superprodução de óxido nítrico. Em quantidades fisiológicas, o óxido nítrico é importante para a permeabilidade e a motilidade e, tem propriedades antimicrobianas. No entanto, quantidades aumentadas diminuem a viabilidade endotelial (BALZAN *et al.*, 2007).

Os oxidantes, como o peróxido de hidrogênio e radicais superóxido, rompem a estrutura do citoesqueleto e aumentam a permeabilidade intestinal (WIEST, 2004). Desta forma, o aumento da permeabilidade da mucosa é provocado por uma série de mudanças como estresse oxidativo, liberação de citocinas pró-inflamatórias, redução do pH da mucosa e hipóxia. O aumento da permeabilidade paracelular (pelas junções “tight”) observada em pacientes críticos está associado com maior incidência de translocação bacteriana e de toxinas do lúmen intestinal para a circulação sistêmica, causando complicações infecciosas (De-SOUZA and GREENE, 2005).

No entanto, parece que o aumento da permeabilidade intestinal é um fator que predispõe à translocação bacteriana, uma vez que macromoléculas, como endotoxinas, podem alcançar a camada mucosa subepitelial e a corrente sanguínea devido ao rompimento das junções “tight”. No entanto, geralmente, a translocação ocorre via transcelular, através dos enterócitos morfológicamente intactos (WIEST and RATH, 2003; BALZAN *et al.*, 2007).

Existem controvérsias quanto à associação entre permeabilidade intestinal e infecção sistêmica. Estudos que mostraram associação positiva têm melhor nível de evidência que os contrários a essa premissa (De-SOUZA and GREENE, 2005).

2.2.2.3.1 Métodos de avaliação da permeabilidade intestinal

Normalmente, a mucosa intestinal previne, de forma efetiva e seletiva, o movimento transepitelial de compostos solúveis em água e não carregados. Com o objetivo de se determinar a permeabilidade, têm-se usado substâncias com estas características e que sejam ainda, de pequeno tamanho, não tóxicas; não metabolizadas ou seqüestradas, se absorvidas, eliminadas na urina e resistentes (não destruídas) ao passar pelo trato gastrointestinal (ARRIETA *et al.*, 2006).

A permeabilidade é avaliada por técnicas não-invasivas, medindo a excreção urinária de substâncias administradas oralmente. Dentre essas substâncias destacam-se a lactulose, o manitol, os polímeros de polietileno glicol (PEG), o ^{51}Cr -ácido etilenodiaminotetraacético (^{51}Cr -EDTA) e o $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -dietilenotriamonopentaacético ($^{99\text{m}}\text{Tc}$ -DTPA) (BJARNASON *et al.*, 1995; MACFIE, 2000; JORGENSEN *et al.*, 2006).

A permeabilidade é avaliada pelo princípio da excreção urinária, uma técnica comum, no entanto duvidosa quanto ao aspecto do tempo de coleta da urina, uma vez que a taxa de excreção urinária sofre variação entre os indivíduos, devido ao tempo de trânsito intestinal e à degradação bacteriana (WIEST, 2004).

É usual utilizar o monossacarídeo e o dissacarídeo (manitol e lactulose) em conjunto para avaliar a permeabilidade, uma vez que são conhecidos por passar pelo epitélio de forma transcelular e paracelular, respectivamente. No entanto, outras técnicas também devem ser utilizadas, visto que não existe padrão ouro para esse diagnóstico (BJARNASON *et al.*, 1995).

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

Açúcares como lactulose, manitol, rafinose ou celobiose, tradicionalmente empregados para avaliação da permeabilidade no intestino delgado, são degradados

pela microbiota bacteriana do intestino grosso e, portanto, não provêm informação sobre a permeabilidade colônica (ARRIETA *et al.*, 2006).

Quanto ao PEG, o mais utilizado é o PEG 400, que possui massa molecular entre 194 e 502. É composto altamente solúvel e a permeabilidade ao PEG-400 em intestino de rato é influenciada pelo gradiente osmótico. A recuperação do PEG-400 na urina após a administração intravenosa é incompleta, o que pode afetar a reprodutibilidade dos resultados (BJARNASON *et al.*, 1995).

Por todas essas razões, tem-se utilizado via alternativa para a averiguação da permeabilidade intestinal. Elementos radiomarcados, como o ^{51}Cr -EDTA e o $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -DTPA, compartilham as mesmas propriedades físicas dos oligossacarídeos. No entanto, apresentam a vantagem da facilidade na medida. A diferença na utilização do $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ou do ^{51}Cr está na meia-vida, uma vez que a do ^{51}Cr é de 27 dias e a do $^{99\text{m}}\text{Tc}$ é de apenas seis horas, permitindo que maiores doses sejam utilizadas, facilitando a recuperação de pequenas amostras no sangue e urina. Em humanos, a avaliação da excreção desses elementos na urina é realizada no tempo de 24 horas devido à diferença na excreção dos indivíduos sadios e dos pacientes com doença intestinal (BJARNASON *et al.*, 1995; SUN *et al.*, 1998; JORGENSEN *et al.*, 2006).

2.2.3 Glutamina e Translocação Bacteriana

A glutamina é conhecida como a principal fonte de energia para os enterócitos, colonócitos e células do sistema imunológico. Mantém a integridade da mucosa intestinal e atua na permeabilidade intestinal com conseqüente redução das taxas de translocação em estudos envolvendo animais (MACFIE, 2000; SALVALAGGIO and CAMPOS, 2002; MACFIE, 2004).

WISCHMEYER *et al.* (2001), avaliando o uso da glutamina em pacientes queimados, observaram que a glutamina fornecida como suplemento em dietas enterais padrão, diminui a incidência de bacteremia, atenua as medidas de inflamação global e melhora o estado nutricional desses pacientes.

Outros autores mostraram o papel da glutamina na translocação bacteriana. DING and LI (2003) trataram os animais, com 1g/kg/dia de glutamina em conjunto com nutrição parenteral total (TPN) e avaliaram a translocação bacteriana para MLN, fígado e sangue portal. Os animais do grupo com lipopolissacarídeo (LPS), que sofreram trauma + TPN + endotoxemia, foram os que apresentaram maiores níveis de translocação, seguidos dos animais em TPN apenas. A taxa de translocação bacteriana para os grupos controle, glutamina, TPN e LPS foi de 12,5%, 41,7%, 44,4%

e 75% respectivamente. Os autores observaram ainda que as bactérias encontradas na cultura dos órgãos e do sangue, em ordem de frequência, foram *Proteus*, *E. coli*, *Enterococcus* e outras bactérias Gram negativas.

No entanto, BELMONTE *et al.* (2007), avaliando a translocação em animais com restrição protéica (desnutridos), não observaram efeito benéfico da glutamina, atribuindo essa falha a outros fatores envolvidos na função da barreira intestinal, como células imunológicas ou secreção de IgA, que pode ter sido prejudicada pela restrição protéica grave.

Diante do exposto, a ação da glutamina na translocação bacteriana necessita de mais estudos para elucidar o papel do nutriente e possível mecanismo de ação.

2.3 OBSTRUÇÃO INTESTINAL

2.3.1 Características gerais

A obstrução intestinal é caracterizada pela interrupção do trânsito intestinal e pode ser subdividida quanto à natureza da obstrução. Neste sentido, pode ser mecânica quando o distúrbio inicial é a oclusão orgânica da luz intestinal (aderências, hérnias, tumores, corpos estranhos) ou funcional, quando o distúrbio inicial é de motilidade (íleo parálítico, doença de Chagas). Outra possibilidade de ocorrer a obstrução intestinal é quando de origem vascular, em que primariamente ocorre isquemia da parede intestinal (trombose ou embolia) (BRESCIA, 2002; MOREIRA *et al.*, 2005). Em países desenvolvidos, dentre as causas, predominam as aderências devido a laparotomias, representando 50% a 80% dos casos. Em países em desenvolvimento, hérnias e vólvulos são as principais causas de obstrução (HAYANGA *et al.*, 2005).

A obstrução intestinal mecânica é uma das causas mais comuns de problemas abdominais agudos e pode ser simples ou estrangulada, dependendo do suprimento sanguíneo. As principais manifestações são a distensão intestinal, hipersecreção intraluminal e as alterações na motilidade, que podem estar relacionadas com o dano à mucosa induzido pela inflamação. A taxa de mortalidade da obstrução intestinal permanece em torno de 10%, apesar das novas técnicas de diagnóstico e manejo terapêutico (CHANG *et al.*, 2001).

Ambos os tipos de obstrução, mecânica ou funcional, estão associados com aumento da pressão intraluminal, que pode causar isquemia da parede intestinal e conseqüente aumento da pressão intra-abdominal. A hipertensão intra-abdominal é encontrada em mais de 20% dos pacientes críticos e pode levar a uma série de conseqüências sistêmicas (BRESCIA, 2002; MADL and DRUML, 2003).

Os sintomas clínicos da obstrução mecânica são vômitos, constipação, distensão abdominal e dor. A magnitude de cada um dos sintomas difere de acordo com a causa e sítio da obstrução intestinal (MACUKIEWICZ and CARLSON, 2005).

2.3.2 Fisiopatologia

A obstrução intestinal mecânica é acompanhada primeiramente, pelo desenvolvimento de distensão intestinal, que resulta do acúmulo de secreções gastrointestinais e de gás acima do seguimento obstruído (HAYANGA *et al.*, 2005).

Inicialmente, a distensão estimula a peristalse, abaixo e acima do ponto obstruído, levando ao esvaziamento completo do intestino distal. A distensão também estimula a secreção fisiológica de fluidos, eletrólitos e suco entérico no lúmen intestinal. No entanto, quando o intestino distal está completamente vazio e o lúmen intestinal permanece ocluído, há a supressão da peristalse, podendo resultar em aumento da pressão luminal e da distensão intestinal (Figura 6) (BROWN and ADAM, 2002; MADL and DRUML, 2003; HAYANGA *et al.*, 2005).

Em condições fisiológicas, um quinto do fluido corporal total é secretado e reabsorvido pelos intestinos diariamente. Alterações nesse processo podem causar depleção de fluidos e eletrólitos (MACUKIEWICZ and CARLSON, 2005).

Quanto mais grave se torna a distensão, alterações histológicas também podem ocorrer, como aumento da pressão hidrostática intraluminal, comprimindo os vilos linfáticos da mucosa intestinal e resultando em obstrução do fluxo linfático e desenvolvimento de linfedema na parede intestinal (HAYANGA *et al.*, 2005).

A taxa de deslocamento de sais e água do sangue para o lúmen aumenta, enquanto a taxa de deslocamento do lúmen para o sangue permanece estática ou decresce. Com isso, a absorção é alterada, assim como a carga de filtração de fluidos, eletrólitos e proteínas através dos capilares da parede intestinal. Grande quantidade de fluido isotônico passa pelo lúmen intestinal e como não é reabsorvido, é perdido pelo compartimento extracelular. A perda de fluido extracelular a partir do espaço intravascular resulta em desidratação e hipovolemia. A desidratação prolongada pode resultar em oligúria, azotemia e hemoconcentração (HAYANGA *et al.*, 2005; MACUKIEWICZ and CARLSON, 2005).

Um fator que pode estar envolvido na patogênese da dilatação intestinal é o óxido nítrico (conhecido inibidor do tônus do músculo liso), uma vez que, durante a dilatação ou inflamação, neutrófilos podem invadir a camada muscular e danificar as células musculares pela liberação de enzimas proteolíticas e citocinas. Essa resposta inflamatória leva à liberação do óxido nítrico na camada muscular intestinal, que paralisa as células musculares e agrava a dilatação intestinal. A quantidade e atividade da enzima óxido nítrico sintase tem relação direta com a gravidade da dilatação. A isquemia da parede intestinal, uma conseqüência da dilatação intestinal e do aumento

da pressão intraluminal, leva à captação sistêmica de citocinas e outros mediadores inflamatórios (MOURELLE *et al.*, 1995; MADL and DRUML, 2003).

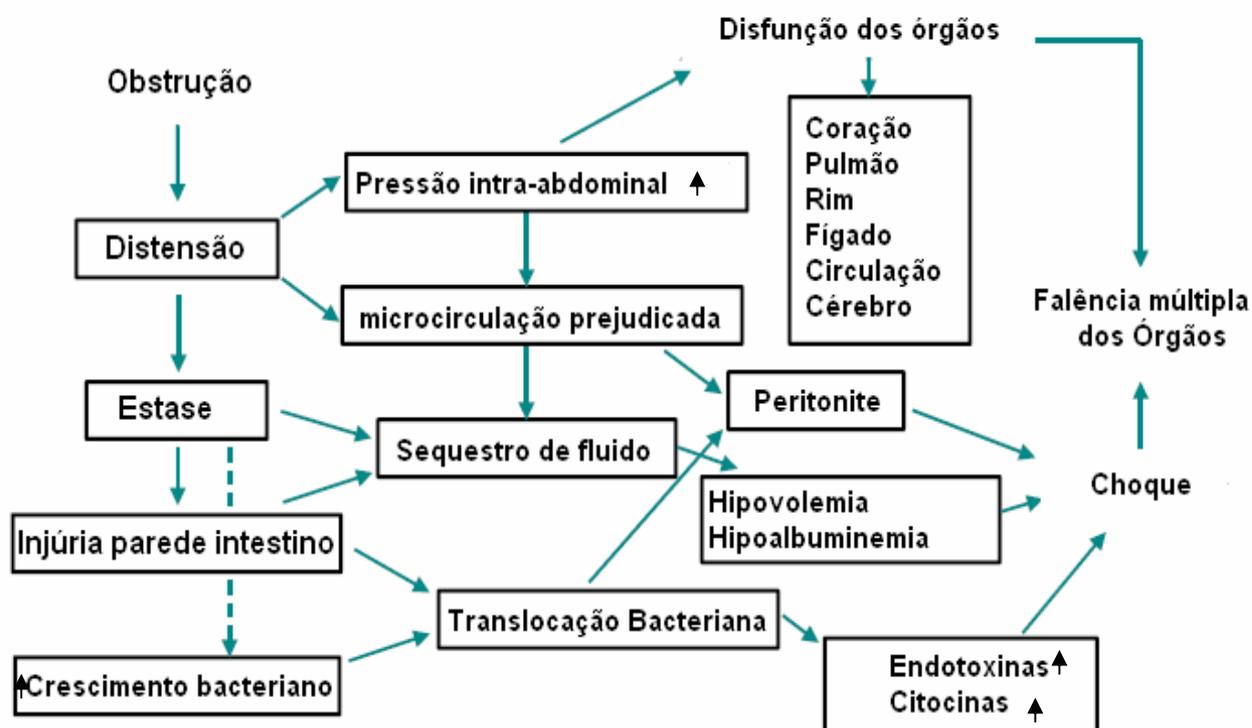


Figura 6: Fisiopatologia da obstrução intestinal (MADL & DRUML, 2003).

2.3.3 Conseqüências sistêmicas da obstrução

A mucosa do trato gastrointestinal age como barreira contra grande número de bactérias que residem dentro do lúmen intestinal (BROWN and ADAM, 2002; HAYANGA *et al.*, 2005). A obstrução leva à estase intestinal, propiciando o supercrescimento bacteriano. Essas bactérias causam fermentação, conduzindo ao aumento da produção de gases e do gradiente de pressão osmótica entre o conteúdo intestinal e os capilares da parede intestinal (BROWN and ADAM, 2002). Por fim, a obstrução conduz à inflamação da parede do intestino, que associada com a translocação bacteriana contribuem para eventos secundários como a ativação de células imunocompetentes, liberação de citocinas e aumento da formação de espécies reativas de oxigênio, que irão mediar manifestações extra-intestinais (MADL and DRUML, 2003).

A obstrução, tanto mecânica quanto funcional, está associada ao amplo espectro de complicações sistêmicas, decorrentes do supercrescimento bacteriano, da translocação bacteriana e, conseqüentemente, da ativação da resposta inflamatória (MADL & DRUML, 2003).

2.4 BACTÉRIA MARCADA COM ISÓTOPO RADIOATIVO

O ^{99m}Tc (tecnécio) é um radionuclídeo artificial originado da desintegração radioativa do ^{99}Mo (molibdênio), isótopo proveniente da fissão nuclear do urânio. Apresenta características como baixo custo, alta disponibilidade, meia-vida curta ($t_{1/2} = 6$ horas), emissão de radiação gama (γ) e energia de radiação (140 Kev) (DINIZ, 1998).

Por ser um metal deficiente em elétrons, o ^{99m}Tc reage principalmente com grupos doadores de elétrons como aminas, amidas, tióis, sulfidrilas e isonitrilas. Na marcação de bactérias, o mais provável é que o ^{99m}Tc reaja principalmente com estruturas protéicas, já que estas possuem grupos doadores de elétrons. Esta reação pode ocorrer com proteínas que constituem a parede celular bacteriana e/ou com proteínas citoplasmáticas. A célula bacteriana permanece preservada após o procedimento de marcação (DINIZ *et al.*, 1999).

Investigações anteriores mostraram que a marcação da *Escherichia coli* não comprometeu a viabilidade bacteriana, de maneira que estudos de translocação bacteriana em icterícia obstrutiva puderam ser realizados (DINIZ, 1998; WHITE *et al.*, 2006).

Este método apresenta a vantagem de não necessitar de condições assépticas, de não utilizar cultivo bacteriano e de ser mais eficiente que o método convencional. Assim, todo o estudo de biodistribuição da bactéria é determinado pela contagem de radioatividade emitida pelo átomo radioativo (^{99m}Tc) que se encontra ligado à bactéria. Além disso, a adição de marcador radioisotópico a bactérias específicas permite que produtos bacterianos e fragmentos sejam detectados em sítios extraintestinais sem considerar a sua viabilidade, propiciando maior sensibilidade na identificação da translocação bacteriana (WHITE *et al.*, 2006).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar o papel da glutamina no processo de translocação bacteriana em modelo experimental de obstrução intestinal em camundongos.

3.2 Objetivos específicos

- ❑ Validar o modelo de obstrução intestinal em camundongos com a proposta de estudar a translocação bacteriana;
- ❑ Investigar a ação da glutamina no processo de translocação bacteriana;
- ❑ Avaliar a permeabilidade intestinal dos animais tratados e não tratados com glutamina.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais

Foram utilizados camundongos machos, linhagem Swiss, idade de cinco semanas, pesando entre 25 e 30 gramas, fornecidos pelo biotério da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais. Os animais foram mantidos no biotério da faculdade em ciclo de 12 horas claro/escuro.

O protocolo de pesquisa (nº 108/2007) foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da Universidade Federal de Minas Gerais.

4.2 Dietas

4.2.1 Preparo das dietas

Foram preparados dois tipos de ração: caseína e ração convencional modificada. Os animais foram tratados, durante sete dias, com glutamina administrada via “per os” (gavagem intragástrica) + ração convencional modificada *ad libidum*. Todos os grupos receberam dietas isocalóricas e isoprotéicas entre si, que foi alcançado com o acréscimo de caseína à dieta não suplementada com glutamina. A água foi oferecida *ad libidum*.

4.2.1.1 Ração controle com caseína

Para o preparo da ração controle com caseína foram utilizados os seguintes ingredientes nas suas respectivas proporções:

- Ração em pó Labina[®] - 84,7%
- Gelatina em pó incolor – 3%
- Caseína – 0,58%
- Óleo – 0,68%
- Amido – 7,8%
- Água – q.s.p.

A ração na forma de pó foi fornecida pelo Biotério da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais. Inicialmente, foram homogeneizadas a ração em pó, a caseína e o amido. Em seguida, acrescentada gelatina em pó incolor, dissolvida em água destilada previamente aquecida. Por último, foi acrescentada água destilada (q.s.p.) à temperatura ambiente. Todos os ingredientes foram homogeneizados até formação de massa uniforme, que foi subdividida em pequenos cilindros similares à forma da ração tradicional. As rações foram secas em estufa a 45°C, por oito horas (Série D, Nova Ética, SP, BR). Após secagem, a ração obtida foi pesada para cálculo da quantidade diária a ser oferecida aos animais (QUIRINO *et al.*, 2007). O cálculo foi realizado da seguinte forma:

Quantidade calculada de ração (g) ----- cilindro de ração de (x) g

Quantidade obtida de ração (g) ----- cilindro ração de (y) g

Sendo x a quantidade desejada (em gramas) para o cilindro e y o valor real do cilindro de ração a ser oferecido.

As rações foram preparadas no Laboratório Nutrição Experimental da Faculdade de Farmácia, sob coordenação do professor Tasso Moraes e Santos.

4.2.1.2 Ração especialmente modificada

O grupo da glutamina administrada por gavagem teve a ração preparada especialmente (ração convencional modificada), de forma que o conteúdo calórico e protéico da ração fosse equivalente ao das demais rações. Isto se fez necessário uma vez que a glutamina dada por gavagem representa fonte protéica e a administração da ração convencional Labina® isoladamente não permitiria que as rações dos grupos fossem isocalóricas e isoprotéicas entre si. Foram utilizados os seguintes ingredientes nas suas respectivas proporções:

- Ração em pó Labina® – 86,22%
- Gelatina em pó incolor – 3%
- Óleo – 0,5%
- Amido – 7,0%
- Água – q.p.s.

O preparo da ração para os animais do grupo que receberam glutamina por gavagem seguiu o protocolo descrito no item 4.2.1, porém, sem adição de caseína.

4.2.1.3 Preparo da Glutamina

A glutamina livre, administrada por gavagem, foi dissolvida em tampão HEPES na concentração de 500mg/kg/dia. O tampão HEPES foi preparado utilizando-se concentração de 10 mmoles/L de HEPES (N-2-hidroxietil piperazina), 145 mmoles de NaCl e 5mmoles de EDTA em água destilada. O pH foi ajustado entre 7,4 e 7,6 com NaOH ou HCl conforme necessidade (OLIVEIRA, 2004).

Após o preparo da solução de glutamina em tampão, a mesma foi submetida à temperatura de banho maria (37°C), por cinco minutos, para total solubilização. Em seguida, foi administrada aos camundongos com o auxílio de agulha para gavagem.

4.2.2 Composição em macronutrientes e calorias das rações preparadas

As rações preparadas foram isocalóricas e isoprotéicas entre si e foram calculadas tendo por base a composição de macronutrientes da ração Labina® convencional. A composição final calculada foi de 51g/100g de carboidrato (204 kcal), 23g/100g de proteína (92 kcal) e 4g/100g de lipídeo (36 kcal), totalizando 332 kcal/100g.

4.3 Preparação da Bactéria

A bactéria utilizada foi a *Escherichia coli* (ATCC-10536), não patogênica, fornecida pelo Laboratório de Controle de Qualidade Biológico da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais.

De uma cultura-mãe de *E. coli* foi feito o repique em agar tripticaseína (Merk). Após 18 a 20 horas de crescimento a 37°C, a bactéria foi transferida, com auxílio de alça de platina, para solução salina esterilizada. A concentração bacteriana foi ajustada espectrofotometricamente em 31% de transmitância a 580nm (espectrofotômetro COLEMAN JUNIOR II) correspondente a 10⁸ unidades formadoras de colônia por mL (UFC/mL) (DINIZ, 1998).

4.3.1 Procedimento de Marcação da Bactéria com ^{99m}Tecnécio

Alíquotas de 2,0 mL da suspensão bacteriana descrita no item 4.3 foram incubadas a 37 °C na concentração de cloreto estano de 580 µM (1,3 mg/mL), pH

7,0, por 10 minutos. Após este período, 37,0 a 55,5 MBq de ^{99m}Tc foram adicionados a cada preparação e mantidos a 37 °C por mais 10 minutos. Os tubos foram centrifugados a 3.000 rpm durante 25 minutos. Após este período o sobrenadante foi retirado para a contagem da radioatividade. O precipitado foi novamente suspenso em 3,0 mL de solução de salina esterilizada e procedeu-se a contagem da sua radioatividade. Este procedimento foi repetido por três vezes (DINIZ, 1998). A porcentagem de ^{99m}Tc incorporado nas células bacterianas (% marcação) foi determinado do seguinte modo:

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

Após o procedimento de marcação da bactéria, os animais de todos os grupos receberam, por gavagem intragástrica, 0,1mL de solução contendo 10^7 /UFC de *E. coli* marcada com ^{99m}Tc .

4.3.2 Estabilidade de marcação da $^{99m}\text{Tc-E. coli}$

Com a finalidade de se investigar a estabilidade da ligação dos átomos de ^{99m}Tc com a bactéria *E. coli*, utilizou-se a contagem da radioatividade presente na tireóide dos animais, uma vez que o tecnécio livre ($^{99m}\text{TcO}_4^-$) na circulação é rapidamente captado pela glândula da tireóide. Para avaliação da estabilidade, comparam-se os valores da tireóide com a radiação ambiental ou background (BKG).

4.4 Tratamento dos Animais

Os animais foram divididos em três grupos.

GRUPO SHAM: Sham operados + 3g de ração controle caseína + Ração convencional Labina ® *ad libidum*.

GRUPO OINT: Obstrução intestinal + 3g de ração controle caseína + Ração convencional Labina ® *ad libidum*.

GRUPO GLUT: Obstrução intestinal + glutamina administrada por gavagem (500 mg/kg/dia) + Ração preparada *ad libidum*.

Durante sete dias consecutivos, anteriores à operação para indução da obstrução intestinal, os animais foram divididos nos grupos citados anteriormente e mantidos em gaiolas individuais no biotério da Faculdade de Farmácia.

Durante os dias de tratamento, os grupos *sham* e OINT receberam, no mesmo horário, 3g da ração controle caseína e após o consumo desta, ração Labina® *ad libidum*. Como esses animais têm maior consumo alimentar durante o período noturno, a ração controle caseína foi oferecida entre as 17 e 18h de cada dia, representando 3/5 da quantidade total consumida pelo camundongo/dia. No dia seguinte pela manhã, o camundongo foi observado até o consumo total da ração preparada e, só então foi oferecida a ração convencional Labina®, no período restante.

O grupo GLUT recebeu, por gavagem, 0,3mL de solução contendo 500mg/kg/dia de glutamina e ração especialmente modificada *ad libidum* durante sete dias. A gavagem e a ração foram oferecidas no mesmo horário dos demais grupos (entre 17 e 18h) e a ração foi pesada 24 horas após para avaliar o consumo/dia.

Os camundongos foram pesados no início e no fim do período de tratamento, enquanto que as rações foram pesadas diariamente. Estes procedimentos foram adotados a fim de se determinar o ganho de peso e o consumo/dia dos camundongos. Para determinação do coeficiente de eficiência alimentar, foi determinada a razão entre o ganho de peso e o consumo dia.

4.5 Modelo experimental de obstrução intestinal

No oitavo dia, decorridos 90 minutos da inoculação do material radiomarcado com ^{99m}tecnécio (bactéria ou ácido dietilenotriaminopentaacético - DTPA), os animais foram anestesiados intraperitonealmente com solução de cloridrato de 2-(2,6-xilidino)-5,6-dihidro-4H-1,3-tiazina (Dopazen®) e cloridrato de ketamina (Dopalen®) nas concentrações de 8mg/Kg e 60mg/kg respectivamente. Foi realizada laparotomia mediana de aproximadamente 3 cm, com exposição do ceco. Em seguida, o íleo terminal sofreu ligadura com nó simples utilizando-se fio de nylon 5.0. Foi realizada posterior sutura da parede abdominal. Todos os grupos passaram pelo mesmo procedimento, exceto o grupo *Sham*, que sofreu apenas a laparotomia mediana, simulando uma operação, com posterior sutura da parede abdominal.

4.6 Estudo da translocação bacteriana

Para estudo da translocação bacteriana, 21 animais foram divididos em três grupos, como descrito no item 4.4. Cada grupo foi representado por sete animais.

Após o procedimento cirúrgico supracitado, os animais foram mantidos em gaiolas por 18 horas com ração convencional Labina® e água *ad libidum*. Após este período, os animais foram anestesiados e o sangue coletado por punção venosa axilar, com auxílio de uma pipeta de Pasteur, para a determinação da radiação. Após este período, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e os nódulos linfáticos mesentéricos (NLM), fígado, baço, pulmões e tireóide foram removidos e pesados para a determinação imediata da radioatividade em cintilador de poço (ANSR, Abbot, EUA).

Para análise dos dados, a contagem obtida em cpm foi dividida por grama do tecido avaliado e apresentada em cpm/g.

4.7 Percentual de inibição da translocação

Para avaliação da porcentagem de inibição da glutamina no processo de translocação bacteriana, fez-se a relação entre a mediana (cpm/g) do grupo GLUT e a mediana (cpm/g) do grupo OINT. Essa relação foi chamada de E/C e a partir dela foi calculada a porcentagem de inibição do nutriente em promover a translocação bacteriana, sendo a mesma representada por $(1-E/C) \times 100$.

4.8 Estudo da permeabilidade intestinal

Para avaliação da permeabilidade intestinal, os animais foram divididos em três grupos, como descrito no item 4.4. Cada grupo foi representado por 15 animais.

Após sete dias de tratamento, os animais receberam por gavagem 0,1mL de solução de DTPA marcado com 18,5 MBq de ^{99m}Tc . O padrão de dose, que corresponde a uma alíquota de igual volume de ^{99m}Tc -DTPA oferecido aos animais foi utilizado para a determinação da radioatividade no mesmo tempo dos demais tubos.

Decorridos 90 minutos, os camundongos foram anestesiados e submetidos à operação de obstrução intestinal (como descrito no item 4.5), com exceção daqueles do grupo *sham*, que sofreram apenas laparotomia mediada.

Após 4, 8 e 18 horas da promoção da obstrução, os animais foram novamente anestesiados para a retirada de 500µL de sangue, a partir do plexo axilar, e foi submetido à contagem da radioatividade.

Os resultados obtidos foram comparados com o padrão da dose e calculados em percentual da dose de acordo com a seguinte fórmula:

$$\% \text{ dose} = [(\text{CPM do sangue} * 100) / \text{CPM do padrão de dose}].$$

4.9 Análise Estatística

Os dados paramétricos de ingestão alimentar e ganho de peso foram analisados por ANOVA fator único seguido do teste de Tukey para comparação das médias, enquanto que os resultados referentes à translocação bacteriana foram analisados pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido do “*post hoc*” de Dunn. Os dados referentes à permeabilidade intestinal foram analisados pelo teste t para amostras independentes.

Os testes foram realizados utilizando o programa para computador “BioEstat” versão 3.0 (Sociedade Civil Mimirauá / MCT – CNPq). As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas para valores de $p < 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1 Avaliação da ingestão e ganho de peso

O consumo médio diário das rações para os grupos *SHAM*, *OINT* e *GLUT* foi de $4,82 \pm 0,26$; $4,84 \pm 0,35$ e $3,86 \pm 0,25$ gramas, respectivamente. A ingestão alimentar do grupo que recebeu glutamina na gavagem foi estatisticamente menor do que os demais grupos ($p < 0,01$). O resultado está representado na figura 7.

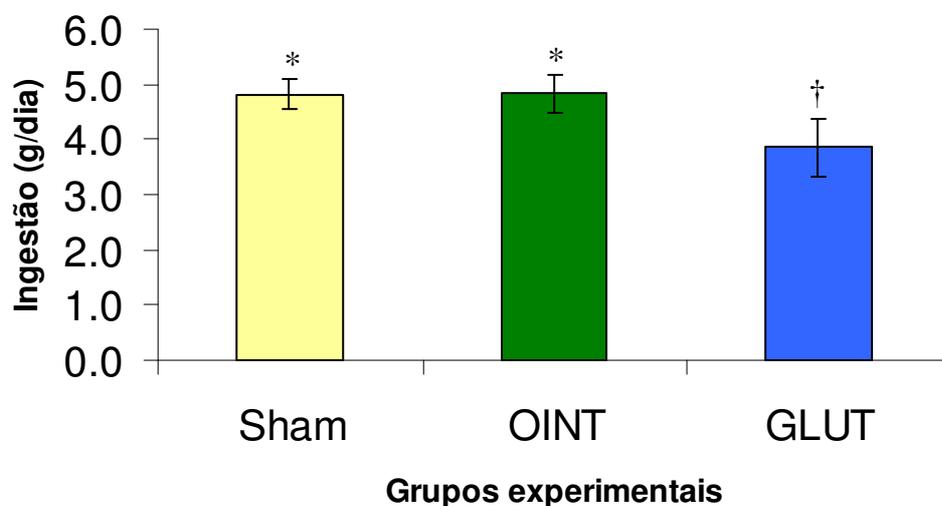


Figura 7: Ingestão média (g/dia) dos animais dos grupos experimentais.

n = 7. * NS. † p < 0,05.

O ganho de peso após 7 dias apresentou valores de $4,43 \pm 0,67$; $4,50 \pm 1,00$ e $1,86 \pm 0,85$ gramas para os grupos *SHAM*, *OINT* e *GLUT* respectivamente. Observa-se (Fig. 8) que o grupo *GLUT* apresentou ganho de peso estatisticamente menor que os animais dos grupos *SHAM* e *OINT*. O coeficiente de eficiência alimentar foi de 0,92 para os grupos *SHAM* e *OINT* e de 0,49 para o grupo *GLUT* ($p < 0,05$).

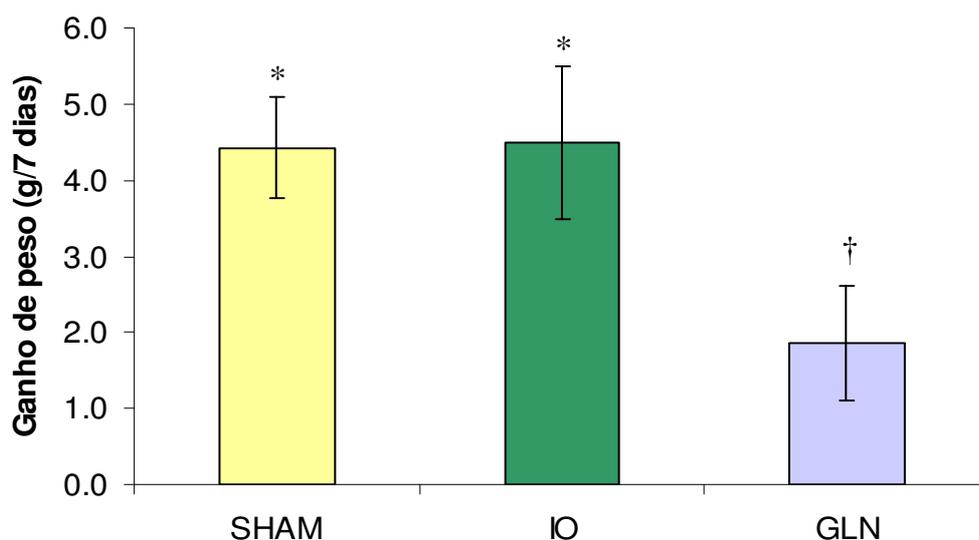


Figura 8.: Ganho de peso médio (g/semana) dos animais dos grupos experimentais.

n = 7. * NS. † p < 0,05.

5.2 Determinação do rendimento de marcação da bactéria com o ^{99m}Tc ($^{99m}\text{Tc-E.coli}$)

O rendimento médio (%) de marcação da *Escherichia coli* com o ^{99m}Tc foi da ordem de $98,5 \pm 1,6$ (n = 10).

5.3 Estabilidade de marcação da $^{99m}\text{Tc-E. coli}$

Observa-se pela Tabela 1 que os valores de radioatividade (cpm) encontrados na tireóide dos animais de todos os grupos investigados foram inferiores aos valores de radiação ambiental ou background (BKG)

Tabela 1.: Níveis de radioatividade presente na tireóide

GRUPOS	Radioatividade da tireóide	
	cpm	BKG cpm
SHAM	42,3	537
OINT	79,9	726
GLUT	38,6	512

Valores médios (n = 7)
cpm = Contagem por minuto
BKG= radiação ambiental

5.4 Validação do modelo experimental e o efeito da glutamina no processo de translocação bacteriana

Observa-se (Tab. 2) aumento na captação de $^{99m}\text{Tc-E.coli}$, para todos os órgãos dos animais do grupo OINT, quando comparado com os animais do grupo SHAM. A glutamina na concentração de 500mg/kg/dia reduziu os níveis de translocação bacteriana para todos os órgãos investigados. Observa-se também que, estes níveis foram estatisticamente iguais aos valores encontrados para os animais do grupo Sham (Tab. 2).

Tabela 2: Biodistribuição da $^{99m}\text{Tc-E.coli}$ (cpm/g) nos animais dos grupos SHAM, OINT e GLUT

Órgãos/Sangue	Sham (cpm/g)	OINT (cpm/g)	GLUT 500mg/kg/dia
Sangue	66,0*	336,3 [†]	122,5*
Fígado	362,50*	1602,2 [†]	746,2*
Baço	60,0*	900,0 [†]	163,3*
Pulmão	210,0*	627,7 [†]	144,4*
NLM	100,0*	1250,0 [†]	287,5*

Valores expressos em mediana (n=7).

Cpm/g = contagens por minuto/grama.

* NS

[†] p < 0,05.

5.5 Inibição da translocação bacteriana pela glutamina

O percentual de inibição da translocação bacteriana observado para os animais que receberam a glutamina 500mg/kg/dia foi de 90,4; 85,4; 84,1; 71,7 e 69,6 para baço, linfonodo, sangue, pulmão e fígado, respectivamente (Figura 9). Esses valores foram obtidos quando os resultados dos animais dos grupos OINT e GLUT foram comparados.

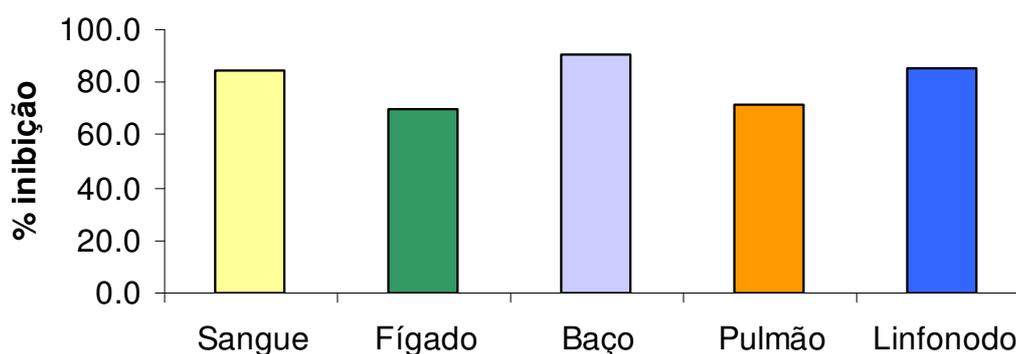


Figura 9: Porcentagem de inibição da translocação bacteriana exercida pela glutamina em relação ao grupo OINT.

n = 7. Dados expressos em mediana. Não houve diferença significativa entre os órgãos ($p \geq 0,05$).

5.6 Validação do modelo experimental e o efeito da glutamina sobre a permeabilidade intestinal

Observa-se pela figura 10 que os animais do grupo OINT apresentaram níveis (% dose) de $^{99m}\text{Tc-DTPA}$, no sangue, estatisticamente maiores do que aqueles observados para os animais do grupo *Sham*, em todos os tempos investigados. Este resultado sugere aumento da permeabilidade intestinal nos animais do grupo OINT. Observa-se ainda que, no tempo de 18 h a permeabilidade intestinal dos animais do grupo OINT foi estatisticamente maior do que aquela observada para os tempos de 4 e 8 h. Por outro lado, não se observou diferença significativa na permeabilidade intestinal no grupo *sham* durante todo o período de investigação.

Os animais tratados com glutamina (500mg/kg/dia) apresentaram redução estatisticamente significativa da permeabilidade intestinal quando comparados com os animais do grupo OINT (Figura 10). Observa-se também que, a permeabilidade

intestinal dos animais dos grupos *Sham* e GLUT foi estatisticamente igual para todos os tempos investigados.

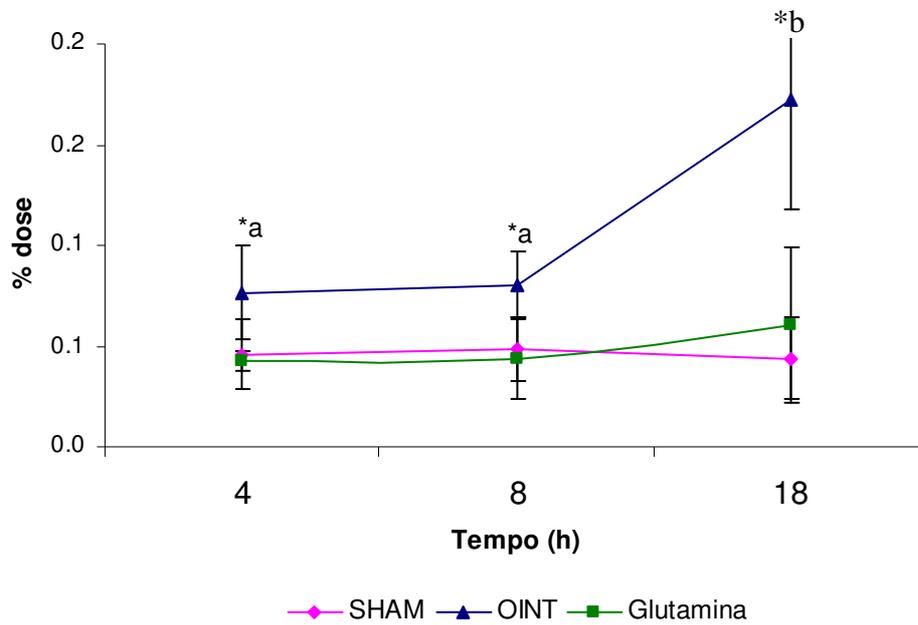


Figura 10: Permeabilidade intestinal dos animais dos grupos *SHAM*, *OINT* e *GLUT*.

Valores expressos em média (n=5).

% dose= [(CPM do sangue*100)/CPM da dose administrada]

(*) significa diferença estatística entre os grupos avaliados ($p < 0,05$).

Letras diferentes indicam diferença estatística entre os tempos do mesmo grupo

Letras iguais indicam que não há diferença estatística entre os tempos do mesmo grupo

6. DISCUSSÃO

A suplementação de glutamina em casos de aumento da demanda pelo nutriente, como no pré-operatório (DING & LI., 2003; BELMONTE *et al.*, 2007) e pós-operatório (CONEJERO *et al.*, 2002), é conhecida como imunonutrição. Essa conduta terapêutica visa manter ou restaurar o “pool” de glutamina intracelular e assim, facilitar o metabolismo fisiológico e a função imunológica (OGUZ *et al.*, 2007).

A glutamina na forma livre muitas vezes não é incluída nas soluções nutricionais devido à sua instabilidade durante o calor de esterilização e a estocagem (COSTER *et al.*, 2003). No entanto, a preparação da glutamina para a utilização por gavagem foi rápida, demandando pouco tempo entre a fase de preparação e a sua utilização. Outro fator também a ser considerado foi a temperatura no preparo dessas formulações. No caso específico a preparação foi submetida a 37°C por apenas cinco minutos. Desta forma, pode-se pensar que as condições ideais para a manutenção da integridade do produto foram asseguradas, o que ficou comprovado com o decorrer dos experimentos.

A ingestão alimentar dos animais que receberam glutamina foi estatisticamente menor do que aquela observada para os demais grupos. Isto pode acontecer devido à distensão gástrica que ocorre com a suplementação de aminoácido, e que aumenta com o volume da administração do mesmo, resultando em redução da ingestão alimentar (SALVALAGGIO *et al.*, 2002). O ganho de peso do grupo glutamina também foi menor do que o observado para os demais grupos. No entanto, estudos prévios em nosso laboratório mostraram que a gavagem não altera a ingestão alimentar nem o ganho de peso em camundongos (dados ainda não publicados). OBEID *et al* (2005), avaliando o efeito da suplementação com glutamina mostraram que a mesma aumenta a síntese de glicogênio em ratos, o que está associado com redução do ganho de peso, embora a ingestão alimentar não tenha sido alterada significativamente. Os resultados obtidos para o coeficiente de eficiência alimentar mostraram redução estatisticamente significativa deste valor para os animais que receberam a suplementação de glutamina ($p < 0,05$). Portanto, este dado corrobora para a redução do ganho de peso e ingestão alimentar observados nos animais tratados com glutamina. No presente estudo, esses resultados não interferiram nos parâmetros avaliados, mostrando, ainda assim, resultados benéficos da glutamina na translocação bacteriana e permeabilidade intestinal.

O presente estudo tem como diferencial a forma da administração da *E.coli* no modelo de obstrução intestinal. Anteriormente, trabalhos realizados com ratos a

bactéria foi inoculada diretamente no lúmen intestinal dos animais após obstrução intestinal (SALVALAGGIO *et al.*, 2002; OLIVEIRA *et al.*, 2006; QUIRINO *et al.*, 2007). Neste trabalho, a bactéria foi administrada por gavagem, 90 minutos antes da operação, de forma a alcançar o trato gastrointestinal baixo até o momento da obstrução. A administração por gavagem apresenta como vantagem, em relação à inoculação direta, a preservação da mucosa intestinal contra rupturas que, eventualmente, podem acontecer no momento da inoculação, uma vez que a mucosa intestinal do camundongo é muito delgada e pode facilmente ser rompida. Experimentos realizados pelo nosso grupo mostraram que, em camundongos, a inoculação direta da bactéria promoveu a ruptura da alça intestinal, inviabilizando a continuação dos estudos.

Os resultados da biodistribuição da ^{99m}Tc -*E.coli* nos animais do grupo OINT mostraram aumento estatisticamente significativo na captação da ^{99m}Tc -*E.coli* pelo sangue e por todos os órgãos investigados, quando comparado com os animais do grupo SHAM. Estes dados confirmam a eficácia do modelo de obstrução intestinal em promover a translocação da ^{99m}Tc -*E.coli*. Estudos anteriores, realizados pelo mesmo grupo de pesquisadores deste trabalho, mostraram que o modelo de obstrução intestinal, em ratos, promoveu a translocação bacteriana (OLIVEIRA *et al.*, 2006; QUIRINO *et al.*, 2007). Sabe-se também, pela literatura, que a obstrução, tanto mecânica quanto funcional, está associada a amplo espectro de complicações sistêmicas que são decorrentes do supercrescimento bacteriano, da translocação bacteriana e, conseqüentemente, da ativação da resposta inflamatória (MADL & DRUML, 2003). O'BOYLE *et al* (1998), avaliando pacientes que passaram por laparotomia, mostraram que a translocação bacteriana é um fenômeno presente na obstrução intestinal distal, apresentando prevalência de 15%. SAMEL *et al.* (2002) atribuíram à obstrução intestinal e à isquemia as condições clínicas mais comuns para o desenvolvimento da translocação bacteriana e sepse. Assim, os resultados obtidos, evidenciando a translocação bacteriana em modelo de obstrução intestinal estão em sintonia com trabalhos descritos na literatura.

Por outro lado, também foi observado nível reduzido de translocação da ^{99m}Tc -*E.coli* nos animais do grupo "sham". Alguns pesquisadores têm relatado que a translocação de bactérias, em quantidades pequenas, é um fenômeno fisiológico e espontâneo, de fundamental importância como estímulo para o sistema reticuloendotelial, especialmente para as células de Kupffer no fígado (CHIN *et al.*, 2007; BALZAN *et al.*, 2007). Assim, pode-se considerar, como fisiológico, o reduzido

nível de translocação observado para os animais do grupo SHAM, uma vez que estes animais sofreram apenas uma simulação da operação.

A glutamina, administrada por gavagem, foi capaz de reduzir estatisticamente os níveis de translocação da ^{99m}Tc -*E.coli* para o sangue e todos os órgãos investigados, quando comparado com os animais do grupo OINT. SALVALAGGIO *et al.* (2002), em estudo experimental com ratos, mostraram que 1,5g/kg/dia de glutamina não impediu a translocação bacteriana, após obstrução intestinal, em ratos desafiados com *E.coli*, entretanto, foi capaz de impedir que a bactéria se disseminasse pelo organismo. Pesquisadores do nosso grupo, trabalhando com obstrução intestinal em ratos, mostraram que 500mg/kg/dia de glutamina reduziu a translocação da ^{99m}Tc -*E.coli* para nódulos linfáticos mesentéricos, fígado, baço e pulmão. Entretanto, o nível de translocação dos animais que receberam glutamina não foi semelhante àquele observado para os animais do grupo *Sham* (OLIVEIRA *et al.*, 2006). A possível explicação para os níveis fisiológicos de translocação, ao contrário do observado em trabalhos anteriores (SALVALAGGIO *et al.*, 2002; OLIVEIRA *et al.*, 2006) é a administração da bactéria por gavagem, que evita a manipulação extra do intestino para a inoculação direta da mesma no lúmen intestinal e reproduz de forma mais fiel as condições que encontramos na clínica. De acordo com MELIS *et al.* (2004) e AVENELL (2006), a glutamina age como substrato energético preferencial para enterócitos, reduzindo a translocação bacteriana através da parede intestinal e, conseqüentemente, reduzindo o risco de sepse já que o intestino é importante no desenvolvimento de complicações graves nos casos de doença crítica, incluindo trauma, queimadura e choque. Portanto, fica evidente com os dados obtidos e com aqueles registrados na literatura, de que a glutamina apresenta importante papel na redução da translocação bacteriana.

Em relação à função da glutamina na porcentagem de inibição da translocação bacteriana, observou-se no atual estudo que a glutamina foi mais eficiente em reduzir a translocação bacteriana para os órgãos linfóides, como baço e linfonodo, podendo representar uma evidência da proteção imunológica, embora não tenha sido encontrada diferença significativa na inibição entre os órgãos avaliados. A glutamina é conhecida por modular a resposta imunológica das células e a produção de citocinas, como IFN- γ e TNF (ROTH *et al.*, 2002), agindo como agente trófico para o “*turnover*” de linfócitos e mastócitos, além de ser precursora da glutathione (GARCIA-de-LORENZO *et al.*, 2003). Isto, provavelmente poderia explicar o maior grau de inibição da translocação para órgãos tais como baço e linfonodo mesentérico.

Os dados obtidos nos estudos de permeabilidade intestinal utilizando o ^{99m}Tc -DTPA mostraram níveis estatisticamente maiores desse marcador no sangue dos animais que sofreram obstrução intestinal, quando comparado com os animais do grupo *sham*. Ressalta-se que, o maior grau de permeabilidade, nas condições estudadas, foi observado 18 horas após a obstrução intestinal ($p=0,02$). A permeabilidade aumentada, no tempo de 18h, provavelmente explica o alto nível de translocação bacteriana que foi observado nos animais do grupo OINT (Tabela 2). A obstrução intestinal leva à distensão, por acúmulo de gases, das alças intestinais resultando em aumento da pressão hidrostática intraluminal, comprometendo os vilos linfáticos da mucosa intestinal com desenvolvimento de linfedema na parede intestinal (HAYANGA *et al.*, 2005). Assim, pode-se sugerir que no modelo experimental utilizado existiu importante resposta inflamatória do intestino, aumentando a permeabilidade da mucosa. Desta forma, com a falência da barreira intestinal, a ^{99m}Tc -*E.coli* migrou do lúmen intestinal para outros órgãos como nódulos linfáticos mesentéricos, fígado, baço e pulmões. SOETERS *et al.* (2007) considera que, a quantificação da permeabilidade intestinal é necessária na avaliação do potencial deste fenômeno na patogênese de doenças, como também na avaliação da gravidade das doenças intestinais e, nos estados inflamatórios generalizados. Assim, os resultados obtidos revestem de importância para a compreensão do processo de translocação bacteriana em modelo de obstrução intestinal.

No caso específico, optou-se por medir a radioatividade oriunda do complexo ^{99m}Tc -DTPA no sangue e não na urina, conforme é citado por muitos pesquisadores (CONEJERO *et al.*, 2002; DING and LI., 2003; QUAN *et al.*, 2004). Esta preferência deve-se ao fato de que o volume urinário do camundongo é bastante reduzido, dificultando a coleta das amostras e, conseqüentemente, gerando erros. KATOUZIAN *et al.* (2005) realizaram estudo comparativo em camundongos avaliando a permeabilidade intestinal com o uso de lactulose e rafinose. Neste estudo, os autores mostraram que a avaliação no sangue apresentou vantagens com relação à urina, devido à sua simplicidade e menor custo. Por outro lado, existem na literatura vários trabalhos investigando a permeabilidade intestinal, entretanto, nenhum utilizou o ^{99m}Tc -DTPA nos estudos envolvendo suplementação com glutamina (CONEJERO *et al.*, 2002; LI *et al.*, 2002; DING and LI, 2003; KOZAR *et al.*, 2004a; KOZAR *et al.*, 2004b; QUAN *et al.*, 2004). Assim, a opção de trabalhar com a determinação de ^{99m}Tc -DTPA no sangue e não na urina para ensaios de permeabilidade intestinal representa um método alternativo e inovador.

A permeabilidade intestinal dos animais que sofreram obstrução intestinal e receberam glutamina foi estatisticamente reduzida quando comparada com os animais do grupo OINT. Observou-se ainda que, a permeabilidade intestinal dos animais do grupo tratado foi estatisticamente igual àquela observada para os animais do grupo *sham*, sugerindo que a glutamina quando suplementada na dieta, antes da injúria, pode prevenir danos à mucosa. A glutamina age como a principal fonte endógena de energia para os enterócitos, colonócitos e células do sistema imunológico, mantendo desta forma a integridade da barreira intestinal (MACFIE, 2000; SALVALAGGIO and CAMPOS, 2002; MACFIE, 2004a). LI *et al.* (2002) avaliando o dano à mucosa intestinal após queimadura, isquemia e reperfusão do intestino em animais, verificaram que a suplementação de glutamina pode melhorar a mucosa intestinal após essa injúria. Estudos têm demonstrado que a administração de glutamina antes ou imediatamente após operações, queimaduras ou concomitante à administração de nutrição parenteral, tem efeito protetor prevenindo ou reduzindo a intensidade de aumento da permeabilidade intestinal (KOZAR *et al.*, 2004a; De-SOUZA and GREENE, 2005; MARGARITIS *et al.*, 2005). Portanto, a redução da permeabilidade intestinal, observada neste trabalho devido à ação da glutamina, encontra-se em consonância com dados descritos na literatura.

Os níveis de radioatividade presentes na tireóide indicam favoravelmente a estabilidade da ligação entre o átomo de tecnécio e a *E.coli*. Sabe-se que, quando átomos de tecnécio encontram-se livres (TcO_4^-) na circulação estes são captados pela glândula tireóide devido à semelhança com os átomos de iodo, no que respeito a massa atômica e a carga (SMITH *et al.*, 1990; RAMOS *et al.*, 2002). Desta forma, como o nível de radioatividade observado na tireóide foi inferior ao observado para a radiação de fundo (BKG) pode-se deduzir que, praticamente, não existia átomos de tecnécio livres na circulação, sugerindo que não houve ruptura da ligação desses átomos com a bactéria. Isto é de fundamental importância, pois quando se observa contagem de radioatividade (cpm) nos tecidos investigados e esta foi provavelmente devido a bactéria íntegra marcada ou fragmentos desta também marcados.

De acordo com os resultados apresentados, a glutamina administrada por gavagem na concentração de 500mg/kg/dia foi capaz de reduzir a translocação bacteriana a níveis fisiológicos. Um dos fatores que contribuíram para este resultado foi a redução da permeabilidade intestinal nos animais tratados com glutamina. Vale ressaltar que, apesar da menor ingestão alimentar e menor ganho de peso no grupo suplementado por gavagem, em relação aos demais, este fato não comprometeu os

efeitos benéficos da glutamina no modelo de obstrução intestinal em camundongos. Estudos posteriores serão necessários para avaliar os prováveis mecanismos da ação da glutamina na redução da translocação bacteriana.

7 CONCLUSÕES

- O modelo de obstrução intestinal, em camundongos, mostrou ser adequado para estudos de translocação bacteriana;
- A suplementação com glutamina, por gavagem, na concentração de 500mg/kg/dia foi capaz de reduzir a translocação bacteriana para níveis fisiológicos em todos os tecidos investigados;
- A obstrução intestinal promove aumento da permeabilidade da mucosa do intestino;
- O emprego de ^{99m}Tc -DTPA e a determinação dos níveis de radioatividade no sangue mostraram-se apropriados para estudos de permeabilidade intestinal;
- A suplementação com glutamina, por gavagem, na concentração de 500mg/kg/dia para os animais que sofreram obstrução intestinal reduziu a permeabilidade intestinal a níveis fisiológicos.

8 PERSPECTIVAS FUTURAS

- Verificar possíveis influências da via de administração, oral e enteral, na ação da L-glutamina no processo de translocação bacteriana;
- Analisar a integridade da mucosa intestinal por meio de cortes histológicos da mesma em animais tratados e não tratados com glutamina, após a obstrução intestinal;
- Investigar o papel do óxido nítrico na ação da glutamina, bloqueando sua via de ação pelo uso de inibidor da enzima óxido nítrico sintase;
- Avaliar o perfil imunológico incluindo IgAs e citocinas pró e anti-inflamatória em animais tratados e não tratados com glutamina, após a obstrução intestinal.

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACHESON, D. W. K. and LUCCIOLI, S. Mucosal immune responses. *Best Pract. & Res. Clin. Gastroenterol.*, v. 18, p. 387-404, 2004.
- ANDREWS, F. J. and GRIFFITHS, R. D. Glutamine: essential for immune nutrition in critically ill. *Br. J. Nutr.*, v. 87, p.S3-S8, 2002.
- ARRIETA, M. C.; BISTRITZ, L.; MEDDINGS, J. B. Alterations in Intestinal Permeability. *Gut*, v. 55, p. 1512-20, 2006.
- AVENELL, A. Glutamine in critical care: current evidence from systematic reviews. *Proceed. Nutr. Soc.*, v. 65, p. 236-41, 2006.
- BALZAN, S.; QUADROS, C. A.; CLEVA, R.; ZILBERSTEIN, B.; CECCONELLO, I. Bacterial translocation: overview of mechanisms and clinical impact. *Journal of Gastroenterol. Hepatol.*, v. 22, p. 464-71, 2007.
- BELMONTE, L.; COEFFIER, M.; PESSOT, L.; BARRACHINA, O.; HIRON, M.; LEPLINGARD, A.; LEMELAND, J. F.; HECKETSWEILER, B.; DAVEAU, M.; DUCROTTÉ, P.; DECHELOTTE, P. Effects of glutamine supplementation on gut barrier, glutathione content and acute phase response in malnourished rats during inflammatory shock. *World J. Gastroenterol.*, v. 13, p. 2833-40, 2007.
- BERG, R. D. Bacterial translocation from the gastrointestinal tract. *Trends Microbiol.*, v.3, p. 149 – 154, 1995.
- BERG, R. D. Mechanisms promoting bacterial translocation from the gastrointestinal tract. In: OLD HERBORN UNIVERSITY SEMINAR MONOGRAPH. Herborn – Diel: Department of Microbiology and Immunology, p. 31-33, 2001.
- BIOLO, G.; ZORAT, F.; ANTONIONE, R.; CIOCCHI, B. Muscle glutamine depletion in the intensive care unit. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, v.37, p. 2169–2179, 2005.
- BJARNASON, I.; MACPHERSON, A.; HOLLANDER, D. Intestinal Permeability: An Overview. *Gastroenterol.*, v. 108, p. 1566- 1581, 1995.

- BODE, B. P. Recent molecular advances in mammalian glutamine transport. *J. Nutr.*, v. 131, p. 2475S–2485S, 2001.
- BRESCIA M. A. Obstrução Intestinal. *Acta Cir. Bras.*, v.17, 2002.
- BROWN, S. R. and ADAM, I. J. Intestinal Obstruction. *Surgery*, p. 157-162, 2002.
- CHANG, T.; LU, R.; TSAI, L. Glutamine Ameliorates Mechanical Obstruction-Induced Intestinal Injury. *J. Surg. Res.*, v.95, p.133–140, 2001.
- CHIN, K. F.; KALLAM, R.; O`BOYLE, C.; MACFIE, J. Bacterial Translocation May Influence the Long-Term Survival in Colorectal Cancer Patients. *Dis Colon Rectum*, v. 50, p. 323–30, 2007.
- CHIOLERO, R. L.; BERGER, M. M. Improving nutritional support in critically ill septic patients: glutamine alone or in combination? *Nutrition*, v. 18, p. 723 – 724, 2002.
- CLAVEL, T. and HALLER, D. Molecular Interactions Between Bacteria, the Epithelium, and the Mucosal Immune System in the Intestinal Tract: Implications for Chronic Inflammation. *Curr. Issues Intest. Microbiol.*, v. 8, p. 25–43, 2007.
- CONEJERO, R.; BONET, A.; GRAU, T.; ESTEBAN, A.; et al. Effect of a Glutamine-Enriched Enteral Diet on Intestinal Permeability and Infectious Morbidity at 28 Days in Critically Ill Patients With Systemic Inflammatory Response Syndrome: A Randomized, Single-Blind, Prospective, Multicenter Study. *Nutrition*, v.18, p.716 – 21, 2002.
- COSTER, J.; McCAULEY, R.; HALL, J. Role of specific amino acids in nutritional support. *ANZ J. Surg.*, v. 73, p. 846-49, 2003.
- CURI, R.; LAGRANHA, C. J.; DOI, S. Q.; SELLITTI, D. F.; PROCOPIO, J.; et al. Molecular Mechanisms of Glutamine Action. *J. Cell. Physiol.*, v. 204, p. 392–401, 2005.
- CURI, R.; NEWSHOLME, P.; PROCÓPIO, J.; LAGRANHA, C.; GORJÃO, R.; PITHON-CURI, T. C. Glutamine, gene expression, and cell function. *Frontiers Biosc.*, v.12, p. 344-357, 2007.

- DE-SOUZA, D. A. and GREENE, L. J. Intestinal permeability and systemic infections in critically ill patients: Effect of glutamine. *Crit Care Med*, v. 33, p. 1125-35, 2005.
- DING, L. A. and LI, J. S. Effects of glutamine on intestinal permeability and bacterial translocation in TPN-rats with endotoxemia. *World J Gastroenterol*, v. 9, p.1327-1332, 2003.
- DINIZ, S.O.F. *Distribuição da Escherichia coli marcada com 99m-technécio em ratos com icterícia obstrutiva experimental*. Belo Horizonte: Faculdade de Farmácia da UFMG, 1998. 78 p. (Dissertação, Mestrado em Ciências Farmacêuticas).
- DINIZ, S.O.F.; RESENDE, B.M.; NUNAN, E.A.; SIMAL, C.J.R.; CARDOSO, V.N. ^{99m}Techneium labelled *Escherichia coli*. *Appl. Radiat. Isot.*, v. 51, p. 33-36, 1999.
- FILLMANN, H.; KRETZMANN, N. A.; SAN-MIGUEL, B.; LLESUY, S.; MARRONI, N.; GONZÁLEZ-GALLEGO, J.; TUNON, M. J. Glutamine inhibits over-expression of pro-inflammatory genes and down-regulates the nuclear factor kappaB pathway in an experimental model of colitis in the rat. *Toxicology*, 2007 (In Press).
- FINK, M. P. Intestinal epithelial hypermeability: update on the pathogenesis of gut mucosal barrier dysfunction in critical illness. *Cur. Opin Crit Care*, v. 9, p. 143-151, 2003.
- FLARING, U. B.; ROOYACKERS, O. E.; HEBERT, C.; BRATEL, T.; HAMMARQVIST, F.; WERNERMAN, J. Temporal changes in whole-blood and plasma glutathione in ICU patients with multiple organ failure. *Intens. Care Med*, v.31, p.1072–78, 2005.
- FLARING, U. B.; ROOYACKERS, O. E.; WERNERMAN, J HAMMARQVIST, F. Glutamine attenuates post-traumatic glutathione depletion in human muscle. *Clin Sci*, v.104, p. 275–282, 2003.
- GARCIA-DE-LORENZO, A.; ZARAZAGA, A., GARCIA-LUNA, P. P.; GONZALEZ-HUIX, F.; *et al*. Clinical Evidence for Enteral Nutritional Support With Glutamine: A Systematic Review. *Nutrition*, v. 19, p.805– 11, 2003.
- GATT, M.; REDDY, B. S.; MACFIE, J. Bacterial translocation in the critically ill - evidence and methods of prevention. *Aliment Pharmacol Therap.*, v.25, p.741-757, 2007.

- GOEL, S. and GANGOLLY, J. S. On decision support for distributed systems protection: A perspective based on the human immune response system and epidemiology *Intern J Inform Manag.*, v. 27, p.266–278, 2007.
- HAYANGA, A. J.; BASS-WILKINS, K.; BULKLEY, G. B. Current Management of Small-Bowel Obstruction. *Adv Surg*, vol 39, p. 1-33, 2005.
- HWANG, J. M.; CHAN, D. C.; CHANG, T. M.; TSAO, T. Y.; *et al.* Effects of Oral Arginine and Glutamine on Radiation-Induced Injury in the Rat. *J Surg Res*, v.109, p. 149–154, 2003.
- IKEDA, S.; KUDSK, K. A.; LE, T. *et al.* Glutamine improves impaired cellular exudation and polymorphonuclear neutrophil phagocytosis induced by total parenteral nutrition after glycogen-induced murine peritonitis. *Shock*, v.19, p.50–54, 2003.
- IWASHITA, S.; WILLIAMS, P.; JABBOUR, K.; UEDA, T.; KOBAYASHI, H.; BAIER, S.; FLAKOLL, P. J. Impact of glutamine supplementation on glucose homeostasis during and after exercise. *J Appl Physiol.*, v. 99, p.1858–65, 2005.
- JORGENSEN, V. L.; NIELSEN, L. S.; ESPERSEN, K.; PERNER, A. Increased colorectal permeability in patients with severe sepsis and septic shock. *Intens. Care Med.*, v. 32, p. 1790-1796, 2006.
- KATOUZIAN, F.; SBLATTERO, D.; NOT, T.; TOMMASINI, A.; ELENA GIUSTO, E.; MEIACCO, D.; STEBEL, M.; MARZARI, R. FASANO, A.; VENTURA, A. Dual sugar gut-permeability testing on blood drop in animal models. *Clin Chim Acta*, v. 352, p. 191–197, 2005.
- KHOGALI, S. E. O.; PRINGLE S. D.; WERYK, B. V.; RENNIE, M. J. Is glutamine beneficial in ischemic heart disease? *Nutrition*, v.18, p.123–126, 2002.
- KOZAR, R. A.; SCHULTZ, S. G.; BICK, R. J.; POINDEXTER, B. J.; ROLAND DESOIGNIE, R.; MOORE, F. A. Enteral glutamine but not alanine maintains small bowel barrier function after ischemia/reperfusion injury in rats. *Shock*, v. 21, p. 433–37, 2004a.
- KOZAR, R. A.; VERNER-COLE, E.; SCHULTZ, S. G. SATO, N.; BICK, R. J.; DESOIGNIE, R.; POINDEXTER, B. J.; MOORE, F. A. The Immune-Enhancing

- Enteral Agents Arginine and Glutamine Differentially Modulate Gut Barrier Function following Mesenteric Ischemia/Reperfusion. *J Trauma*, v. 57, p. 1150–1156, 2004b.
- KUMAR, S.; KUMAR, R.; SHARMA, S.B.; JAIN, B.K. Effect of oral glutamine administration on oxidative stress, morbidity and mortality in critically ill surgical patients. *Ind J Gastroenterol*, v. 26, p. 70-73, 2007.
- LABOW, B. I. and SOUBA, W. W. Glutamine. *World J. Surg.*, v. 24, p. 1503-13, 2000.
- LAI, Y. N.; YEH, S. L.; LIN, M. T.; SHANG, H. F.; YEH, C. L.; CHEN, W. J. Glutamine Supplementation Enhances Mucosal Immunity in Rats With Gut-Derived Sepsis. *Nutrition*, v.20, p.286 –91, 2004.
- LI, J. Y.; LU, Y.; HU, S.; SUN, D.; YAO, Y. M. Preventive effect of glutamine on intestinal barrier dysfunction induced by severe trauma. *World J Gastroenterol*, v. 8, p. 168-171, 2002.
- LIMA, M. M. R.; MELLO, M. A. R.; CURI, R. Walker 256 tumour growth causes marked changes of glutamine metabolism in rat small intestine. *Cell Biochem Funct.*, v.20, p.107–113, 2002.
- LJUNGDAHL, M.; LUNDHOLM, M.; KATOULI, M.; RASMUSSEN, I.; ENGSTRAND, L.; HAGLUND, U. Bacterial translocation in experimental shock is dependent on strains in the intestinal flora. *Scand J Gastroenterol.*, v. 35, p. 389-97, 2000.
- MACFIE, J. and McNAUGHT, C. Glutamine and gut barrier function. *Nutrition*, v. 18, p. 433-34, 2002.
- MACFIE, J. Current status of bacterial translocation as a cause of surgical sepsis. *Br. Med. Bull*, v. 71, p. 1-11, 2004 (b).
- MACFIE, J. Enteral Versus Parenteral Nutrition: The Significance of Bacterial Translocation and Gut-Barrier Function. *Nutrition*, v. 16, p. 606-11, 2000.
- MACFIE, J. European round table: the use of immunonutrients in critically ill. *Clin Nutr*, v. 23, p. 1426-29, 2004 (a).

- MACFIE, J.; O'BOYLE, C.; MITCHELL, C. J.; BUCKLEY, P. M.; JOHNSTONE, D.; SUDWORTH, P. Gut origin of sepsis: a prospective study investigating associations between bacterial translocation, gastric microflora, and septic morbidity. *Gut*, v.45, p.223-228, 1999.
- MACFIE, J.; REDDY, B. S.; GATT, M.; JAIN, P. K.; SOWDI, R.; MITCHELL, C. J. Bacterial translocation studied in 927 patients over 13 years. *Br. J. Surg.*, v. 93, p. 87-93, 2006.
- MACUTKIEWICZ, C. & CARLSON, G. L. Acute abdomen: intestinal obstruction. *Surgery*, 23, p. 208-12, 2005.
- MADL, C.; DRUML, W. Systemic consequences of ileus. *Best Prac Res Clin Gastroenterol*, v.17, p.445–56, 2003.
- MARGARITIS, V. G.; FILOS, K. S.; MICHALAKI, M. A. ET AL. Effect of oral glutamine administration on bacterial translocation, endotoxemia, liver and ileal morphology, and apoptosis in rats with obstructive jaundice. *World J Surg*, v. 29, p.1329–1334, 2005.
- MATES, J. M.; GÓMEZ, C. P.; CASTRO I. N.; ASENJO, M.; MÁRQUEZ, J. Glutamine and its relationship with intracellular redox status, oxidative stress and cell proliferation/death. *Int J Biochem Cell Biol.*, v.34, p.439–458, 2002.
- McGIVAN, J. D.; BUNGARD, C. I. The transport of glutamine into mammalian cells. *Frontiers Biosc*, v. 12, p. 874-882, 2007.
- MELIS, G.C.; WENGEL, N.; BOELEN, P. G.; LEEUWEN, P. A. M. Glutamine: recent developments in research on the clinical significance of glutamine. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, v. 7, p.59-70, 2004.
- MOORE, F. A. The role of the gastrointestinal tract in postinjury multiple organ failure. *Am. J. Surg.*, v.178 , p. 449–453, 1999.
- MOREIRA, J. R., H.; MOREIRA, H.; ISAAC, R. R.; CURI, A.; FERNANDES, A. C.; MASCARENHAS, J. C. S.; MOREIRA, J. P. T. Obstrução Intestinal – Análise Retrospectiva da Etiologia e Morbi-mortalidade no Hospital de Urgências de Goiânia (HUGO). *Rev Bras Coloproct*, v.25, p.137-145, 2005.

- MOSKOVITZ, B.; KATZ, Y.; SINGER, P.; NATIV, O.; ROSENBERG, B. Glutamine metabolism and utilization: relevance to major problems in health care. *Pharmacol. Res.*, v. 30, p. 61- 71, 1994.
- MOURELLE, M.; CASELLAS, F.; GUARNER, F. *et al.* Induction of nitric oxide synthase in colonic smooth muscle from patients with toxic megacolon. *Gastroenterology*, v.109, p. 1497–1502, 1995.
- NAABER, P.; SMIDT, I.; TAMME, K.; LIIGANT, A.; TAPPER, H.; MIKELSAAR, M.; TALVIK, R. Translocation of indigenous microflora in an experimental model of sepsis. *J. Med. Microbiol.*, v. 49, p. 431-39, 2000.
- NETTELBLADT, C. G.; KATOULI, M.; VOLPE, A. *et al.* Increases the number of coliform bacteria in the caecum and induces bacterial adherence to caecal epithelium in rats. *Europ J Surg.*, v. 163, p.135-142, 1997.
- NEWSHOLME, P. Why Is L-Glutamine Metabolism Important to Cells of the Immune System in Health, Postinjury, Surgery or Infection? *J. Nutr.*, v.131, p. 2515S–2522S, 2001.
- NEWSHOLME, P.; LIMA, M. M. R.; J. PROCOPIO, J.; PITHON-CURI T. C.; DOI S. Q.; BAZOTTE, R. Q.; CURI, R. Glutamine and glutamate as vital metabolites. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, v.36, p.153-63, 2003.
- NOSE, K.; WASA, M.; OKADA A. Gut Glutamine Metabolism at Different Stages of Sepsis in Rats. *Surg Today*, v.32, p.695–700, 2002.
- O`BOYLE, C. J.; MACFIE, J.; MITCHELL, C. J.; JOHSTONE, D.; SAGAR, P. M.; SEDMAN, P. C. Microbiology of bacterial translocation in humans. *Gut*, v. 42, p. 39-35, 1998.
- O`HARA, A.M. and SHANAHAN, F. The gut as a forgotten organ. *Europ Molec Biol Organiz.*, v. 7, p. 688-92, 2006.
- OBEID, O. A.; BITTAR, S. T.; HWALLA, N.; EMERY, P. W. Effect of diet supplementation with glutamine, dihydroxyacetone, and leucine on food intake, weight gain, and postprandial glycogen metabolism of rats. *Nutrition*, v. 21, p. 224-29, 2005.

- OGUZ, M.; KEREM, M.; BEDIRLI, A.; MENTES, B. B.; SAKRAK, O.; SALMAN, B.; BOSTANCI, H. L-Alanin-L-glutamine supplementation improves the outcome after colorectal surgery for cancer. *Colorec Dis.*, v. 9, p. 515–520, 2007.
- OLIVEIRA, M. A. *Efeito da glutamina na translocação bacteriana em ratos*. Belo Horizonte: Faculdade de farmácia da UFMG. 2004. 85p. (Dissertação de mestrado em Ciência de Alimentos).
- OLIVEIRA, M. A. LEMOS, D. S.; DINIZ, S. O. F.; COELHO, J. V. CARDOSO, V. N. Prevention of bacterial translocation using glutamine: a new strategy of investigation. *Nutrition*, v. 22, p. 419-24, 2006.
- PLAUTH, M.; RAIBLE, A.; VIEILLARD-BARON, D.; BAUDER-GROß, D.; HARTMANN, F. Is glutamine essential for the maintenance of intestinal function? A study in the isolated perfused rat small intestine. *Int J Colorect Dis.*, v.14, p.86–94, 1999.
- POWELL-TUCK, J. Nutritional interventions in critical illness. *Proceedings of the Nutrition Society*, v. 66, p. 16-24, 2007.
- QUAN, Z.; YANG, C.; LI, N.; LI, J. Effect of glutamine on change in early postoperative intestinal permeability and its relation to systemic inflammatory response. *World J Gastroenterol*, v. 10, p. 1992 – 94, 2004.
- QUIRINO, I. E. P.; CORREIA, M. I. T. D.; CARDOSO, V. N. The impact of arginine on bacterial translocation in an intestinal obstruction model in rats. *Clin Nutr*, v.26, p. 335–340, 2007.
- RAMOS, C. D.; WITTMANN, D. E. Z.; ETCHEBEHERE, E. C. S. C. *et al.* Thyroid uptake and scintigraphy using ^{99m}Tc pertechnetate: standardization in normal individuals. *Sao Paulo Med. J.*, v. 120, p. 45-48, 2002.
- REDDY, B. S.; GATT, M.; SOWDI, R.; MACFIE, J. Surgical manipulation of the large intestine increases bacterial translocation in patients undergoing elective colorectal surgery. *Colorec Dis.*, v.8, p.596–600, 2006.

- REDDY, B. S.; MACFIE, J.; GATT, M.; MACFARLANE-SMITH, L.; BITZOPOULOU, K.; SNELLING, A. Commensal bacteria do translocate across the intestinal barrier in surgical patients. *Clin Nutr*, v. 26, p. 208-15, 2007.
- RESCIGNO, M.; URBANO, M.; VALZASINA, B.; FRANCOLINI, M.; ROTTA, G.; BONASIO, R.; GRANUCCI, F.; KRAEHENBUHL, J. P.; RICCIARDI-CASTAGNOLI, P. Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria. *Nature Immunol*, v.2, p. 361 – 367, 2001.
- ROTH, E.; OEHLER, R.; MANHART, N.; EXNER, R.; WESSNER, B.; STRASSER, E.; SPITTLER, A. Regulative potencial of glutamine-relation to glutathione metabolism. *Nutrition*, v. 18, p. 217-21, 2002.
- SALVALAGGIO, P. R. O. & CAMPOS, A. C. L. Bacterial Translocation and Glutamine. *Nutrition*, v. 18, p. 435-36, 2002.
- SALVALAGGIO, P. R. O.; NETO, C. Z.; TOLAZZI, A. R. D.; GASPARETTO, E. L.; et al. Oral Glutamine Does not Prevent Bacterial Translocation in Rats Subjected to Intestinal Obstruction and *Escherichia coli* Challenge but Reduces Systemic Bacteria Spread. *Nutrition*, v.18, p.334 –337, 2002.
- SALZEDAS-NETTO, A. A.; SILVA, R. M.; MARTINS, J. L.; MENCHACA-DIAZ, J. L.; BUGNI, G. M.; WATANABE, A. Y.; SILVA, F. J. P.; FAGUNDES-NETO, U.; MORAIS, M. B.; KOH, I. H. J. Can Bacterial Translocation Be a Beneficial Event? *Transplant. Proc.*, v.38, p.1836–1837, 2006.
- SAMEL, S.; KEESE, M.; KLECZKA, M.; LANIG, S.; GRETZ, N.; HANFNER, M.; STURM, J.; POST, S. Microscopy of bacterial translocation during small bowel obstruction and ischemia in vivo – a new animal model. *BMC Surgery*, v. 2, p. 6-11, 2002.
- SAMIR, J. A.; ALENCAR, S. S. S.; MEDEIROS, A. C.; DINIZ, S. O. F.; CARDOSO, V.N.; BRANDT, C. T. Translocation of 99mTc labelled bacteria after intestinal ischemia and reperfusion. *Acta Cir Bras.*, v.19, p. 328-32, 2004.

- SANO, T.; AJIKI, T.; TAKEYAMA, Y.; KURODA, Y. Internal biliary drainage improves decreased number of gut mucosal T lymphocytes and MAdCAM-1 expression in jaundiced rats. *Surgery*, v. 136, p. 693 – 99, 2004.
- SMITH, J. J.; CROFT, B. Y.; BROOKEMAN, V. A.; TEATES, C. D. Estimation of 24-hour thyroid uptake of I-131 sodium iodide using a 5-minute uptake of technetium-99m pertechnetate. *Clin Nucl Med*, v. 15, p. 80-83, 1990.
- SOETERS, P. B.; LUYER, M. D. GREVE, M. D. BUURMAN, W. A. The significance of bowel permeability. *Curr. Opin Clin Nutr Metab Care*, v. 10, p. 632-38, 2007.
- STAGG, A. J.; HART, A. L.; KNIGHT, S. C.; KAMM, M. A. The dendritic cell: its role in intestinal inflammation and relationship with gut bacteria. *Gut*, v. 52, p. 1522–1529, 2003.
- SUN, Z.; WANG, X.; ANDERSSON, R. Role of intestinal Permeability in monitoring mucosal barrier function. *Digest Surg*, v. 15, p. 386 – 97, 1998.
- TAPIERO, H.; MATHÉ, G.; COUVREUR, P.; TEW, K. D. Glutamine and glutamate. *Biomedic Pharmacother.*, v.56, p. 446-457, 2002.
- THOMAS, S.; PRABHU, R.; BALASUBRAMANIAN, K. A. Surgical manipulation of the intestine and distant organ damage—protection by oral glutamine supplementation. *Surgery*, v.137, p. 48-55, 2005.
- TOWNSEND, D. M.; TEW, K. D.; TAPIERO, H. The importance of glutathione in human disease. *Biomed. Pharmacother.*, v.57, p.145–55, 2003.
- VARY, T. C. and LYNCH, C. J. Biochemical approaches for nutritional support of skeletal muscle protein metabolism during sepsis. *Nutr. Res. Rev.*, v.17, p.77-88, 2004.
- VELASCO N.; HERNANDEZ, G.; WAINSTEIN, C.; CASTILLO, L.; MAIZ, A.; LOPEZ, F.; GUZMAN, S.; BUGEDO, G. ACOSTA, A. M.; BRUHN, A. Influence of Polymeric Enteral Nutrition Supplemented With Different Doses of Glutamine on Gut Permeability in Critically Ill Patients. *Nutrition*, v.17, p. 907–11, 2001.

- WATFORD, M.; DPHIL, CHELLARAJ, V.; ISMAT, A.; BROWN, P.; RAMAN, P. Hepatic Glutamine Metabolism. *Nutrition*, v.18, p. 301–303, 2002.
- WESTMAN, B.; JOHANSSON, G.; SODERLUND, K.; J-L, L.; WERNERMAN, J.; HAMMARQVIST, F. Study of ischemia and reperfusion during elective abdominal aortic aneurysm surgery on glutathione, amino acids, and energy rich compounds in human skeletal muscle. *Ann Vasc Surg*, v. 20, p. 99–105, 2006.
- WHITE, J. S.; HOPER, M.; PARKS, R. W.; CLEMENTS, W.D.B.; DIAMOND, T. Patterns of bacterial translocation in Experimental Biliary Obstruction. *J Surg Res.*, v. 132, p. 80-84, 2006.
- WIEST, R. Bacterial translocation. *Biosc Microflor*, v. 24, p. 61-90, 2004.
- WIEST, R. and RATH, H. C. Bacterial translocation in the gut. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*, v. 17, p. 397–425, 2003.
- WISCHMEYER, P. E. Glutamine: role in gut protection in critical illness. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, v. 9, p. 607–612, 2006.
- WISCHMEYER, P. E.; LYNCH, J.; LIEDEL, J.; WOLFSON, R.; RIEHM, J.; GOTTLIEB, L.; KAHANA, M. Glutamine administration reduces Gram-negative bacteremia in severely burned patients: A prospective, randomized, double-blind trial versus isonitrogenous control. *Crit Care Med*, v. 29, p. 2075–2080, 2001.
- WOODCOCK, N. P.; ROBERTSON, J.; MORGAN, D. R.; GREGG, K. L.; MITCHELL, C. J.; MACFIE, J. Bacterial translocation and immunohistochemical measurement of gut immune function. *J. Clin. Pathol.*, v. 54, p.619-623, 2001.
- XING, H. C.; LI, L. J.; XU, K. J.; SHEN, T.; CHEN, Y.; SHENG, J.; YU, Y.; CHEN, Y. Intestinal microflora in rats with ischemia/reperfusion liver injury. *J Zhejiang Univ SCI*, v.6, p. 14-21, 2005.
- XU, X. F.; LOU, W. H.; WANG, D. S.; JIN, Y.; NI, X. L.; WU, Z. T. Influence of glutamine on pancreatic blood flow and apoptosis of pancreatic acinar in rats with severe acute pancreatitis. *Chin J Digest Dis.*, v.7, p. 121–126, 2006.

YOUNG, V. R.; AJAMI, A. M. Glutamine: The emperor or his clothes? *J. Nutr.*, v. 131, p. 2449-59, 2001.

ZIEGLER, T. R.; BAZARGAN, N.; LEADER, L. M.; MARTINDALE, R. G. Glutamine and the gastrointestinal tract. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, v. 3, p.355-62, 2000.

ZIEGLER, T. R.; EVANS M. E.; FERNANDEZ-ESTIVARIZ, C.; JONES, D. P. Trophic and cytoprotective nutrition for intestinal adaptation, mucosal repair, and barrier function. *Annu. Rev. Nutr.*, v. 23, p.229-61, 2003.