

IARA ELIZA PACÍFICO QUIRINO

**ARGININA NO PROCESSO DE
TRANSLOCAÇÃO BACTERIANA EM
MODELO EXPERIMENTAL DE OBSTRUÇÃO
INTESTINAL EM RATOS**

Faculdade de Farmácia da UFMG
Belo Horizonte, MG
2006

IARA ELIZA PACÍFICO QUIRINO

**ARGININA NO PROCESSO DE
TRANSLOCAÇÃO BACTERIANA EM
MODELO EXPERIMENTAL DE OBSTRUÇÃO
INTESTINAL EM RATOS**

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

Orientador: Prof. Dr. Valbert Nascimento Cardoso
Co-Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Maria Isabel Toulson
Davisson Correia
Colaboradora: Prof^ª. Dr^ª. Tânia Mara Pinto Dabés
Guimarães

Faculdade de Farmácia da UFMG
Belo Horizonte, MG
2006

“Eu não sou nem especialmente inteligente, nem especialmente dotado. Sou apenas curioso, muito curioso ... A coisa importante é não parar de questionar. Nunca perca a sagrada curiosidade. A curiosidade tem suas próprias razões para existir”.

Albert Einstein

AGRADECIMENTOS

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

Ao Prof. Dr. Valbert Nascimento Cardoso – orientador da FAFAR / UFMG – por, acreditar em meu potencial, transmitir seu conhecimento, além de me fornecer todas as condições necessárias para a realização deste trabalho.

À Prof. Dra. Maria Isabel Toulson Davisson Correia – co-orientadora da Faculdade de Medicina /UFMG - pela orientação, valiosas sugestões, trocas de idéias e excelentes oportunidades proporcionadas.

À Prof. Dra. Tânia Mara Pinto Dabés Guimarães e à aluna de graduação Germane Saldanha Rodrigues – FAFAR /UFMG - pela disponibilidade, gentileza, atenção e preciosa ajuda nos ensaios de fagocitose.

À farmacêutica Fabíola Liboredo e técnicos do Laboratório de Análise Clínicas e Toxicológicas da FAFAR /UFMG pela realização do hemograma automatizado.

Aos Profs. Dr. Tasso Moraes e Santos, Dr. Henrique Pimenta Barroso Magalhães e Dr^a. Elzírria de Aguiar Nunar por disponibilizar, gentilmente, materiais e equipamentos de seus laboratórios.

Ao Prof. Dr. Roberto Gonçalves Junqueira pela ajuda e sugestões nas análises estatísticas.

À aluna de graduação Inina Pereira Santos pela preciosa colaboração nos trabalhos experimentais.

Aos meus pais, irmãos e ao Moisés por acreditarem e se orgulharem de mim.

À Prof. Dra. Simone Diniz, do Laboratório de Radioisótopos, pela atenção, simpatia e organização do laboratório, tornando agradável o trabalho no Laboratório.

Aos colegas do Laboratório de Radioisótopo, especialmente à Telma, pelos agradáveis momentos e cooperação.

Aos funcionários do biotério da FAFAR / UFMG, Adelaide e Batista, pela atenção e bom humor.

À AJINOMOTO do Brasil pelo fornecimento da arginina.

À Novartis Biociências S.A. pelo fornecimento da fórmula enteral Impact®.

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

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

OBRIGADA!

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	9
LISTA DE FIGURAS	10
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	11
RESUMO	12
ABSTRACT	14
1 INTRODUÇÃO	16
2 REVISÃO DA LITERATURA	19
2.1 Arginina	19
2.1.1 Considerações gerais	19
2.1.2 Absorção	19
2.1.3 Metabolismo	20
2.1.3.1 Síntese	20
2.1.3.2 Catabolismo	21
2.1.4 Propriedades fisiológicas e funcionais	23
2.2 Translocação bacteriana	25
2.2.1 Considerações gerais	25
2.2.2 Etiologia	27
2.2.2.1 Alteração da microbiota gastrointestinal	28
2.2.2.2 Alteração da barreira intestinal	29
2.2.2.3 Deficiência do sistema imunológico	31
2.2.2.4 Outros fatores envolvidos na translocação bacteriana	32
2.2.3 Mecanismos e patogênese	33
2.2.4 Prevenção e terapia	33
2.3 Obstrução intestinal	34
2.3.1 Considerações gerais	34

2.3.2	Fisiopatologia	35
2.4	Isótopo radioativo	36
3	MATERIAL E MÉTODOS	39
3.1	Animais e tratamento	39
3.1.1	Preparo e cálculo da composição nutricional das dietas suplementadas	40
3.2	Cultivo e preparação da <i>Escherichia coli</i>	41
3.3	Procedimento de marcação da <i>Escherichia coli</i> com ^{99m} Tecnécio	41
3.4	Modelo experimental de obstrução intestinal	42
3.5	Estudo da translocação bacteriana	43
3.6	Estudo de estabilidade de marcação da <i>Escherichia coli</i> com ^{99m} Tecnécio	43
3.7	Hemograma – série branca	44
3.8	Ensaio de fagocitose	44
3.9	Análises estatísticas	45
4	RESULTADOS	47
4.1	Composição centesimal das dietas convencional e suplementadas com arginina	47
4.2	Avaliação da ingestão calórica, protéica e evolução do peso	47
4.3	Rendimento de marcação da <i>Escherichia coli</i> com ^{99m} Tecnécio	49
4.4	Estabilidade de marcação da <i>Escherichia coli</i> com ^{99m} Tecnécio	49
4.5	Validação do modelo experimental de translocação bacteriana por obstrução intestinal utilizando ^{99m} Tc- <i>Escherichia coli</i>	49

		8
4.6	Efeitos da arginina no processo de translocação bacteriana	50
4.7	Hemograma – série branca	52
4.8	Ensaio de fagocitose	52
5	DISCUSSÃO	55
6	CONCLUSÕES	63
7	PERSPECTIVAS FUTURAS	65
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	67
9	ANEXOS	77
	ANEXO I - COMPOSIÇÕES CENTESIMAIS	77
	ANEXO II - SOLUÇÕES UTILIZADAS	79

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Fator de decaimento para ^{99m}Tc Tecnécio	43
Tabela 2	Composição centesimal das dietas padrão e suplementada	47
Tabela 3	Valores da radioatividade presente na tireóide	49
Tabela 4	Biodistribuição da $^{99m}\text{Tc-E.coli}$ nos animais dos grupos controle e OINT, após 24 horas da sua administração no lúmen intestinal	50
Tabela 5	Biodistribuição da $^{99m}\text{Tc-E.coli}$ nos grupos OINT, Arg 300mg/dia, Arg 600 mg/dia e Impact, após 24 horas da sua administração no lúmen intestinal	51
Tabela 6	Biodistribuição da $^{99m}\text{Tc-E.coli}$ nos grupos controle, Arg 300mg/dia, Arg 600 mg/dia e Impact, após 24 horas da sua administração no lúmen intestinal	51
Tabela 7	Hemograma (série branca)	52
Tabela 8	Porcentagem de fagócitos com <i>C. albicans</i>	53
Tabela 9	Composição centesimal da fórmula enteral Impact®	77
Tabela 10	Composição centesimal da ração para roedores Labina®	78
Tabela 11	Composição centesimal de gelatina em pó incolor	78
Tabela 12	Composição centesimal de amido de milho	78

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Estrutura química da arginina e grupo guanidino	19
Figura 2	Síntese da arginina	21
Figura 3	Metabolismo da arginina	22
Figura 4	Translocação bacteriana e falência múltipla de órgãos	27
Figura 5	Mecanismos e componentes envolvidos no processo de translocação bacteriana	28
Figura 6	Mecanismos de interação entre células epiteliais intestinais (IEC) e células imunológicas	30
Figura 7	Fisiopatologia da obstrução intestinal	36
Figura 8	Ingestão calórica diária média	47
Figura 9	Ingestão protéica diária média	48
Figura 10	Ganho de peso médio	48

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Arg	- Arginina
ATP	- Adenosina trifosfato
<i>C. albicans</i>	- <i>Candida albicans</i>
CAT	- transportadores de aminoácidos catiônicos
DNA	- Ácido desoxirribonucléico
<i>E.coli</i>	- <i>Escherichia coli</i>
GALT	- Tecido linfóide associado à mucosa gastrintestinal
Ig A	- Imunoglobulina A
Ig M	- Imunoglobulina M
IL-1	- Interleucina – 1
IL-2	- Interleucina -2
IL-4	- Interleucina – 4
IL-5	- Interleucina – 5
IL-6	- Interleucina – 6
IL-10	- Interleucina -10
IL-13	- Interleucina -13
IFN-	- Interferon –
iNOS	- Óxido nítrico sintetase indutiva
LPS	- Lipopolissacarídeo
NK	- “Natural Killer”
NLM	- Nódulo linfático mesentérico
ON	- Óxido nítrico
NOS	- Óxido nítrico sintetase
OI	- Obstrução intestinal
Qsp	- Quantidade suficiente para
RNA	- Ácido ribonucléico
sIg A	- Imunoglobulina A secretória
TCR	- Receptor de células T
TGI	- Trato gastrintestinal
TNF-	- Fator de necrose tumoral –
^{99m}Tc	- ^{99m} Tecnécio
^{99m}Tc-<i>E.coli</i>	- <i>Escherichia coli</i> marcada com tecnécio
-3	- Ácido graxo ômega-3

RESUMO

Estudos experimentais demonstraram que a suplementação com arginina em situações de trauma, septicemia e estresse apresentou efeitos positivos sobre a mucosa intestinal, diminuindo a translocação bacteriana. Desse modo, o objetivo desse trabalho foi avaliar o papel da arginina, pura ou presente em fórmula enteral, no processo de translocação bacteriana em um modelo experimental de obstrução intestinal em ratos, utilizando *Escherichia coli* marcada com ^{99m}Tc Técnico. Ratos machos Wistar (250 a 300 gramas) foram divididos em seis grupos: grupo padrão (animais saudáveis), grupo controle (“sham” operados + ração convencional), grupo OINT (ração convencional + OI), grupo Arg 300mg/dia (ração suplementada com 300mg de arginina/dia + OI), grupo Arg 600mg/dia (ração suplementada com 600mg de arginina/dia + OI) e grupo Impact® (ração suplementada com fórmula enteral Impact® + OI). Decorridos sete dias após o início do experimento, os animais foram anestesiados e incisão mediana foi feita no abdome com exposição do íleo terminal. Em seguida, realizou-se ligadura com nó simples do íleo terminal e *E.coli* marcada com ^{99m}Tc Técnico ($^{99m}\text{Tc-E.coli}$) foi administrada no lúmen intestinal. Após 24 horas, os animais foram sacrificados e linfonodos mesentéricos, fígado, baço, pulmões e sangue foram coletados para determinação da radioatividade. O rendimento médio de marcação da *E. coli* com ^{99m}Tc Técnico foi de 98,34% ($\pm 1,38$). Os animais do grupo Impact® apresentaram ingestão calórica estatisticamente maior em relação aos demais grupos ($p < 0,05$). A ingestão protéica se mostrou estatisticamente elevada nos animais dos grupos Arg 300 mg/dia e Arg 600 mg/dia ($p < 0,05$). Entretanto, não houve diferenças significativas no ganho de peso entre os grupos ($p > 0,05$). Sangue, NLM, baço, fígado e pulmões dos animais do grupo OINT apresentaram maior captação da $^{99m}\text{Tc-E.coli}$ quando comparados aos animais do grupo controle ($p < 0,05$), validando o modelo de obstrução intestinal utilizado neste trabalho. A administração de arginina (300mg/dia, 600mg/dia e presente na fórmula enteral) reduziu o nível da translocação bacteriana para sangue e todos os órgãos analisados ($p < 0,05$). O percentual de monócitos apresentou-se mais elevado nos animais dos grupos Arg 300mg/dia e Impact® comparados ao grupo OINT ($p < 0,05$). Ainda nos animais do grupo Impact®, o percentual de fagócitos com *Candida albicans* (21%) foi estatisticamente maior quando comparado aos animais dos demais grupos. Os resultados mostraram que a arginina foi eficaz na redução dos

níveis de captação da $^{99m}\text{Tc-E.coli}$ no sangue e nos órgãos investigados dos animais que receberam este aminoácido como suplemento dietético.

Palavras-chaves: Arginina, nutrição enteral, obstrução intestinal, translocação bacteriana.

ABSTRACT

Recent studies have shown that arginine reduces bacterial translocation in trauma and septic animal models whose diets were supplemented with it. The aim of this study was to evaluate the effects of arginine on bacterial translocation in an intestinal obstruction model in rats. Male Wistar rats (250g-350g) were randomized to six groups: Standard group (healthy animals), control group ("sham" operated + standard chow), OINT group (standard chow + IO), Arg 300mg/day group (standard chow supplemented with 300mg arginine/day + intestinal obstruction), Arg 600 mg/day group (standard chow supplemented with 600mg arginine/ day + IO) and Impact® group (standard chow supplemented with Impact® + IO). After 7 days of study initiation, animals were anesthetized. Terminal ileum was isolated and a ligature was placed around it. *Escherichia coli* labeled with ^{99m}Tc (superscript 99m) Technetium (^{99m}Tc-*E.coli*) was inoculated into the intestinal lumen. After 24 hours, blood, mesenteric lymph nodes (MLN), liver, spleen and lungs were collected for radioactivity determination. The yield labeling with ^{99m}Tc of *E. coli* was 98,44% (±1,08). Impact® group has showed higher caloric ingestion than other groups (p<0,05). Protein ingestion was higher in Arg 300 mg/day e Arg 600 mg/day (p<0,05). However, there was no significant difference in weight among the groups. Blood, MLN, liver, spleen and lungs of the OINT group showed significantly higher uptake of ^{99m}Tc-*E.coli* than the control group (p<0,05), validating the model of intestinal obstruction. The administration of arginine (300mg/day, 600mg/day or present in the enteral formula) reduced the level of bacterial translocation to the blood and all organs investigated when compared with the group OINT (p<0,05). In addition, the uptake of ^{99m}Tc-*E.coli* did not significantly differ between control and supplemented groups (p>0,05). The percentage of monocytes was significantly elevated in Arg 300mg/day and Impact® groups (p<0,05). In the last group, the phagocytosis of *Candida albicans* was significantly increased when compared to other groups (p>0,05). The results suggest that arginine was able to reduce the ^{99m}Tc-*E.coli* uptake in the blood and organs of the animals that received it as dietetic supplement.

Key Words: arginine, enteral nutrition, intestinal obstruction, bacterial translocation.

1 INTRODUÇÃO

A nutrição é fundamental para a manutenção da vida, assumindo papel importante na modulação das respostas metabólica, inflamatória e imunológica, além de fornecer energia e nitrogênio. Desse modo, nutrientes específicos, também chamados imunonutrientes, têm sido usados como meio de interferir nessas respostas em pacientes em situações de estresse (CERRA, 1991). Estudos realizados com glutamina, arginina, ácido graxo ômega-3 (ω -3) e nucleotídeos mostraram que esses imunonutrientes regulam os processos imunológico e inflamatório, modulam o balanço nitrogenado e a síntese de proteínas após a injúria. Taxa de mortalidade, complicações e período de hospitalização são menores em doentes avaliados por meio de estudos clínicos randomizados prospectivos (ZULFIKAROGLU et al., 2003).

A arginina, um aminoácido condicionalmente essencial, possui diversos efeitos metabólicos e imunológicos, especialmente em situações de trauma e septicemia. Este aminoácido promove retenção de nitrogênio, age no processo de cicatrização, por meio do aumento da reposição de colágeno (GURBUZ et al., 1998) e é substrato para a síntese de poliaminas. As poliaminas possuem função no transporte, no crescimento, na proliferação e na diferenciação celular (EVOY et al., 1998; NIEVES JR & LANGKAMP-HENKEN, 2002). A arginina também é importante para células imunológicas como linfócitos, células *natural killer* (matadoras naturais - NK), macrófagos e para produção de citocinas (OCHOA et al., 2004; ZALOGA et al., 2004).

Diversas condições clínicas estão associadas à translocação bacteriana: trauma, hemorragia, obstrução intestinal, cirrose, doenças inflamatórias intestinais, imunodeficiências, utilização prolongada de antibióticos, radio ou quimioterapia, grandes operações, queimaduras extensas e icterícia, assim como nutrição parenteral prolongada exclusiva (DE OCA et al., 1993; GURBUZ et al., 1998; OGATA et al., 2002; RAYES et al., 2002; SEEHOFER et al., 2003; WIEST & RATH, 2003). Estudos indicam que nessas condições ocorrem estase, aumento da permeabilidade intestinal, isquemia, atrofia intestinal e crescimento bacteriano excessivo. Esses fatores estão implicados na etiologia da translocação bacteriana. A translocação de bactérias e de suas endotoxinas induz a liberação de mediadores inflamatórios - citocinas, leucotrienos, fatores quimiotáticos, fragmentos do complemento - e ativação de células imunológicas, contribuindo para o desenvolvimento de processo inflamatório sistêmico e possível falência múltipla orgânica (BARBER et al., 1991; SWANK & DEITCH, 1996). A falência múltipla orgânica induzida por sepsis é a causa de morte mais freqüente em pacientes críticos (WACHTLER et al., 1995).

As infecções bacterianas ainda representam grande problema clínico, apesar dos avanços nos cuidados médicos e nutricionais intensivos, da antibioticoterapia específica e de técnicas cirúrgicas avançadas. Essas infecções são responsáveis por aumento da morbidade, mortalidade, muitas vezes resultando em maior tempo de hospitalização e acarretando elevação dos custos do tratamento. Embora grande parte das infecções bacterianas apresente fontes exógenas, um importante mecanismo é a translocação de bactérias intestinais para os nódulos linfáticos mesentéricos (NLM), fígado, baço, sangue e outros órgãos estéreis (SEEHOFER et al., 2003). Sugere-se que a translocação bacteriana represente fonte significativa de septicemia em pacientes críticos, podendo levar à falência múltipla dos órgãos (WIEST & RATH, 2003).

Estudos indicam que animais cujas dietas foram suplementadas com arginina apresentaram menor taxa de translocação bacteriana e melhor aspecto morfológico da mucosa intestinal após enterite induzida (GURBUZ et al., 1998; ERSIN et al., 2000). Óxido nítrico (ON), um importante metabólito da arginina, também atua sob o trato gastrointestinal (TGI), minimizando a disfunção das barreiras mucosa e microvascular, prevenindo desse modo o aumento da permeabilidade intestinal (CHEN et al., 1998).

Portanto, a proposta deste trabalho foi avaliar a ação da arginina pura ou presente na fórmula enteral Impact® sobre o processo de translocação bacteriana, utilizando *Escherichia coli* (*E.coli*) marcada com ^{99m}Tecnécio (^{99m}Tc) em modelo de obstrução intestinal em ratos. A contagem diferencial de leucócitos e a capacidade fagocitária foram também investigadas neste trabalho. É importante acrescentar que são escassos os estudos que envolvem arginina e translocação bacteriana em modelos de obstrução intestinal. Ainda, destaca-se a originalidade da metodologia empregada para avaliação da translocação bacteriana. O estudo da fórmula enteral Impact® é de grande relevância, uma vez que esta fórmula é vastamente utilizada em situações de estresse e trauma, comuns na prática clínica.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Arginina

2.1.1 Considerações gerais

A arginina (Figura 1) é um aminoácido não-essencial, proveniente de fontes exógenas (dieta) ou endógenas. A arginina é amplamente distribuída na proteína dietética e sua média de consumo no ocidente é de 5g/dia (EVANS et al., 2004). Porém, durante desenvolvimento e estados catabólicos, a arginina é considerada nutriente condicionalmente essencial. Nessas condições, a síntese *in vivo* é insuficiente para suprir as demandas do organismo. A arginina é substrato para síntese de proteínas, aminoácidos, óxido nítrico, ornitina, prolina, poliaminas, glutamato, creatina e agmatina. Muitas dessas moléculas são importantes para sinalização celular e funcionamento de canais iônicos. A arginina funciona também como intermediária do ciclo da uréia. Esse aminoácido é estável em solução aquosa e não é destruído pela esterilização (ZALOGA et al., 2004).

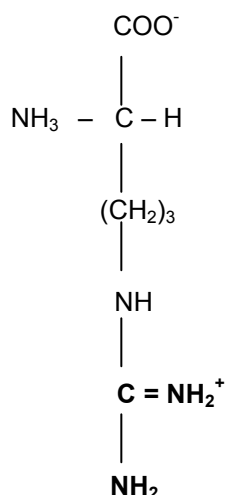


Figura 1: Estrutura química da Arginina e grupo guanidino (CYNOBER et al., 1995).

2.1.2 Absorção

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

A absorção intestinal da arginina na porção da borda em escova da membrana do enterócito envolve os sistemas B⁰⁺ e b⁰⁺, específicos para aminoácidos bipolares e

básicos. O sistema B⁰⁺ é um co-transportador que acopla o influxo do aminoácido ao influxo de Na⁺ eletronegativamente, ao contrario de sistema b⁰⁺ não dependente de Na⁺ (AIRES, 1999).

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

2.1.3 Metabolismo

2.1.3.1 Síntese

A síntese de arginina (Figura 2) ocorre por meio do metabolismo protéico e *turnover* no intestino e nos rins. Citrulina, produzida no intestino a partir de aminoácidos dietéticos (prolina, glutamina, glutamato) e glutamina circulante, é absorvida e transportada para os rins. Nos túbulos renais proximais, a citrulina é convertida em arginina pela argininosuccinato sintetase e argininosuccinato liase. Esse órgão é o principal responsável pela manutenção dos níveis plasmáticos de arginina. (EVOY et al., 1998; ZALOGA et al., 2004).

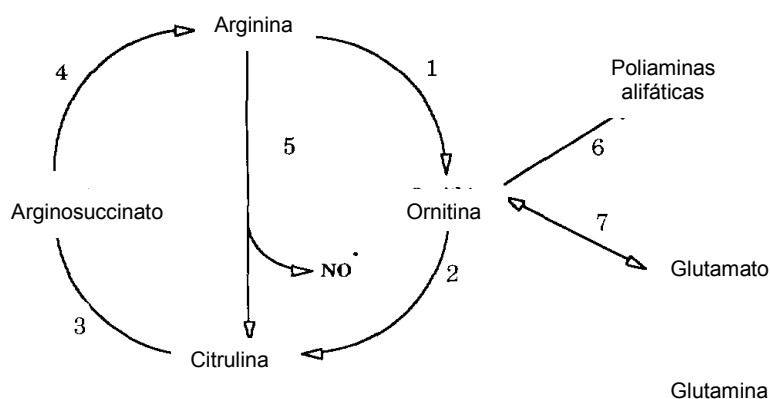


Figura 2: Síntese de Arginina. (1) Arginase, (2) ornitina –carbomiltransferase, (3) arginossuccinato sintetase, (4) arginossuccinase liase, (5) óxido nítrico sintetase, (6) ornitina descarboxilase, (7) ornitina transaminase, (8) glutamina sintetase e (9) glutaminase (CYNOBER et al., 1995).

2.1.3.2 Catabolismo

O catabolismo da arginina está bem esclarecido e descrito na literatura. Aproximadamente 40% da arginina dietética é degradada durante a absorção no intestino e o restante segue via circulação porta. A arginina é absorvida, podendo passar por diversas vias de degradação (Figura 3). A via clássica inicia-se no citosol dos hepatócitos com a remoção do grupo guanidino e formação de uréia e ornitina, por meio da enzima arginase. Há dois tipos de arginase: arginase-I e arginase-II. A arginase-I é uma enzima citosólica presente principalmente no fígado relacionada com a detoxificação da amônia e síntese de uréia. A arginase-II encontra-se nas mitocôndrias de células extra-hepáticas, como células renais, intestinais, endoteliais, macrófagos e está envolvida na síntese de ornitina, prolina e glutamato. A arginase pode ser estimulada por citocinas ou outros sinais inflamatórios (ZALOGA et al., 2004).

A uréia é transportada através da corrente sanguínea para os rins, através dos quais é eliminada. A ornitina é utilizada na regeneração da arginina. Ela é transportada para o interior da mitocôndria, onde se associa ao carbomil-fosfato, formando citrulina. A citrulina associa-se ao ácido aspártico no citosol, formando arginossuccinato, que em seguida é clivado em arginina e succinato. À medida que a arginina completa o ciclo, dois átomos de nitrogênio são desviados para a formação da uréia (NIEVES JR & LANGKAMP-HENKEN, 2002; SHILS et al., 2003).

A arginina também é substrato na síntese protéica, podendo ser convertida em prolina, glutamato e glutamina, aminoácidos comuns na maioria das proteínas. A

síntese desses aminoácidos inicia-se com a conversão da arginina em ornitina que, em seguida, é convertida à pirrolina-5-carboxilato pela ornitina aminotransferase. A pirrolina-5-carboxilato pode ser transformada em prolina, por meio da pirrolina-5-carboxilato redutase, ou em glutamil- γ -semialdeído. Essa reação é espontânea. O glutamil- γ -semialdeído é, por sua vez, convertido a glutamato pela pirrolina-5-carboxilato desidrogenase. A síntese de glutamina a partir de glutamato é catalisada pela glutamina sintetase e utiliza amônia, prevenindo o acúmulo dessa substância nos tecidos extra-hepáticos (NIEVES JR & LANGKAMP-HENKEN, 2002).

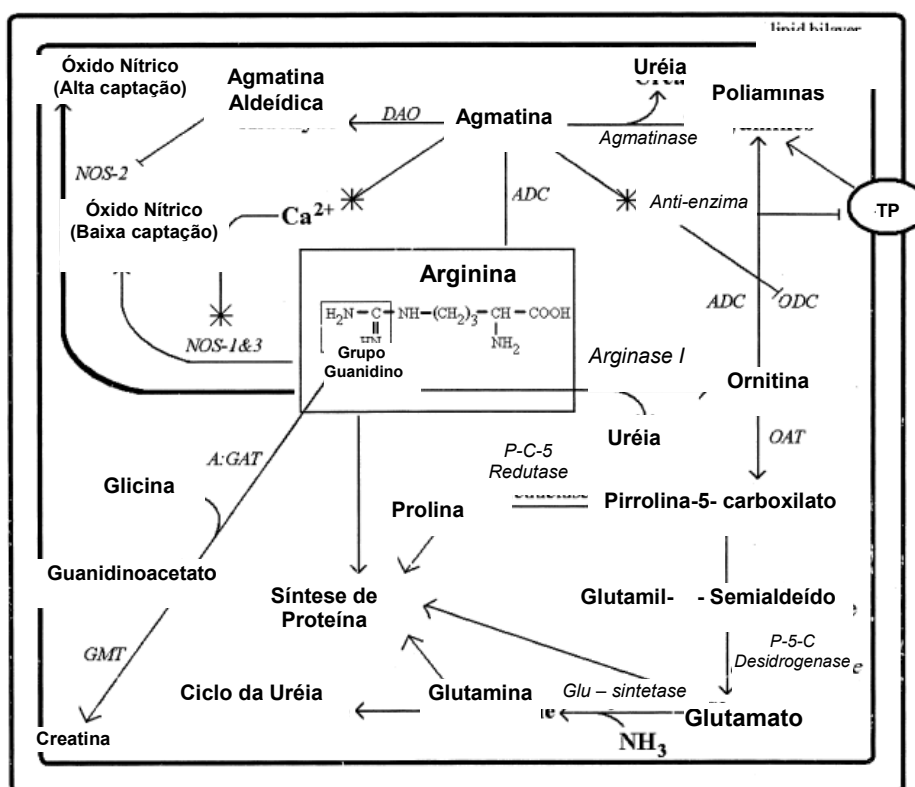


Figura 3: Metabolismo da arginina. * indica inibição; —| indica estimulação. Abreviaturas: ADC, arginina descarboxilase; A:GAT, arginina:glicina amidinotransferase; DAO, diamino oxidase; Glu-sintetase, glutamina sintetase; GMT, guanidinoacetato-N- metiltransferase; NOS-1, óxido nítrico sintetase-1; NOS-2, óxido nítrico sintetase-2; NOS-3, óxido nítrico sintetase-3; OAT, ornitina aminotransferase; ODC, ornitina descarboxilase; P-5-C desidrogenase, pirrolina-5-carboxilase desidrogenase; P-5-C redutase; pirrolina-5-carboxilase redutase e TP, transportador de poliaminas (NIEVES JR & LANGKAMP-HENKEN, 2002).

O metabolismo da arginina também gera compostos nitrogenados essenciais como creatina, poliaminas, agmatina e óxido nítrico (ON). A arginina pode ser convertida no fígado em creatina pela arginina-glicina-amidinotransferase. A creatina é transportada ao tecido muscular, onde funciona como carreador de fosfato e

regenerador de adenosina trifosfato (ATP) (NIEVES JR & LANGKAMP-HENKEN, 2002).

A síntese de poliaminas também faz parte da via metabólica da arginina. Poliaminas como putrescina, espermina e espermidina possuem função no transporte, crescimento, proliferação e diferenciação celular. As poliaminas atuam alterando a estrutura de transcrição do RNA (ácido ribonucléico), melhorando, desse modo a síntese protéica e modulando a transcrição e *turnover* do RNA mensageiro e editando o DNA (ácido desoxirribonucléico). A agmatina, outro metabólito da arginina, regula a concentração intracelular de poliaminas, já que altos níveis destas substâncias apresentam efeitos tóxicos (YEH, 2004).

Uma outra via metabólica é a conversão da arginina em ON, um agente antimicrobiano efetivo contra antígenos intracelulares, parasitas e bactérias extracelulares. O ON também é vasodilatador e neurotransmissor. A síntese de ON é catalisada pela óxido nítrico sintetase (NOS), presente em diversos tecidos (NIEVES JR & LANGKAMP-HENKEN, 2002). A NOS também pode ser ativada por citocinas presentes durante quadros de septicemia: IL-1 (interleucina-1), IL-2 (interleucina-2), TNF- α (fator de necrose tumoral- α) e INF- γ (interferon- γ) (ZALOGA et al., 2004).

2.1.4 Propriedades fisiológicas e funcionais

Durante estados de estresse (operações, trauma, desnutrição e septicemia), a arginina pode tornar-se nutriente condicionalmente essencial, havendo necessidade de sua suplementação (OCHOA et al., 2004). Ocorre deficiência desse aminoácido devido à taxa de degradação mais intensa, redução da ingestão alimentar, de sua absorção e da síntese de citrulina, um precursor da arginina (KOBAYASHHI et al., 1998; SHILS et al.; 2003). Nessas condições, os níveis de arginina foram restaurados somente após a suplementação por períodos maiores que cinco dias (OCHOA et al., 2004). Estudos em pacientes críticos indicaram que a suplementação de arginina melhora o balanço nitrogenado, a cicatrização, diminui as taxas de infecção, o período de internação e aumenta a competência imunológica destes pacientes (ZALOGA et al., 2004).

Operação e trauma estão associados à grande diminuição do número de linfócitos T, principalmente linfócitos T CD4⁺. Pacientes nessas situações normalmente apresentam queda na síntese de IL-2, fator de crescimento para linfócitos T, e de INF- γ , citocinas essenciais no processo inflamatório. Pacientes que receberam dietas suplementadas com imunonutrientes, dentre eles a arginina, recuperaram a contagem

de CD4⁺ em menores períodos de tempo do que pacientes que receberam dietas convencionais. Notou-se também maior produção de IL-2 e INF- γ (OCHOA et al., 2004). A arginina é essencial para funções de órgãos linfóides e células como macrófagos, linfócitos T, células NK e para a produção de citocinas como IFN- γ e IL-2. (OCHOA et al., 2004; ZALOGA et al., 2004). Esse aminoácido aumenta em ratos, o peso e o número de células do timo, nódulos linfáticos mesentéricos (NLM) e placas de Peyer como consequência de melhor resposta imunológica. A arginina parece, também, incrementar a resposta de linfócitos à estimulação mitogênica e a função de células mielóides, promovendo a capacidade bactericida de macrófagos (GURBUZ et al., 1998; SHANG et al., 2004). Células mielóides induzem a expressão de iNOS (óxido nítrico sintetase indutiva) e consequente produção de ON, necessário para eliminação de bactérias e parasitas (OCHA et al., 2004). Estes autores observaram que linfócitos T desenvolvidos em meio deficiente em arginina exibiam menor expressão de receptores específicos e diferenciação fenotípica deficiente. Demonstrou-se que a arginina é essencial para expressão da cadeia ζ , um componente essencial do complexo de receptores de linfócitos T (TCR) e da via de transdução de sinal responsável pela ativação destas células.

Suplementação enteral de arginina, antes e após quadro de septicemia, tende a aumentar a proliferação de linfócitos nas placas de Peyer e a síntese de sIg-A, resultando em melhor função imunológica intestinal (SHANG et al., 2004). A suplementação com este aminoácido também elevou a síntese de anticorpos contra *P.aeruginosa*, a resposta de macrófagos ao LPS e a atividade do sistema enzimático antioxidante em modelos experimentais de queimadura (TSAI et al., 2002; SHANG et al., 2003).

A arginina apresenta efeitos na função e reparo intestinal após trauma, isquemia ou ressecção do intestino (SHANG et al., 2004). Este aminoácido atua na síntese de colágeno, cicatrização, síntese da matriz extra-celular, retenção de nitrogênio e remodelação de tecidos, uma vez que é convertida em prolina, um aminoácido presente na estrutura do colágeno (ZALOGA et al., 2004). Outro mecanismo possível é a síntese de poliaminas envolvidas na proliferação, diferenciação e função celular e na cicatrização e regeneração de tecidos (GRIMBLE & GRIMBLE, 1998; ZALOGA et al., 2004). A ação da arginina sobre a mucosa intestinal também pode ser explicada pelo aumento da secreção de hormônio do crescimento, prolactina, insulina, somatostatina e polipeptídeos pancreáticos quando da sua administração. Estes hormônios podem apresentar efeitos tróficos sobre a mucosa intestinal (ADAWI et al., 1996). Em modelos

de enterite induzida por radiação, observaram-se melhores parâmetros morfológicos e recuperação da mucosa após suplementação de dieta com arginina. O número de animais que apresentaram culturas positivas e de bactérias presentes nos NLM's foi menor, principalmente quando a arginina foi administrada após radiação (GURBUZ et al., 1998; ERSIN et al., 2000). CHANG et al. (2001) observaram que a suplementação deste aminoácido ($1.400 \pm 174\text{mg/dia}$) elevou o número de vilosidades e atenuou a intensidade de lesões na mucosa intestinal em modelo de obstrução similar ao utilizado no presente trabalho. A arginina também apresentou ação protetora sobre a mucosa intestinal durante endotoxemia causada por LPS por meio do aumento da proliferação de enterócitos e manutenção das vilosidades (SUKHOTNIK et al., 2004).

A manutenção do fluxo sanguíneo gastrintestinal, mediada pela arginina por meio da via do óxido nítrico, também apresenta papel protetor sobre a mucosa intestinal. Estudo experimental realizado com uso durante cinco dias da fórmula Impact[®], a mesma utilizada neste trabalho, mostrou aumento do fluxo sanguíneo no íleo (MATHESON et al., 2003). RHODEN et al. (2002) também demonstraram que esta fórmula enteral elevou o fluxo sanguíneo na região do jejuno terminal e íleo. Sugere-se que nutrientes específicos da fórmula enteral iniciam a hiperemia intestinal a fim de otimizar o fluxo sanguíneo e a oferta de nutrientes e oxigênio à porção final do intestino delgado. O aumento da perfusão do íleo pode melhorar seus aspectos funcionais como imunidade da mucosa e função da barreira intestinal.

2.2 Translocação bacteriana

2.2.1 Considerações gerais

O termo translocação bacteriana é definido como a passagem de microrganismos viáveis ou não e de seus produtos, como endotoxinas, do lúmen intestinal para os nódulos linfáticos mesentéricos (NLM), e possivelmente, para outros órgãos estéreis, como fígado e baço, causando infecção ou estimulando o sistema imunológico (DE OCA et al., 1993; STEINBERG, 2003; WIEST & RATH, 2003). A translocação bacteriana ocorre em indivíduos saudáveis e acredita-se que seja um evento fisiológico e necessário para a geração de células imunocompetentes pelo tecido linfóide associado à mucosa gastrintestinal (GALT) (MACFIE, 2000; LICHITMAN, 2001).

Escherichia coli, *Enterobacter cloacae*, *Enterococcus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, bactérias aeróbicas Gram-negativas presentes no intestino humano, podem causar infecção extra-intestinal via translocação bacteriana (RAYES et al., 2002; SILVA et al., 2002; SEEHOFER et al., 2003; STALLION et al., 2005). Organismos aeróbicos translocam mais facilmente uma vez que o oxigênio sanguíneo inibe o crescimento de bactérias entéricas anaeróbicas (LICHTMAN, 2001).

Tem sido proposto que estas bactérias intestinais, potencialmente patogênicas, ou suas endotoxinas possam iniciar ou perpetuar o estado de septicemia em pacientes que não apresentam focos de infecção, levando ao desenvolvimento de falência múltipla orgânica (Figura 4). A translocação de bactérias ou suas endotoxinas induz a ativação de células imunológicas e liberação de mediadores inflamatórios. Embora estes mediadores tenham efeitos benéficos após a injúria, a sua produção exagerada ou prolongada é prejudicial. Essas moléculas são responsáveis por lesões tissulares e favorecem o catabolismo, uma vez que inibem a síntese hepática de albumina, disponibilizando proteínas e aminoácidos para manutenção das respostas imunológica e inflamatória (O'BOYLE et al., 1998; SUGIURA et al., 1999; RUIZ-SILVA et al., 2002; SAMEL et al., 2002).

A cultura de microrganismos nos NLM e órgãos estéreis (baço, fígado e pulmão) é um método direto para determinação da translocação bacteriana. Um marcador indireto é a cultura ou a presença de endotoxina no sangue periférico (LICHTMAN, 2001). Estudos recentes realizados no Laboratório de Radioisótopos da Faculdade de Farmácia / UFMG também foram capazes de evidenciar o fenômeno da translocação bacteriana, por meio de bactérias marcadas com isótopos radioativos. Dentre estes, destacam-se os trabalhos desenvolvidos por OLIVEIRA (2004) e DINIZ et al. (2005) que avaliaram a translocação bacteriana em modelos de obstrução intestinal e icterícia obstrutiva respectivamente, utilizando *E.coli* marcada com ^{99m}Tecnécio.

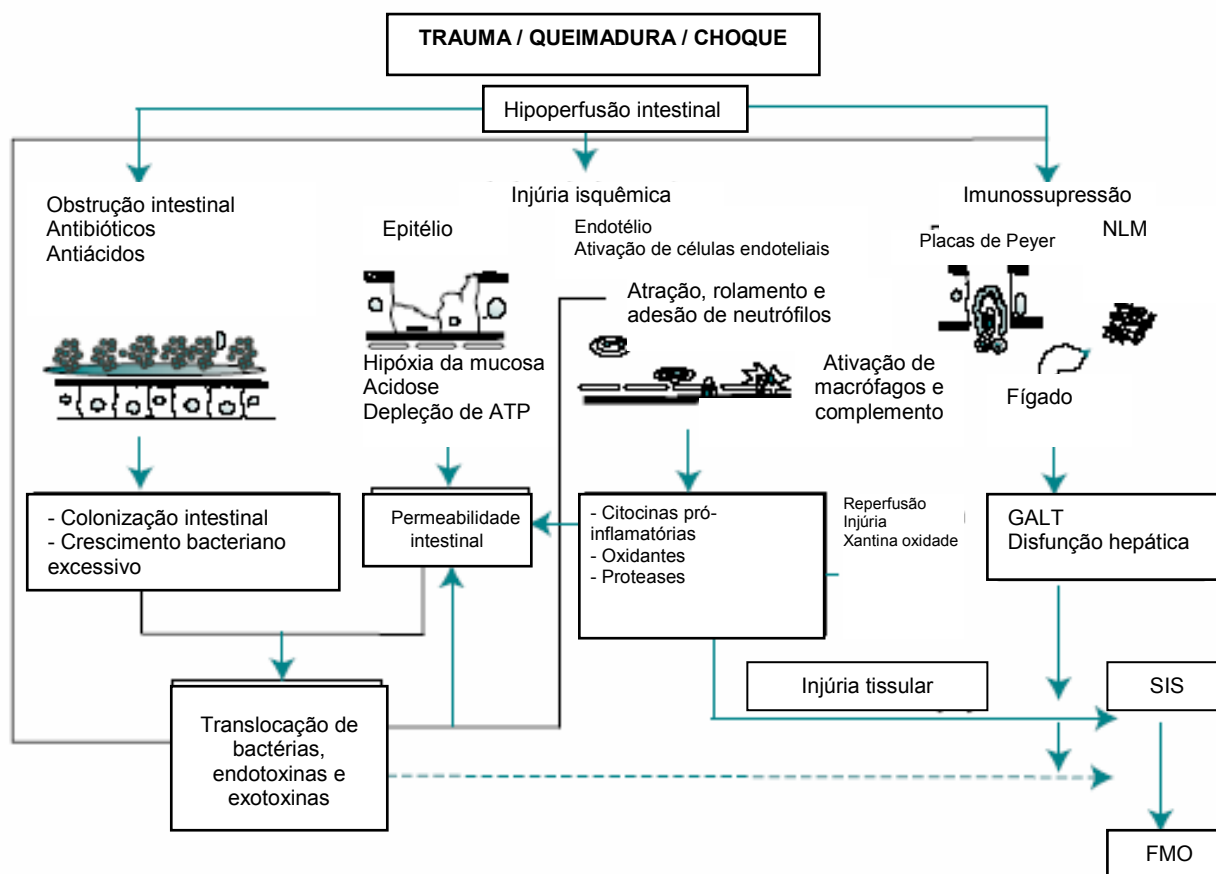


Figura 4: Translocação bacteriana e falência múltipla de órgãos (WIEST & RATH, 2003). SIS, Síndrome Inflamatória Sistêmica; FMO, Falência Múltipla Orgânica.

2.2.2 Etiologia

Os três principais mecanismos envolvidos na translocação bacteriana são (a) alteração da microbiota gastrintestinal, resultando em crescimento bacteriano exagerado; (b) alterações físicas da barreira intestinal; (c) deficiência do sistema imunológico do hospedeiro, sendo esse o principal fator relacionado com a translocação bacteriana (Figura 5) (BERG, 1995; WIEST & RATH, 2003).

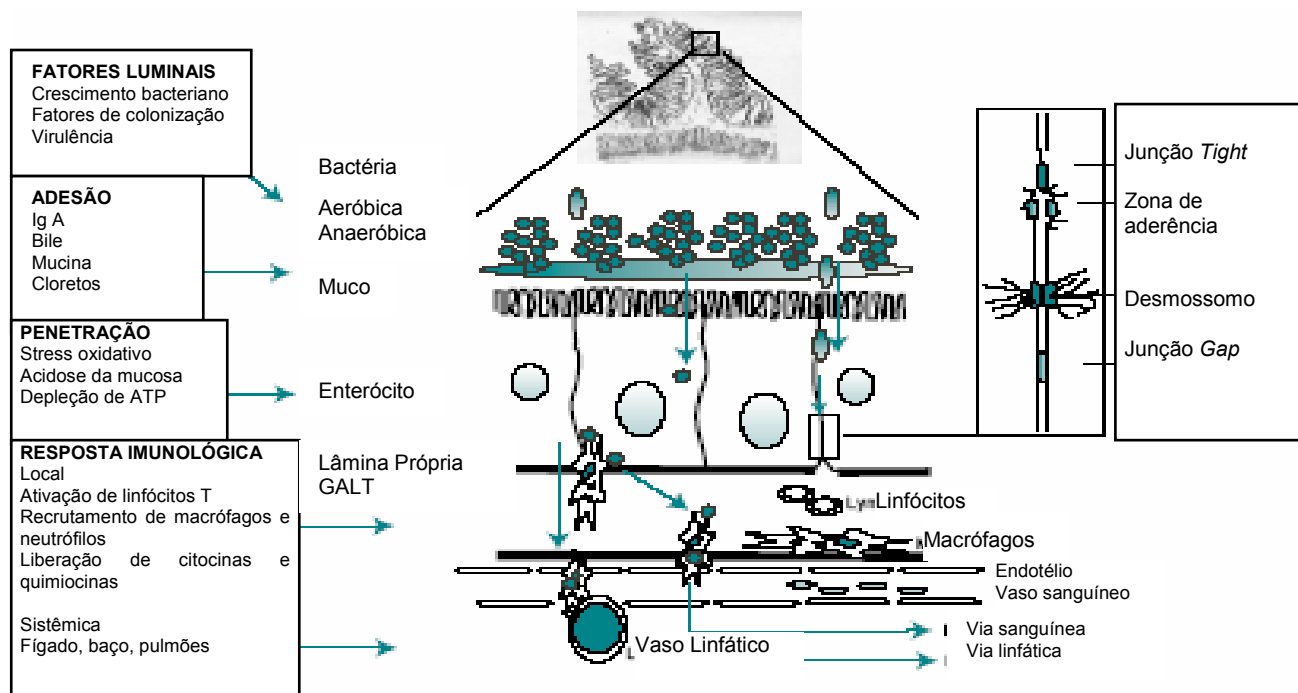


Figura 5: Mecanismos e componentes envolvidos no processo de translocação bacteriana. Parâmetros que aumentam a taxa de translocação bacteriana podem ser divididos anatômica e funcionalmente. Fatores luminais influenciam o número e a virulência da bactéria. Adesão bacteriana causa lesão epitelial facilitando a sua penetração na mucosa. Finalmente, as respostas imunológicas local e sistêmica do hospedeiro determinam a defesa contra translocação bacteriana (WIEST & RATH, 2003).

2.2.2.1 Alteração da microbiota gastrintestinal

O primeiro componente de defesa da barreira intestinal é a microbiota, formada por bactérias anaeróbicas, principalmente as dos gêneros *Bacteroides*, *Peptostreptococcus*, *Clostridium*, *Eubacterium* e *Fusobacterium* (WIEST & RATH, 2003). Essas bactérias limitam adesão e crescimento de bactérias aeróbicas Gram-negativas patogênicas, também naturalmente presentes no intestino humano. Alteração desse equilíbrio, por meio da redução da população de bactérias anaeróbicas, permite crescimento e adesão das bactérias patogênicas e, possivelmente, a translocação bacteriana (BERG, 1995; SWANK & DEITCH, 1996). Modelos animais de desnutrição, terapia com antibióticos, nutrição parenteral, obstrução intestinal e ligação do ducto biliar mostraram alterações na microbiota gastrintestinal (BERG, 1995; MACFIE, 2000).

2.2.2.2 Alterações da barreira intestinal

A mucosa intestinal possui tanto a função de absorver os nutrientes como a função protetora (SAWAI et al., 2001). Essa camada possui como componente principal a mucina, glicoproteína de alto peso molecular secretada por células globulares, que forma um gel viscoso protetor, desviando a aderência de bactérias e prevenindo sua associação às células epiteliais (PITMAN & BLUMBERG, 2000). A mucosa contém ainda imunoglobulina A (Ig A), secretada por linfócitos B presentes na submucosa (SWANK & DEITCH, 1996; WU et al., 1999). SAWAI et al. (2001), em um estudo sobre os efeitos da slg A no processo de translocação bacteriana, sugeriu que essa imunoglobulina se liga diretamente à *E. coli*, impedindo sua aderência à superfície epitelial. Baixas concentrações de slg A intestinal estão associadas com aumento da aderência bacteriana à mucosa (SWANK & DEITCH, 1996).

A camada celular da barreira intestinal é composta por células epiteliais, células especializadas como as globulares, linfócitos e células M (ALBILLOS & DE LA HERA, 2002). As células epiteliais intestinais possuem microvilosidades no ápice e filamentos em borda de escova no topo. Essa anatomia também auxilia na prevenção de aderência de patógenos (ACHESON & LUCCIOLI, 2004). A união entre os enterócitos ocorre por meio dos desmossomos, junções *Tight* e *Gap*, que permitem a comunicação intercelular e a passagem somente de pequenas moléculas (< 11,5 Å). Bactérias e macromoléculas como lipopolissacarídeo (LPS) e peptídeoglicano não são capazes de atravessar a barreira epitelial. (WIEST & RATH, 2003). As células epiteliais desenvolveram a habilidade de comunicação com células imunológicas regionais, influenciando seu crescimento, migração e resposta ao estímulo antigênico. (Figura 6) (PITMAN & BLUBERG, 2000).

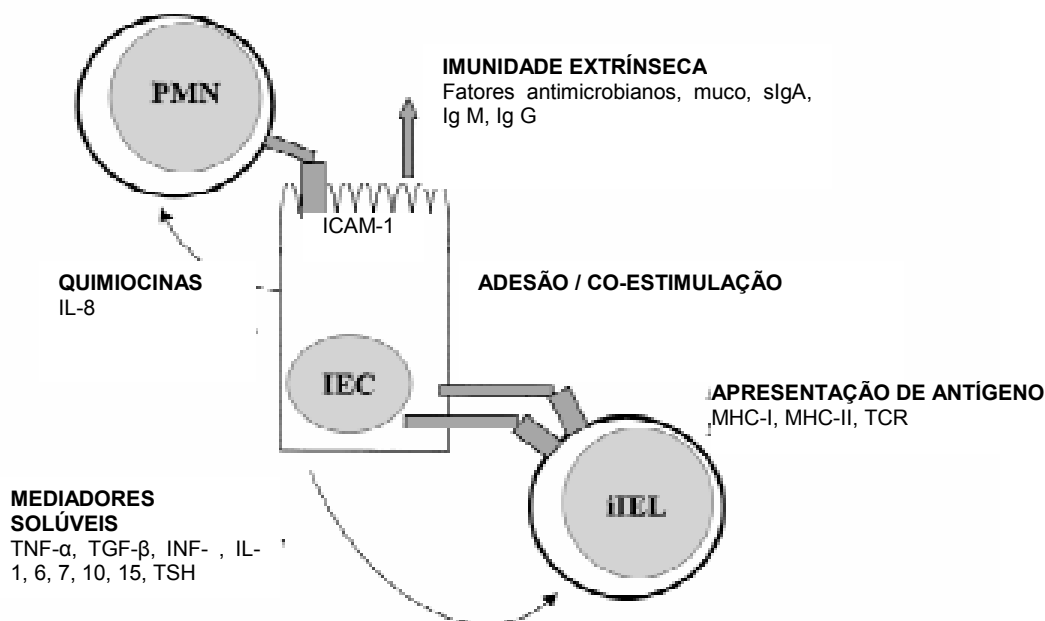


Figura 6: Mecanismos de interação entre células epiteliais intestinais (IEC), células imunológicas intestinais (iIEL), linfócitos intraepiteliais, leucócitos polimorfonucleares (PMN), IL (Interleucina), fator de necrose tumoral (TNF), fator transformador do crescimento (IFN), hormônio estimulador da tireóide (TSH) e receptor de célula T (TCR) (PITMAN & BLUMBERG, 2000).

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

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

O balanço entre a proliferação celular e a apoptose representa outro fator que mantém a mucosa intestinal. Se esse balanço for rompido a favor da apoptose, o resultado será atrofia intestinal e possível translocação de bactérias e endotoxinas.

Desnutrição e isquemia podem acelerar a apoptose intestinal, enquanto imunonutrientes podem agir como supressores deste processo (ULUSOY et al., 2003).

Substâncias marcadas com isótopos radioativos, como ^{51}Cr -EDTA e $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -DTPA também têm sido utilizadas no estudo da permeabilidade intestinal (DINIZ et al., 1999; MACFIE, 2000).

2.2.2.3 Deficiência do sistema imunológico

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

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

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

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

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

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

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

2.2.2.4 Outros fatores envolvidos na translocação bacteriana

Tem sido demonstrado que diminuição do peristaltismo (dismotilidade), evento que ocorre em várias situações patológicas tal como a obstrução intestinal, dentre outras, está associada a translocação bacteriana em humanos e ratos (SWANK & DEITCH, 1996). O ON, dependendo da sua concentração, modula a permeabilidade intestinal e a translocação bacteriana (WIEST & RATH, 2003). Acidez gástrica, secreções pancreáticas e biliares também são fatores de defesa (BERG, 1995; ALBILLOS & DE LA HERA, 2002). Sais biliares inibem o crescimento bacteriano e ligam-se às suas endotoxinas, diminuindo a translocação (OGATA et al., 2002).

2.2.3 Mecanismos e patogênese

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

2.2.4 Prevenção e terapia

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

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

Probióticos, como *Lactobacillus*, inibiram o crescimento de bactérias Gram-negativas e patogênicas, atenuando sua invasão e aderência, estimularam a secreção de IgA, estabilizaram a barreira intestinal e modularam mecanismos imunológicos em modelos de injúria hepática, enterocolite e síndrome do intestino curto (WIEST & RATH, 2003). SEEHOFER et al. (2003) observaram menor taxa de translocação bacteriana em modelos de ressecção hepática parcial e anastomose de cólon, cuja dieta foi enriquecida com probióticos.

Fibras como pectina e inulina, não absorvidas pela mucosa intestinal, são fermentadas pelos probióticos no cólon, produzindo ácidos graxos de cadeia curta, como ácidos acético, butírico e propiônico. Estes ácidos graxos, em especial o ácido butírico, estimulam o crescimento da mucosa intestinal, reduzem a translocação e estimulam o sistema imunológico intestinal em pacientes cirúrgicos (RAYES et al., 2002).

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

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

2.3 Obstrução intestinal

2.3.1 Considerações gerais

Obstrução intestinal é interrupção total ou parcial do fluxo do conteúdo intestinal devida a obstáculo mecânico ou à interferência de um mecanismo funcional, podendo ocorrer súbita ou progressivamente (DANI & CASTRO, 1993). Pode ocorrer em qualquer nível intestinal, embora seja mais freqüente no intestino delgado,

principalmente no íleo distal, em virtude de sua luz mais estreita (DANI & CASTRO, 1993; COTRAN et al., 1999).

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

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

2.3.2 Fisiopatologia

A distensão intestinal é causada pelo acúmulo de gás deglutido e líquidos próximo ao segmento obstruído. O ar deglutido é rico em N_2 , não absorvido pela mucosa intestinal, H_2 e CH_4 , formados por bactérias do cólon e, possivelmente, pela microbiota alterada do delgado, devida à obstrução. O acúmulo de líquido deve-se ao líquido ingerido, saliva deglutida, suco gástrico, secreções biliares e pancreáticas e secreção aumentada de água e eletrólitos, principalmente sódio. A pressão intraluminal se eleva, causando danos à vascularização (DANI & CASTRO, 1993). A diminuição da perfusão resulta em menor oferta de O_2 à mucosa intestinal. Conseqüentemente, ocorre isquemia que pode evoluir em necrose da alça intestinal, dependendo do período e grau da hipoperfusão. Observa-se também aumento da permeabilidade intestinal que pode levar à invasão bacteriana e peritonite (SWANK & DEITCH, 1996; FAUCI et al., 1998). Ainda, durante a hipoperfusão, ocorre acidose da mucosa devido ao aumento da concentração de CO_2 . A acidose também se relaciona positivamente com aumento da permeabilidade intestinal (WIEST & RATH, 2003). A Figura 7 ilustra a fisiopatologia da obstrução intestinal.

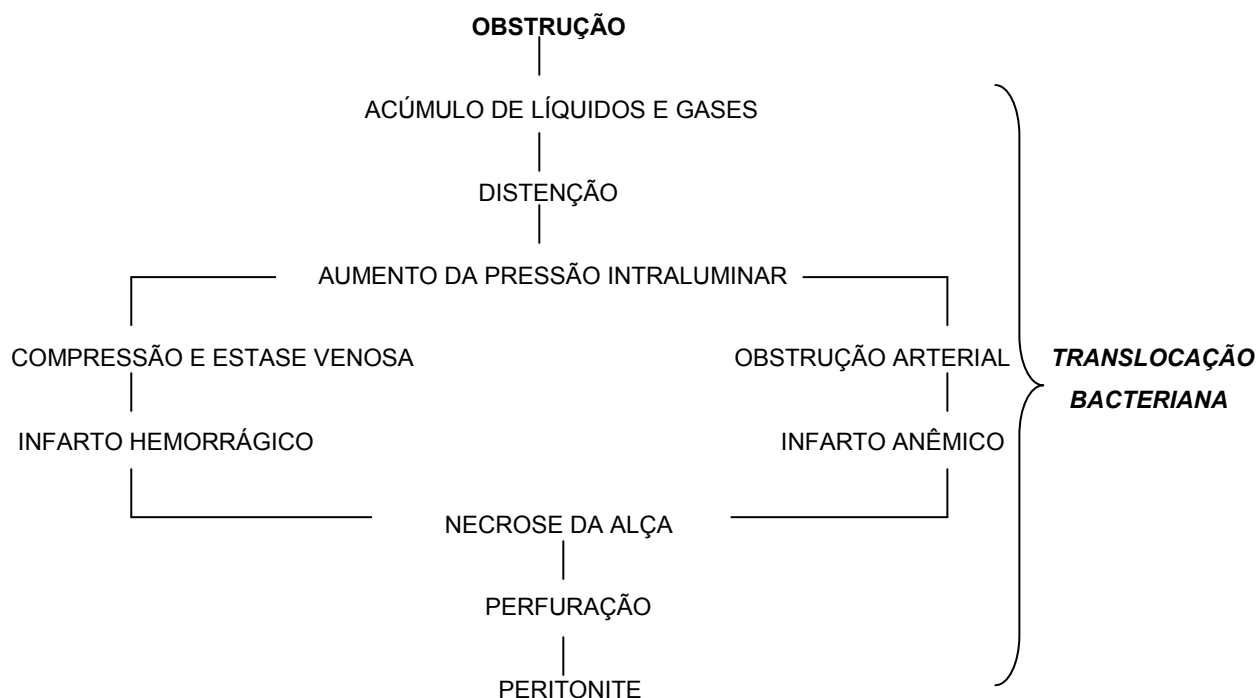


Figura 7: Fisiopatologia da obstrução intestinal. Alterações locais (DANI & CASTRO, 1993).

DEITCH (1989) demonstrou que a obstrução intestinal promove aumento da translocação para os NLM, mesmo na ausência de focos de infecção intra-abdominais. A incidência da translocação bacteriana em pacientes que apresentaram obstrução intestinal (59%) foi significativamente maior do que a incidência de pacientes que não apresentavam tal enfermidade (4%). Crescimento bacteriano, aumento da permeabilidade intestinal e/ou alteração da barreira mucosa foram relacionados com a translocação bacteriana.

2.4 Isótopo radioativo

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

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 (DINIZ et al., 1999).

Observou-se que após o procedimento de marcação, a célula bacteriana permanece preservada. Estudos relacionados à viabilidade da bactéria não indicaram diferenças significativas no crescimento em meio de cultura e nas unidades formadoras de colônias da ^{99m}Tc - *E.coli* e *E. coli* controle (DINIZ et al., 1999).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais e tratamento

Foram utilizados ratos machos, linhagem Wistar, cujo peso variou de 250 a 350 gramas. Os animais foram divididos nos seguintes grupos para avaliação da translocação bacteriana:

GRUPO CONTROLE: “*Sham*” operados” (ausência de obstrução intestinal) + Ração convencional (LABINA®) (n = 8)

GRUPO OINT: Obstrução intestinal + Ração convencional (LABINA®) (n = 8)

GRUPO ARG 300mg/dia: Obstrução intestinal + 300mg/dia de arginina (L-arginina, AJINOMOTO DO BRASIL, São Paulo, SP) acrescentadas à ração convencional (LABINA®) (n = 8)

GRUPO ARG 600mg/dia: Obstrução intestinal + 600mg/dia de arginina (L-arginina, AJINOMOTO DO BRASIL, São Paulo, SP) acrescentadas à ração convencional (LABINA®) (n = 8)

GRUPO IMPACT: Obstrução intestinal + 600mg/dia de arginina, presentes em 11,76 gramas de fórmula enteral Impact® Oral em pó (Novartis Biociências S.A., RJ, Brasil), também acrescentada à ração convencional (LABINA®) (n = 8).

GRUPO PADRÃO: Este grupo foi constituído por animais sadios que não passaram por qualquer processo cirúrgico e não receberam a inoculação da ^{99m}Tc-*E.coli*. Os animais desse grupo não receberam suplementação de arginina, apenas ração convencional. Os dados obtidos para os animais deste grupo representam os valores basais e fisiológicos para as análises hematológicas – série branca e ensaio de fagocitose (n=5)

Durante sete dias consecutivos, anteriores ao ato cirúrgico para promoção da obstrução intestinal, os animais tiveram o peso e ingestão calórica mensurados diariamente. Água foi fornecida *ad libitum*. Os grupos controle e OINT não receberam arginina e a ração convencional foi fornecida *ad libitum*. Os grupos Arg 300mg/dia e Arg 600mg/dia receberam, respectivamente, 300mg/dia e 600mg/dia de arginina pura

incorporadas à ração convencional. Os grupos Arg 300 mg/dia e Arg 600 mg/dia receberam a mesma dieta suplementada com arginina pura, variando apenas a quantidade oferecida a cada grupo. O grupo Impact® recebeu 600mg de arginina diárias por meio da fórmula enteral Impact®, também acrescentada à ração convencional. Os suplementos com arginina foram administrados durante 07 dias anteriores à cirurgia e à inoculação da ^{99m}Tc-*E.coli*. Após o consumo diário total da ração suplementada, os animais recebiam a ração convencional *ad libitum*.

Este estudo foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentos Animais CETEA / UFMG conforme protocolo n.º 102/05.

3.1.1 Preparo e cálculo da composição nutricional das dietas suplementadas

Para o preparo da dieta suplementada com arginina pura, foram utilizados os seguintes ingredientes nas suas respectivas proporções:

- Ração convencional em pó – 89%
- Arginina em pó – 6%
- Gelatina em pó incolor (a base de colágeno) – 4%
- Amido – 1%
- Água – qsp (quantidade suficiente para)

A ração na forma de pó foi fornecida pelo Biotério da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais. Inicialmente, homogeneizou-se a ração em pó e arginina. Em seguida, foram acrescentados gelatina em pó incolor, dissolvida em água destilada previamente aquecida, e amido, dissolvido em água destilada à temperatura ambiente. Finalmente, acrescentou-se água destilada (qsp) à temperatura ambiente. Todos os ingredientes foram intensamente homogeneizados até formação de massa uniforme, que foi subdividida em pequenos cilindros, similares à forma da ração tradicional. Estes cilindros sofreram secagem em estufa a 45°C, por 8 horas (Série D, Nova Ética, SP, BR). Após secagem, a ração obtida foi pesada para cálculo da quantidade diária a ser oferecida aos animais.

Para o preparo da dieta suplementada com a fórmula enteral, foram utilizados os seguintes ingredientes nas suas respectivas proporções:

- Fórmula enteral – 61,89%
- Ração convencional em pó - 38,11%
- Água - qsp

Igualmente ao preparo da dieta suplementada com arginina pura, homogeneizou-se a ração em pó e fórmula enteral. Em seguida, foi acrescentada água destilada à temperatura ambiente. Todos os ingredientes foram intensamente homogeneizados até formação de massa uniforme, que foi subdividida em pequenos cilindros, similares à forma da ração tradicional. Estes cilindros sofreram secagem a 45°C, por 8 horas (Série D, NOVA Ética / SP, BR). Após secagem, a ração obtida foi pesada para cálculo da quantidade diária a ser oferecida aos animais (ABREU, 2005).

A proporção dos ingredientes utilizados no preparo das dietas suplementadas foi estabilizada e padronizada a partir de testes experimentais. Adotou-se esta proporção uma vez que foi obtida massa de consistência adequada que, após secagem, foi bem aceita pelos animais.

A composição nutricional das dietas preparadas foi calculada a partir da composição nutricional da ração convencional e dos demais ingredientes acrescentados. A concentração de carboidrato nas dietas padrão e suplementadas foi obtida pelo método da diferença: CHO = Sólidos Totais – (Proteína + Lipídeos + Cinzas).

3.2 Cultivo e preparação da *Escherichia coli*

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

3.3 Procedimento de marcação da *Escherichia coli* com ^{99m}Tecnécio

Alíquotas de 2,0mL da suspensão bacteriana, descrita no item 3.2, foram incubadas a 37 °C com 1,0mL de solução de cloreto estanoso a 580µM (1,3mg/mL), pH 7,0, por 10 minutos (SnCl₂ – Sigma). Após este período, 37MBq a 55,5MBq de ^{99m}tecnécio na forma de Na^{99m}TcO₄ (pertechnetato de sódio), obtidos de gerador de ⁹⁹molibdênio/^{99m}tecnécio (IPEN/CNEM, São Paulo, Brasil) foram adicionados a cada

preparação e mantidos a 37 °C por mais 10 minutos. Os tubos foram centrifugados a 3000 rpm durante 25 minutos (centrífuga FANEN, São Paulo, Brasil) e uma alíquota de 100µL do sobrenadante foi retirada para a determinação da radioatividade. O precipitado foi ressuspensão em 3,0 mL de salina estéril e em seguida retirou-se uma alíquota de 100µL para contagem da radioatividade em contador de poço automático (ANSR, Abbot, EUA). Este procedimento foi repetido por três vezes (DINIZ et al., 2005). A porcentagem de ^{99m}Tc incorporado nas células bacterianas foi determinada do seguinte modo:

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

sendo cpm = contagem por minuto.

3.4 Modelo experimental de obstrução intestinal

Decorridos os sete dias de tratamento especial, os animais foram pesados e anestesiados intraperitonealmente com solução de cloridrato de 2-(2,6-xilidino)-5,6-dihidro-4H-1,3-tiazina (Rompun®) e cloridrato de ketamina (Dopalen®) nas concentrações de 8,7mg/Kg e 25,23mg/kg, respectivamente. A cirurgia para promoção da obstrução intestinal foi realizada conforme SALVALLAGIO et al. (2002). Incisão mediana de aproximadamente 3cm foi feita no abdome, com exposição do ceco e íleo terminal. Em seguida, este último sofreu ligadura com nó simples (fio de nylon 4.0, BRASURE, São Paulo, Brasil) a 1 cm da válvula íleo-cecal. O procedimento de inoculação da $^{99m}\text{Tc-E. coli}$ foi realizado de acordo com OLIVEIRA (2004). Após ligadura do íleo terminal, alíquota de $^{99m}\text{Tc-E. coli}$ correspondente a 11,1MBq foi administrada no lúmen intestinal na porção anterior à ligadura. Depois da verificação visual de que não houve vazamento, realizou-se a sutura da camada muscular abdominal (ponto simples contínuo) com fio de sutura catagute 4.0 e da pele (ponto simples separado) com fio de nylon 4.0. Todos os grupos passaram pelo mesmo processo. Deve-se ressaltar que o grupo controle não sofreu ligadura do íleo terminal, sendo submetido apenas ao estresse cirúrgico da abertura do abdome.

3.5 Estudo da translocação bacteriana

Após o procedimento cirúrgico e a administração da $^{99m}\text{Tc-E. coli}$, os animais foram mantidos em gaiolas individuais, por 24 horas com ração e água *ad libitum*. Após este período, os animais foram anestesiados conforme descrito no item anterior. O sangue (7mL) foi coletado da jugular e veia cava inferior e acondicionado em tubos contendo 3,0mL de anticoagulante (ACD-A, GRIFOLS, Murcia, Espanha). Em seguida, os animais foram sacrificados e os nódulos linfáticos mesentéricos (NLM), fígado, baço, pulmões e tireóide foram retirados, pesados e lavados para a determinação da radiação. A contagem da radioatividade foi corrigida pelo fator de decaimento para o Tecnécio (OLIVEIRA, 2004; DINIZ et al., 2005; GOMES, 2005).

Tabela 1: Fator de decaimento para $^{99m}\text{Tecnécio}$

Tempo (minutos)	Fator de decaimento (%)
30	5,6
60	10,8
90	15,8
120	20,5

A tabela 1 foi construída com base na equação $A = A_0 \times e^{-\lambda t}$ onde,

A = Atividade final

A_0 = Atividade inicial

e = Base do logaritmo neperiano

t = Tempo transcorrido entre as atividades inicial e final

λ = Constante de decaimento para o $^{99m}\text{Tecnécio}$ (0,1155)

3.6 Estudo de estabilidade de marcação da *Escherichia coli* com $^{99m}\text{Tecnécio}$

A estabilidade de marcação da *Escherichia coli* com $^{99m}\text{Tecnécio}$ foi verificada por meio da comparação dos valores de radiação na tireóide dos animais com os valores da radiação ambiental (Background). Estes valores foram fornecidos por meio de contador de radioatividade (ANSER, Abbot, SP, Brasil).

3.7 Hemograma - Série branca

O hemograma foi realizado no sangue total, coletado em tubo contendo anticoagulante EDTA. A contagem global de leucócitos foi determinada em contador automático (Contador COULTER T890, Miami, EUA). A contagem diferencial de leucócitos foi realizada por meio da observação, em microscópio ótico, de esfregaços corados pela técnica de May-Grunwald Giemsa. Este experimento foi realizado com o sangue coletado dos animais descritos no item 3.1, com exceção dos animais do grupo Arg 600mg/dia, uma vez que a dieta suplementada com a fórmula enteral Impact® também forneceu 600 mg diárias de arginina.

3.8 Ensaio de fagocitose

A capacidade fagocítica de leucócitos foi avaliada por meio do ensaio de fagocitose de *Candida albicans* (*C.albicans*). Os fungos foram mantidos em cultura em tubos contendo meio líquido Sabouraud e repicados mensalmente. Aproximadamente 24 horas antes de cada experimento, foi realizado novo repique de *Calbican* s. Retirou-se um inóculo, imediatamente antes do ensaio, o qual foi ressuspensão em solução de Hanks (Anexo II) para ajuste da concentração para 1×10^7 *C.albicans* /mL, em hemocitômetro de Neubauer.

A suspensão de *C.albicans* foi diluída v/v com pool de soro de ratos (diluído a 40% em solução de Hanks) e incubada em banho-maria por 30 minutos a 37°C para possibilitar a ocorrência de opsonização.

O sangue total (2mL) dos animais foi coletado em tubos contendo EDTA e o número total de leucócitos foi determinado em hemocitômetro de Neubauer após diluição com solução de Turkey 20% (Anexo II). O sangue foi então diluído em solução de Hanks para obtenção de suspensão contendo 1×10^6 leucócitos/mL.

Os fungos opsonizados foram então misturados ao sangue em volumes iguais (400µL) e incubados em banho-maria a 37°C por 1 hora.

Após a incubação, procedeu-se a diluição desta preparação a 1:5 em azul de Turkey 20%. Em seguida, 400µL foram aplicados em lâminas de vidro desengorduradas que foram mantidas em câmara úmida por 20 minutos a 37°C. Após este período de incubação, o excesso foi desprezado, restando as células aderidas ao vidro. As lâminas foram coradas pela técnica de May-Grunwald Giemsa.

A visualização das lâminas foi feita em microscópio com objetiva de imersão (aumento final de 1000 x). Foram observados, no mínimo, 100 fagócitos em cada lâmina, registrando-se a presença ou não de fagócitos. A porcentagem de fagócitos contendo *C.albicans* no citoplasma foi determinada por meio da fórmula (ULBRICH, 1999):

$$\% \text{ fagócitos com fungos} = \frac{n^{\circ} \text{ de fagócitos com fungos}}{n^{\circ} \text{ total de células}} \times 100$$

Este experimento foi realizado com o sangue coletado dos animais descritos no item 3.1, com exceção dos animais dos grupos controles e Arg 600mg/dia.

3.9 Análises estatísticas

Os resultados obtidos referentes à translocação bacteriana foram analisados pelo teste não paramétrico de Kruscall-Wallis e teste de Dunn . Os resultados foram expressos como medianas. As análises do ganho de peso, ingestão calórica e protéica e parâmetros hematológicos realizadas por meio de ANOVA – Teste de Duncan. As diferenças foram consideradas significativas se $p \leq 0,05$. Foi utilizado o programa para computador “BioEstat Versão 3.0 (Sociedade Civil Mamirauá / MCT – CNPq)”.

4 RESULTADOS

4.1 Composição das dietas convencional e suplementadas

A Tabela 2 apresenta a composição centesimal das dietas convencional e suplementadas.

Tabela 2: Composição centesimal das dietas convencional e suplementadas

Nutrientes/ Calorias	Dieta convencional	Dieta suplementada com arginina	Dieta suplementada com fórmula enteral
Carboidrato (%)	63,00	56,11	56,86
Lipídeo (%)	4,00	3,49	8,24
Proteína (%)	23,00	28,06	22,89
Caloria (Cal)	275,00	254,38	355,57

O conteúdo de carboidratos das dietas convencional e suplementadas foi calculado a partir do método da diferença: CHO = Sólidos totais – (proteínas + lipídeos + cinzas)

4.2 Avaliação da ingestão calórica, protéica e evolução do peso

A ingestão calórica média dos grupos controle, OINT, Arg 300mg/dia, Arg 600mg/dia e Impact foi de 65,61 (\pm 7,76), 66,64 (\pm 5,02), 67,82 (\pm 8,15), 71,92 (\pm 6,72) e 77,06 (\pm 3,04) calorias respectivamente (Figura 8). Observou-se que a ingestão calórica dos animais do grupo Impact® foi estatisticamente maior ($p < 0,01$) do que a ingestão dos animais dos grupos controle, OINT e Arg 300mg/dia.

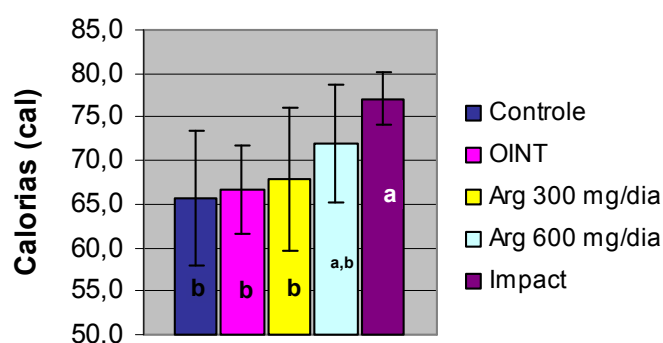


Figura 8: Ingestão calórica diária média.

Letras iguais indicam que não houve diferença significativa entre os tratamentos. Letras diferentes indicam que houve diferenças significativas entre os tratamentos.

De acordo com a Figura 9, observa-se que o consumo diário médio de proteínas foi estatisticamente maior ($p < 0,001$) nos animais dos grupos Arginina 300mg/dia e Arginina 600mg/dia, quando comparado com os demais grupos investigados.

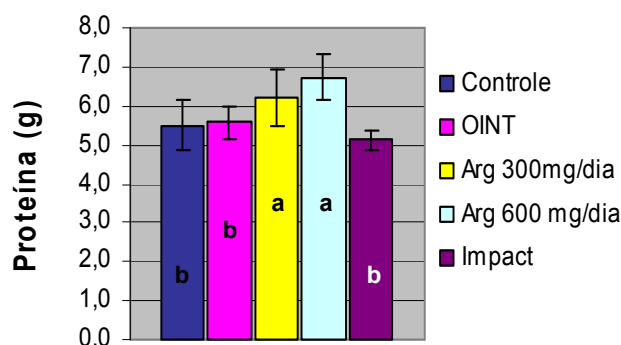


Figura 9: Ingestão protéica diária média.

Letras iguais indicam que não houve diferença significativa entre os tratamentos. Letras diferentes indicam que houve diferenças significativas entre os tratamentos.

O ganho de peso médio dos animais, durante 07 dias, dos grupos OINT, controle, Arginina 300mg/dia, Arginina 600mg/dia e Impact foi de 35,86 ($\pm 12,19$); 27,43 ($\pm 5,67$); 37,33 ($\pm 14,02$); 41,25 ($\pm 8,16$) e 36,74 ($\pm 9,84$), respectivamente (Figura 10). Não houve diferença significativa no ganho de peso entre os animais dos grupos investigados.

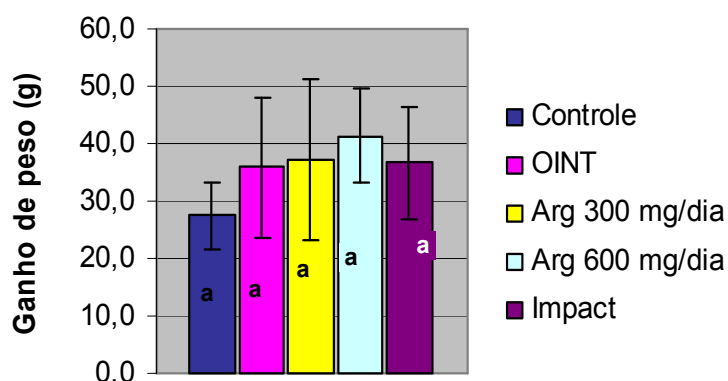


Figura 10: Ganho de peso médio.

Não houve diferença estatística entre os grupos.

4.3 Rendimento de marcação da *Escherichia coli* com ^{99m}Tc

O rendimento médio de marcação da *E. coli* com ^{99m}Tc foi de 98,44% ($\pm 1,08$), sendo $n=13$.

4.4 Estabilidade de marcação da *Escherichia coli* com ^{99m}Tc

Os dados da Tabela 3 mostram que a contagem média da radioatividade na tireóide dos animais dos diversos grupos investigados apresentou valores bem abaixo da radiação ambiental ou background (BKG)

Tabela 3: Radioatividade presente na tireóide

Grupos	Radioatividade na tireóide (cpm)	BKG (cpm)
Controle	15,75	
OINT	41,14	
Arg 300mg/dia	12,12	503,66
Arg 600mg/dia	37,62	
Impact®	23,75	

Os resultados foram expressos como média ($n=8$)
 BKG= Background médio ou radiação ambiental média
 Cpm= contagens de radioatividade por minuto (cpm)

4.5 Validação do modelo experimental de translocação bacteriana por obstrução intestinal, utilizando ^{99m}Tc - *Escherichia coli*

A Tabela 4 apresenta a biodistribuição da ^{99m}Tc -*E.coli* 24 horas após sua administração no íleo terminal. Observa-se que o sangue e os órgãos dos animais que sofreram obstrução intestinal (grupo OINT) apresentaram valores de captação da ^{99m}Tc -*E.coli* significativamente maiores, quando comparados com o sangue e órgãos dos animais que não sofreram obstrução intestinal (grupo controle).

Tabela 4: Biodistribuição da $^{99m}\text{Tc-E.coli}$ nos animais dos grupos controle e OINT, após 24 horas da sua administração no lúmen intestinal

Órgãos / Sangue	Grupo controle (cpm/g)	Grupo OINT (cpm/g)
Sangue	92,86 ^b	2.128,57 ^a
NLM	104,88 ^b	964,28 ^a
Baço	153,11 ^b	742,47 ^a
Fígado	177,32 ^b	1.144,19 ^a
Pulmão	74,68 ^b	613,15 ^a

Valores medianos (n=8)

cpm/g= contagem por minuto /grama

Letras diferentes em uma mesma linha indicam que houve diferença significativa.

Observouse que os animais do grupo controle apresentaram manutenção da coloração característica, sugerindo vascularização fisiológica das alças intestinais e do ceco. Em contraste, os animais do grupo OINT apresentaram intensa redução da coloração da alças intestinais, indicando um processo isquêmico.

4.6 Efeitos da arginina no processo de translocação bacteriana

Os dados da Tabela 5 mostram que os animais que receberam arginina nas concentrações de 300mg/dia, 600mg/dia ou presente na fórmula enteral apresentaram redução significativa na captação da $^{99m}\text{Tc-E.coli}$ em todos os órgãos e sangue, quando comparados com os animais do grupo OINT.

Quando se compararam os resultados da biodistribuição da $^{99m}\text{Tc-E.coli}$ nos animais que receberam arginina pura ou presente na fórmula enteral com a biodistribuição dos animais do grupo controle (“sham” operados), observou-se que não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos (Tabela 6).

Tabela 5: Biodistribuição da $^{99m}\text{Tc-E.coli}$ nos grupos OINT, Arg 300mg/dia, Arg 600 mg/dia e Impact®, após 24 horas da sua administração no lúmen intestinal

Órgãos /Sangue	Grupo OINT (cpm/g)	Grupo Arg 300mg/dia (cpm/g)	Grupo Arg 600mg/dia (cpm/g)	Grupo Impact® (cpm/g)
Sangue	2.128,57 ^a	150,00 ^b	68,75 ^b	250,00 ^b
NLM	964,28 ^a	45,86 ^b	193,98 ^b	187,94 ^b
Baço	742,47 ^a	108,62 ^b	132,55 ^b	82,04 ^b
Fígado	1.144,19 ^a	238,21 ^b	226,21 ^b	189,68 ^b
Pulmão	613,15 ^a	55,35 ^b	121,38 ^b	59,30 ^b

Valores medianos (n=8)

Cpm =Contagem por minuto /grama

NLM = Nódulos linfáticos mesentéricos

Letras iguais em uma mesma linha indicam que não houve diferença significativa entre os grupos. Letras diferentes em uma mesma linha indicam que houve diferença significativa.

Tabela 6: Biodistribuição da $^{99m}\text{Tc-E.coli}$ nos grupos controle, Arg 300mg/dia, Arg 600 mg/dia e Impact, após 24 horas da sua administração no lúmen intestinal

Órgãos /Sangue	Grupo controle (com/g)	Grupo Arg 300mg/dia (cpm/g)	Grupo Arg 600mg/dia (cpm/g)	Grupo Impact® (cpm/g)
Sangue	92,86 ^b	150,00 ^b	68,75 ^b	250,00 ^b
NLM	104,88 ^b	45,86 ^b	193,98 ^b	187,94 ^b
Baço	153,11 ^b	108,62 ^b	132,55 ^b	82,04 ^b
Fígado	177,32 ^b	238,21 ^b	226,21 ^b	189,68 ^b
Pulmão	74,68 ^b	55,35 ^b	121,38 ^b	59,30 ^b

Valores medianos (n=8)

Cpm = Contagem por minuto /grama

NLM = Nódulos linfáticos mesentéricos

Letras iguais em uma mesma linha indicam que não houve diferença significativa entre os grupos.

4.7 Hemograma – série branca

De acordo com a Tabela 7, verifica-se que os animais do grupo controle apresentaram contagem global de leucócitos estatisticamente mais elevada ($p \leq 0,05$) quando comparado aos demais. Em relação à percentagem de neutrófilos, não houve diferença estatística entre os grupos, exceto no grupo padrão, que apresentou menor percentual de tais células. Ainda, o grupo padrão apresentou percentual de linfócitos estatisticamente maior em relação aos demais grupos. O percentual de monócitos se mostrou estatisticamente mais elevado nos grupos tratados com arginina (Arg 300 mg/dia e Impact®).

Tabela 7 : Hemograma (série branca)

Grupos	Leucócitos x $10^3/\text{mL}$	Neutrófilos (%)	Linfócitos (%)	Monócitos (%)
Padrão	$9,20 \pm 2,30^b$	$15,60 \pm 4,34^b$	$76,20 \pm 9,96^a$	$1,20 \pm 1,30^{b,c}$
Controle	$12,18 \pm 1,71^a$	$45,00 \pm 13,45^a$	$53,60 \pm 12,50^b$	$0,40 \pm 0,89^c$
OINT	$8,26 \pm 1,84^{b,c}$	$58,60 \pm 10,43^a$	$40,60 \pm 10,14^b$	ND ^c
Arg 300mg/dia	$6,92 \pm 2,29^{b,c}$	$45,20 \pm 5,02^a$	$50,80 \pm 6,30^b$	$3,00 \pm 2,00^{a,b}$
Impact®	$5,76 \pm 2,05^c$	$44,20 \pm 16,18^a$	$49,00 \pm 14,98^b$	$4,00 \pm 3,08^a$

Os dados foram expressos em média \pm desvio padrão, sendo $n=5$ por grupo.

ND – Não detectado

Letras iguais em uma mesma coluna indicam que não houve diferença significativa entre os tratamentos. Letras diferentes em uma mesma coluna indicam que houve diferenças significativas entre os tratamentos.

4.8 Ensaio de fagocitose

Os animais do grupo Impact® apresentaram percentagem de fagócitos com *C.albicans* estatisticamente maior em relação aos animais dos grupos OINT e Arg 300 mg/dia. Os animais do grupo padrão não apresentaram nenhuma célula fagocítica com *C. albicans* no seu interior.

Tabela 8 : Porcentagem de fagócitos com *C. albicans*

Grupos	% de fagócitos com <i>C. albicans</i>
Padrão	ND
OINT	9,5 ^a
Arg 300mg/dia	9,8 ^a
Impact®	21 ^b

Os dados foram expressos em média \pm desvio padrão, sendo n=5 por grupo.

ND – Não detectado

Letras iguais em uma mesma coluna indicam que não houve diferença significativa entre os tratamentos.

Letras diferentes em uma mesma coluna indicam que houve diferenças significativas entre os tratamentos

5 DISCUSSÃO

Imunonutrição é definida como o efeito de nutrientes específicos - arginina, glutamina, ω -3 e nucleotídeos - sobre a função imunológica. Estudos clínicos e experimentais revelaram que a imunonutrição pode regular a resposta imunológica, controlar a inflamação, modular a síntese de proteínas constitutivas e de fase aguda, melhorar a oxigenação e a função da barreira intestinal após a injúria, reduzindo a morbidade e mortalidade (CERRA 1991; GRIMBLE & GRIMBLE, 1998; GIANOTTI et al., 2002; YEH, 2004). Muitos estudos experimentais demonstraram que arginina exógena, infundida ou suplementada na dieta, pode elevar a síntese de IgA intestinal, acelerar a regeneração da mucosa após injúrias provocadas por queimaduras ou radiação, aumentar o fluxo sanguíneo na região do íleo, alterações estas que podem reduzir o nível de translocação bacteriana (WANG et al.; 1996; GURBUZ et al.; 1998; ERSIN et al.; 2000; MATHESON et al.; 2003; SHANG et al.; 2004; EVANS et al., 2004). Neste trabalho, foi avaliado o papel deste aminoácido no processo de translocação bacteriana em modelo de obstrução intestinal.

A composição nutricional das dietas está ilustrada na Tabela 2. Observou-se pequena redução dos níveis de carboidrato, lipídeos e calorias da dieta suplementada com arginina em relação à dieta convencional. Isto pode ser explicado pela composição nutricional dos ingredientes (arginina, gelatina e amido) acrescentados durante o preparo, resultando em acréscimo de massa. Deve ser ressaltado que a gelatina em pó e a arginina não apresentam carboidratos nem lipídios em sua composição. Ainda, o acréscimo de 1% de amido pouco contribuiu na concentração final de carboidrato nesta dieta (Anexo I; Tabelas 11 e 12).

A arginina, por ser um aminoácido, influenciou diretamente na elevação do conteúdo protéico da dieta suplementada. Ainda, acrescentou-se gelatina em pó durante o preparo deste tipo de dieta. Deve ser ressaltado que a gelatina é composta praticamente por proteína (Anexo I; Tabela 11) o que também contribuiu para elevação do conteúdo protéico desta dieta.

Alguns estudos experimentais que utilizaram dietas comuns ou enterais enriquecidas com arginina obtiveram fórmulas isocalóricas e isoprotéicas, quando comparadas com dietas padrão (GURBUZ et al., 1998; ERSIN et al., 2000; TSAI et al., 2002; MATHESON et al., 2003; SHANG et al., 2003; SHANG et al., 2004). A análise das composições inicial e final das dietas utilizadas por estes autores revelou que ocorre substituição de parte da caseína das dietas tradicionais pela arginina. Portanto, não ocorre alteração no seu conteúdo protéico. Neste trabalho, não foram possíveis

tais substituições, sendo realizado somente o acréscimo da arginina. Deste modo, elevou-se o conteúdo protéico da dieta obtida.

A dieta suplementada com Impact® também apresentou discreta diminuição na concentração de carboidratos, uma vez que a fórmula enteral possui menor conteúdo deste nutriente em relação à ração convencional. Já a elevação da concentração lipídica final foi consequência do alto conteúdo lipídico da fórmula Impact® quando comparado com a ração convencional. Conseqüentemente, elevou-se o valor calórico final nesta dieta. Não houve alteração no teor final de proteína, uma vez que a dieta convencional e a fórmula enteral apresentam o mesmo conteúdo protéico (Anexo I; Tabelas 9 e 10).

Os dados obtidos neste trabalho mostraram que os animais que receberam a dieta suplementada com a fórmula enteral Impact® apresentaram aumento significativo da ingestão calórica, quando comparados com os animais dos grupos controle, OINT e Arginina 300mg/dia (Figura 8). Este resultado pode ser explicado pelo maior conteúdo calórico da dieta suplementada com a fórmula enteral. Deve-se ressaltar que grande parte da ingestão dos animais deste grupo (79,5%) era proveniente da dieta suplementada. O grupo Arg 600mg também apresentou ingestão calórica estatisticamente mais elevada (Figura 10). Neste caso, tal fato pode ser explicado simplesmente por maior consumo da dieta padrão, já que o fornecimento da dieta suplementada foi controlado (10g/dia) e não houve grande diferença no seu valor calórico em relação à dieta padrão.

A ingestão protéica apresentou-se significativamente mais elevada nos grupos Arg 300mg/dia e Arg 600mg/dia (Figura 9). Este resultado é consequência do maior conteúdo protéico da dieta suplementada com arginina. Como as dietas convencional e suplementada com fórmula enteral eram isoprotéicas, não houve diferença significativa no consumo protéico dos grupos controle, OINT e Impact®.

Todos os animais ganharam peso ao longo do experimento (Figura 10). Mesmo com variações no valor nutricional das dietas, ingestão calórica e protéica, não houve diferenças significativas no ganho de peso entre os grupos. Curto período de tempo do experimento e reduzido tamanho da amostra podem ser apontados como explicações para este resultado. Optou-se trabalhar com ganho de peso (diferença entre peso final e inicial) ao invés de peso final, devido a variações no peso inicial dos animais, interferindo diretamente no seu peso final.

O íon $^{99m}\text{TcO}_4^-$, por ser um íon monovalente negativo de peso molecular maior do que 100, comporta-se na circulação sanguínea da mesma forma do íon iodeto.

Desta forma, estando livre na circulação, o íon $^{99m}\text{TcO}_4^-$ é rapidamente captado pela glândula tireóide. Conforme a Tabela 3, os valores de radioatividade encontrados na tireóide foram inferiores àqueles obtidos para o “background” ou radiação ambiental, significando níveis desprezíveis de radiação. Isto sugere que não existe radioatividade livre, ou seja, os átomos de ^{99m}Tc encontram-se ligados à bactéria *E.coli*. Estes dados sugerem estabilidade da marcação da bactéria com os átomos radioativos do ^{99m}Tc .

Os resultados referentes à biodistribuição da $^{99m}\text{Tc-E.coli}$ no grupo OINT mostraram aumento estatisticamente significativo na captação da $^{99m}\text{Tc-E.coli}$ por todos os órgãos e sangue, quando comparados aos respectivos controles (Tabela 4). Estes dados indicam que a obstrução intestinal, provocada por nó simples na região do íleo terminal, contribuiu para o processo de translocação da $^{99m}\text{Tc-E.coli}$ para os órgãos analisados. Com base na literatura, constata-se que a obstrução intestinal pode contribuir para a translocação bacteriana por diversos mecanismos. CHANG et al. (2001) relataram que o acúmulo intraluminal de líquido, observado nos animais que sofreram obstrução intestinal, favorece a translocação bacteriana. Por outro lado, existem também relatos mostrando que alterações microvasculares promovem aumento da permeabilidade intestinal, por meio de lesões nas junções epiteliais (MACFIE, 2000). A perda da coloração ruborizada das alças intestinais dos animais do grupo OINT sugere quadro de isquemia mesentérica. Sabe-se que a diminuição da perfusão sanguínea resulta em menor oferta de O_2 à mucosa intestinal. Este fato contribui para o quadro de isquemia e acidose tissular, podendo evoluir em necrose da alça intestinal. Deste modo, ocorre o aumento da permeabilidade intestinal o que leva ao processo de translocação bacteriana. (SCHELEIFFER & RAUL, 1996; SWANK & DEITCH, 1996; FAUCI et al., 1998; STALLION et al., 2005, WASA et al., 2005). Portanto, a falta de perfusão sanguínea (isquemia) observada nas alças intestinais dos animais que sofreram obstrução intestinal pode ter contribuído para o aumento da permeabilidade, justificando a intensa captação da $^{99m}\text{Tc-E.coli}$ pelos órgãos investigados e sangue.

SAMEL et al. (2002) demonstraram, em modelo experimental de obstrução intestinal similar ao utilizado nesse trabalho, que a obstrução favorece a translocação bacteriana para NLM, fígado e baço. DEITCH (1989) mostrou, em humanos, que a obstrução intestinal promove aumento da translocação para os NLM, mesmo na ausência de focos de infecção intra-abdominais. A incidência da translocação bacteriana em pacientes que apresentaram obstrução intestinal foi significativamente

maior do que a incidência de pacientes que não apresentavam tal enfermidade. Estes estudos são unânimes em apontar crescimento bacteriano exacerbado, aumento da permeabilidade intestinal e/ou alteração da barreira mucosa como fatores etiológicos da translocação bacteriana.

A translocação da ^{99m}Tc -*E.coli* também foi observada, em um grau significativamente reduzido, nos animais do grupo controle, animais que não sofreram obstrução intestinal (Tabela 4). Do mesmo modo, OLIVEIRA (2004) e GOMES (2005) observaram a ocorrência da translocação bacteriana, em níveis reduzidos, em animais “sham” operados. A translocação bacteriana em animais “sham” operados também foi observada SAMEL et al. (2002), citado anteriormente. Estes resultados encontram suporte em MACFIE (2000) e LICHITMAN (2001) que consideram a translocação bacteriana um fenômeno fisiológico, podendo ocorrer independentemente de alterações no trato gastrintestinal, sendo necessário para o desenvolvimento e ajuste do sistema imunológico gastrintestinal. Portanto, a translocação bacteriana observada nos animais do grupo controle representa a translocação fisiológica.

Os dados da Tabela 5 mostram que animais que receberam o tratamento com arginina, nas concentrações de 300 e 600mg/dia ou presente na fórmula enteral apresentaram níveis estatisticamente reduzidos de translocação da ^{99m}Tc -*E.coli* para os órgãos analisados, quando comparados com os animais que sofreram a obstrução intestinal (grupo OINT). Outro resultado importante que deve ser ressaltado é que os valores de captação da ^{99m}Tc -*E.coli* para todos os órgãos investigados dos animais dos grupos que receberam arginina foram estatisticamente iguais aos valores obtidos no grupo controle (Tabela 6). Este resultado mostra que a arginina foi eficaz em reduzir o processo de translocação bacteriana a níveis fisiológicos. A ação da arginina em reduzir a translocação bacteriana também foi citada por alguns autores. WANG et al (1996), trabalhando com modelo de nutrição parenteral, notaram que a suplementação de arginina (787mg/dia), reduziu a translocação da *E.coli* e *Proteus mirabilis* para os NLM. GURBUZ et al (1998) e ERSIN et al. (2000) utilizando um modelo experimental de enterite, relataram que a arginina (pura) nas concentrações de 420, 330 e 720mg/dia também diminuiu a translocação bacteriana para os NLM. A arginina foi capaz de reduzir a translocação bacteriana para outros órgãos, mesmo em modelos experimentais diferentes do utilizado neste trabalho. É importante observar que as doses utilizadas nestes estudos estão dentro da faixa de concentração adotada nesse presente trabalho.

Os resultados da Tabela 5 mostraram, ainda, que a fórmula Impact® reduziu a captação de $^{99m}\text{Tc-E.coli}$ em todos os órgãos investigados, cujos valores de captação foram estatisticamente iguais àqueles observados no grupo controle. MATHESON et al. (2003) e RHODEN et al. (2002) mostraram que o uso da fórmula Impact® durante cinco dias, em situações fisiológicas, proporcionou aumento do fluxo sanguíneo na região do jejuno terminal e íleo de ratos. Portanto, é possível especular que a redução da translocação bacteriana observada nos animais do grupo Impact® possa ter sido mediada pela ação da arginina e outros imunonutrientes presentes nesta formulação sobre o fluxo sanguíneo. Esta ação pode ter contribuído para minimizar os efeitos da obstrução intestinal sobre a redução do fluxo sanguíneo na região do íleo, aumentando a eficácia da barreira intestinal.

Outra hipótese que também deve ser considerada para explicar a redução dos níveis de translocação da $^{99m}\text{Tc-E.coli}$ nos animais que receberam a suplementação de arginina seria o aumento da secreção de IgA, uma vez que esta imunoglobulina liga-se a patógenos invasores (bactérias, vírus e outras moléculas tóxicas) impedindo sua aderência à superfície da mucosa (WU et al., 1999). SAWAI et al. (2001) demonstraram que a sIgA liga-se diretamente a *E.coli*, prevenindo sua adesão à superfície epitelial da mucosa gastrointestinal. SHANG et al. (2004) trabalhando com modelo de peritonite induzida por ligação cecal, modelo similar ao utilizado neste trabalho, mostraram que a suplementação prévia de arginina (430mg/dia) elevou os níveis de IgA e o número de linfócitos nas placas de Peyer.

Neste trabalho, o hemograma foi realizado para investigação da possível ação da arginina sobre as células do sistema imunológico, tendo sido observado que este aminoácido afetou apenas a porcentagem de monócitos (Tabela 7). Não houve diferença estatisticamente significativa na contagem global de leucócitos entre os grupos OINT, Arg 300mg/dia e Impact®, indicativo de que o tratamento com arginina não apresentou efeito na concentração de leucócitos totais. Quando realizada a contagem diferencial de leucócitos, observou-se que o percentual de neutrófilos foi estatisticamente superior nos animais que sofreram obstrução intestinal (OINT, Arg 300 e Impact®) e nos animais do grupo controle em relação aos animais do grupo padrão (Tabela 7). Os neutrófilos são os leucócitos circulantes mais abundantes e representam as principais células imunológicas presentes durante o estágio inicial da inflamação, exercendo intensamente sua capacidade fagocítica. Estas células são consideradas a primeira linha de defesa no processo infeccioso (ABBAS et al., 2003; UTHAISANGSOOK et al., 2002). O aumento do percentual de neutrófilos sugere

ativação destas células na presença de processo inflamatório, causado pela inoculação da *E.coli* e pelo trauma cirúrgico.

Os dados da Tabela 7 também mostram que não houve diferença significativa nas contagens de linfócitos entre os grupos controle, OINT, Arg 300mg/dia e Impact®. Provavelmente, o período de 24 horas, tempo decorrido entre a inoculação da ^{99m}Tc-*E.coli* e a coleta do sangue para a realização do hemograma, não foi suficiente para a detecção do aumento do número de linfócitos no sangue periférico. Linfócitos são células características da resposta adaptativa. Assim, sua replicação é observada com maior clareza somente na fase mais tardia do processo inflamatório (ABBAS et al., 2003). A redução do percentual de linfócitos observada nos animais dos grupos controle, OINT, Arg 300mg/dia e Impact®, em relação ao grupo padrão, pode ser consequência do processo agudo de inflamação. Com o aumento da porcentagem de neutrófilos, a proporção de linfócitos foi reduzida nestes grupos, caracterizando um quadro de inflamação aguda, no qual há o predomínio de células polimorfonucleares.

Outro dado que necessita ser ressaltado é o significativo aumento do percentual de monócitos nos animais que receberam a suplementação de arginina, sugerindo replicação destas células e ativação do sistema de defesa inata (Tabela 7). Monócitos, juntamente com neutrófilos, são as principais células sanguíneas fagocíticas (SETHI & DIKSHIT, 2000).

Os grupos OINT, Arg 300mg/dia e Impact® apresentaram aumento da capacidade fagocítica (> 3%) em relação aos animais do grupo padrão (não detectada). Percentual de fagócitos com *C. albicans* maior que 3% é considerado sinal de aumento da capacidade fagocítica (LEHRER & CLINE, 1969). A inoculação de bactérias e trauma cirúrgico provavelmente desencadearam resposta inflamatória, estimulando o processo de fagocitose. Não houve diferença estatística na porcentagem de fagócitos com fungos entre os animais dos grupos Arg 300 mg/dia e OINT (9%). Por outro lado, a porcentagem de fagócitos com *C.albicans* no grupo Impact® (21%) foi estatisticamente superior à encontrada nos grupos OINT e Arg 300mg/dia. A associação de imunonutrientes presentes na fórmula enteral (arginina, -3, RNA e fibras solúveis) pode estar contribuindo sinergicamente sobre a imunidade inata, intensificando o processo de fagocitose.

O aumento da fagocitose da ^{99m}Tc-*E.coli* sugere mais um possível mecanismo mediado pela arginina, associada a outros imunonutrientes, na redução da translocação bacteriana observada nos animais do grupo Impact®. Alguns estudos experimentais mostraram que a suplementação com arginina pode estimular a

fagocitose. WANG et al. (2003) relataram que suplementação de dieta enteral com arginina elevou a capacidade fagocítica de macrófagos peritoniais e reduziu a contagem de bactérias no fluido peritoneal, em modelo de septicemia. Estudo realizado por TSAI et al. (2002) mostrou que macrófagos de animais que receberam suplementação de arginina apresentaram secreção de TNF- α frente a estímulo com LPS. Macrófagos de animais que receberam dieta convencional não responderam a tal estímulo. Os autores sugeriram que a arginina estimulou a ativação de macrófagos.

Considerando os resultados apresentados, a arginina tanto na concentração de 300 ou 600mg/dia, pura ou presente na fórmula Impact®, foi capaz de reduzir a translocação bacteriana para níveis fisiológicos. Estes dados sugerem que a arginina é um potente imunonutriente que poderá contribuir para reduzir as complicações sépticas advindas da translocação bacteriana, observadas em diversas situações clínicas. Entretanto, novos estudos tornam-se necessários para o melhor entendimento dos mecanismos da ação da arginina na redução da translocação bacteriana.

6 CONCLUSÕES

- A suplementação de arginina, nas concentrações de 300 e 600mg/dia, foi capaz de reduzir a translocação bacteriana a níveis fisiológicos para NLM, baço, fígado, pulmão e sangue.
- A suplementação de arginina, presente na fórmula enteral Impact®, também foi capaz de reduzir a translocação bacteriana a níveis fisiológicos para os órgãos estéreis e sangue.
- A suplementação com a fórmula Impact® promoveu aumento significativo na capacidade fagocítica das células de defesa.

7 PERSPECTIVAS FUTURAS

- Investigar o efeito trófico da arginina sobre a mucosa intestinal, avaliando a permeabilidade intestinal utilizando Ácido dietilenotriaminopentacético (DTPA) marcado com $^{99m}\text{Tecnécio}$.
- Determinar os níveis de IgA, óxido nítrico e poliaminas em animais controle e tratados com arginina.
- Avaliar alguns parâmetros imunológicos como a subpopulação de linfócitos e o perfil de algumas citocinas TH1 (IL-1, IL-2, e TNF- α) com o objetivo de investigar as respostas imunológica e inflamatória no processo de obstrução intestinal, em animais tratados e não tratados com arginina.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A.H.; POBER, J.S. *Imunologia celular e molecular*. 4 ed. Rio de Janeiro: Revinter Ltda, 2003. 958p.

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

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

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

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

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

BARBER, A.E.; JONES, W.G.; MINEI, J.P.; FAHEY, T.; LOWRY, S.F.; SHIRES, T. Bacterial overgrowth and intestinal atrophy in the etiology of gut barrier failure in the rat. *The American Journal of Surgery*, v. 161, p. 300-304, 1991.

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

CERRAF, B. Nutrient modulation of inflammatory and immune function. *The American Journal of Surgery*, v. 161, p. 230-234, 1991.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

- EVANS, R.W.; FERNSTROM, J.D.; THOMPSON J.; MORRIS, S.M.; KULLER, L.H. Biochemical responses of healthy subjects during dietary supplementation with L-arginine. *Journal of Nutritional Biochemistry*, v. 15, p. 534-539, 2004.
- EVOY, D.; LIEBERMAN, M.D.; FAHEY, T.J.; DALY, J.M. Immunonutrition: The role of arginine. *Nutrition*, v. 14, p. 614 617, 1998.
- FAUCI, A.S.; BRAUNWALD, E.; ISSELBACHER, K.J.; MARTIN, J.B.; KASPER, D.L.; HAUSER, S.; LONGO, D.L. *Harrison – Medicina interna*. 14. ed. Rio de Janeiro: McGraw Hill Interamericana do Brasil Ltda., 1998. 2967 p.
- FILHO, G.B. *Bogliolo – Patologia*. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A, 2000. 1328 p.
- GIANOTTI, L.; BRAGA, M.; NESPOLI, L.; RADAELLI, G.; BENEDUCE, A.; DI CARLO, V. A randomized controlled trial of preoperative oral supplementation with a specialized diet in patients with gastrointestinal cancer. *Gastroenterology*, v. 122, p. 1763-1770, 2002
- GOMES, M.A.G. *Influência da desnutrição energético-protéica no processo de translocação bacteriana em modelo experimental de obstrução intestinal*. Faculdade de Farmácia da UFMG, 2005. 72 p. (Dissertação, Mestrado em Ciência de Alimentos).
- GRIMBLE, R.F.; GRIMBLE, G.K. Immunonutrition: role of sulfur amino acids, related amino acids and polyamines. *Nutrition*, v. 14, p. 605 610, 1998.
- GURBUZ, A.T.; KUNZELMAN, J.; RATZER, E.E. Supplemental dietary arginine accelerates intestinal mucosal regeneration and enhances bacterial clearance following radiation enteritis in rats. *Journal of Surgical Research*, v. 74, p. 149-154, 1998.
- HALLEMEESCHI, M.M.; LAMERS, W.H.; DEUTZ, N.E.P. Reduced arginine availability and nitric oxide production. *Clinical Nutrition*, v. 21, p. 273 279, 2002.

- KOBAYASHI, T.; YAMAMOTO, M.; HIROI, T.; MCGHEE, J.; TAKESHITA, Y.; KIYONO, H. Arginine enhances induction of T Helper 1 and T Helper 2 cytokine synthesis by Peyer's Patch $\alpha\beta$ T cells and antigen – specific mucosal immune response. *Bioscience Biotechnology Biochemistry*, v. 62, p. 2334 – 2340, 1998.
- KUDSK, K.A. Current aspects of mucosal immunology and its influence by nutrition. *The American Journal of Surgery*, v. 183, p. 390-398, 2002.
- LEHRER, R.J.; CLINE, M.J. Interaction of *Candida albicans* with human leukocytes and serum. *Journal of Bacteriology*, v. 198, p. 996-1002, 1969.
- LICHTMAN, S.M. Bacterial translocation in humans. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, v. 33, p. 1-10, 2001.
- MACFIE, J. Enteral versus parenteral nutrition: the significance of bacterial translocation and gut-barrier function. *Nutrition*, v. 16, p. 606 611, 2000.
- MATHESON, P.J.; HURT, R.T.; MITTEL, O.L., WILSON, M.A.; SPAIN, D.A.; GARRISON, N. Immune-enhancing enteral diet increase blood flow and proinflammatory cytokines in rat ileum. *Journal of Surgical Research*, v. 110, p. 360-370, 2003.
- NIEVES JR, C.; LANGKAMP-HENKEN, B. Arginine and immunity: a unique perspective. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, v. 56, p. 471-482, 2002.
- O'BOYLE, C.J.; MACFIE, J.; DAVE, K.; SAGAR, P.S.; POON, P.; MITCHELL, C.J. Alterations in intestinal barrier function do not predispose to translocation of enteric bacteria in gastroenterologic patients. *Nutrition*, v. 14, p. 358-362, 1998.
- OCHOA, J.B.; MAKARENKOVA, V.; BANSAL, V. A rational use of immune enhancing diets: when should we use dietary arginine supplementation. *Nutrition in Clinical Practice*, v. 19, p. 216 225, 2004.

- OGATA, Y.; NISHI, M.; NAKAYAMA, H. KUWAHARA, T. OHNISHI, Y.; TASHIRO, S. Role of bile in intestinal barrier function and its inhibitory effect on bacterial translocation in obstructive jaundice in rats. *Journal of Surgical Research*, v.115, p. 18-23, 2002.
- OLIVEIRA, M.A. *O efeito da glutamina na translocação bacteriana em ratos*. Belo Horizonte: Faculdade de Farmácia da UFMG, 2004. 85 p. (Dissertação, Mestrado em Ciência de Alimentos).
- PITMAN R.S.; BLUMBERG, R.S. Intestinal epithelial cells and mucosal immunity. *Journal of Gastroenterology*, v. 35, p. 805-814, 2000
- RAYES, N.; HANSEN, S.; SEEHOFER, D.; MULLER, A.R.; SERKE, S.; BENGMARK, S.; NEUHAUS, P. Early enteral supply of fiber and lactobacilli versus conventional nutrition: a controlled trial in patients with major abdominal surgery. *Nutrition*, v. 18, p. 609-615, 2002.
- RODEN, D.; MATHESON, P.J.; CARRICATO, N.D.; SPAIN, D.A.; GARRISON, R.N. Immune-enhancing enteral diet selectively augments ileal blood flow in the rat. *Journal of Surgical Research*, v. 106, p. 25-30, 2002.
- RUIZ-SILVA, M.; SILVA, R.M., MENCHACA -DIAZ, J.L.; SIQUEIRA, A.F.R.S BUZZUTTI, F.I.; SILIANO, P.R; TAJIKI, M.H.; SALOMÃO, R.; FAGUNDES-NETO, U.; MORAIS, M.B.; KOH, I.H.J. Substantial changes in the intestine-derived lymph during bacterial translocation. *Transplantation Proceedings*, v. 34, p. 1001-1002, 2002.
- SALVALLAGIO, P. R. O., NETO, C. Z., TOLAZZI, A. R. D., GASPARETTO, E. L., COELHO, J. C. U., CAMPOS, A. C. L. oral glutamine does not prevent bacterial translocation in rats subjected to intestinal obstruction and *Escherichia coli* challenge but reduces systemic bacteria spread. *Nutrition*, v.18, p. 334-337, 2002.
- SAMEL, S.; KEESE, M.; KLECZKA, M.; LANIG, S.; GRETZ, N.; HANFNER, M.; STURM, J.; POST, S. Microscopy of bacterial translocation during small bowel

obstruction and ischemia in vivo – a new animal model. *BMC Surgery*, v. 2, p. 6-11, 2002.

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

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

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

SETHI, S. & DIKSHIT, M. Modulation of polymorphonuclear leukocytes function by nitric oxide. *Thrombosis Research*, v. 100, p. 223-247, 2000.

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

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

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

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

- STALLION, A.; KOU, T.D.; LATIFI, S.Q.; MILLER, K.A.; DAHMS, B.B.; DUDGEON, D.L.; LEVINE, A.D. Ischemia / reperfusion: a clinically relevant model of intestinal injury yielding systemic inflammation. *Journal of Pediatric Surgery*, v. 40, p. 470-477, 2005.
- STEINBERG, S.M. Bacterial translocation: what it is and what it is not. *The American Journal of Surgery*, v. 186, p. 301-305, 2003.
- SUGIURA, T.; TASHIRO, T.; YAMAMORI, H.; TAKAGI, K.; HAYASHI, N.; ITABASHI, T.; TOYODA, Y.; SANO, W.; NITTA, H.; HIRANO, J.; NAKAJIMA, N.; ITO, I. Effects of total parenteral nutrition on endotoxin translocation and extent of the stress response in burned rats. *Nutrition*, v. 15, p. 570-575, 1999.
- SUKHOTNIK, I.; MOGILNER, J.; KRAUSZ, M.M.; LURIE, M.; HIRSH, M.; CORAN, A.G.; SHILONI, E. Oral arginine reduces gut mucosal injury caused by lipopolysaccharide in rat. *Journal of Surgical Research*, v. 122, p. 256-262, 2004.
- SWANK, G.M.; DEITCH, E.A. Role of the gut in multiple organ failure: bacterial translocation and permeability changes. *World Journal of Surgery*, v. 20, p. 411-417, 1996.
- TANAKA H.; MIYAZAKI S.; SUMIYAMA Y.; KAKIUCHI, T. Role of macrophages in a mouse of postoperative MRSA enteritis. *Journal of Surgical Research*, v. 118, p. 144-121, 2004.
- TSAI, H.J.; SHANG, H.F.; YEH, C.L.; YEH, S.L. Effects of arginine supplementation on antioxidant activity and macrophages response in burned mice. *Burns*, v. 28, p. 258-263, 2002.
- ULBRICH, A.G. *Estudo de um caso de deficiência do componente C3 do sistema complemento humano*. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, 1999. 113 p. (Dissertação, Mestrado em Imunologia).
- ULUSOY, H.; USUL, H.; AYDIN, S.; KAKLIKKAYA, N.; COBANOGLU, U.; REIS, ABDULKADIR; AKYOL, A.; OZEN, I. Effects of immunonutrition on intestinal

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

UTHAISANGSOOK, S.; DAY, N.K.; BAHNA, S.L.; GOOD, R.A.; HARAGUCHI, S. Innate immunity and its role against infections. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology*, v. 88, p. 253-264, 2002.

WACHTLER, P.; HILGER, R.A.; KONIG, W.; BAURE, K.H.; KEMEN, M.; KOLLER, M.; Influence of a pre-operative enteral supplement on functional activities of peripheral leukocytes from patients with major surgery. *Clinical Nutrition*, v. 14, p. 275-282, 1995.

WANG, J.Y.; SONG, W.L.; ZHANG, L.H. Effect of arginine on gastrointestinal immunity during total parenteral nutrition. *Clinical Nutrition*, v. 15, p. 115-118, 1996.

WANG, Y.Y.; SHANG, H.F.; LAI, Y.N.; YEH, S.L. Arginine supplementation enhances peritoneal macrophage phagocytic activity in rats with gut-derived sepsis. *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition*, v. 27, p. 235-240, 2003.

WASA, M.; SOH, H.; SHIMIZU, Y.; FUKUZAWA, M. Glutamine stimulates amino acid transport during ischemia-reperfusion in human intestinal epithelial cell. *Journal of Surgical Research*, v. 123, p. 75-81, 2005.

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

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

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

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

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

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

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

9 ANEXOS

ANEXO I – COMPOSIÇÕES CENTESIMAIS

Tabela 9: Composição centesimal da fórmula enteral Impact®

Valor calórico	410cal
Carboidratos	54g
Proteínas	23g
Gorduras totais	11g
Gorduras Saturadas	6g
Gorduras Monoinsaturadas	2,5g
Gorduras Poliinsaturadas	2,5g
Ácidos Graxos -3	1,3g
Colesterol	25mg
Fibra Alimentar	4g
Cálcio	324mg
Ferro	5mg
Sódio	430mg
Potássio	543mg
Cloreto	486mg
Fósforo	292mg
Magnésio	93mg
Zinco	6,1mg
Manganês	0,81mg
Cobre	0,69mg
Molibdênio	65mcg
Iodo	61mcg
Cromo	41mcg
Selênio	19mcg
Flúor	0,8mg
Vitamina A	410mcg RE
Vitamina D	2,7mcg
Vitamina E	12,2mg α -TE
Vitamina C	27mg
Niacina	6,5mg
Ácido Pantotênico	3,2mg
Vitamina B6	0,61mg
Vitamina B2 (Riboflavina)	0,69mg
Vitamina B1(Tiamina)	0,49mg
Biotina	28mcg
Ácido Fólico	81mcg
Vitamina K	27mcg
Vitamina B12	1,6mcg
Colina	108mg
Arginina	5,1g
RNA	0,53g

Tabela 10: Composição centesimal da ração para roedores Labina®

Valor Calórico	275cal
Proteína Bruta	23g
Extrato etéreo (Lipídeos)	4g
Fibra	5g
Cálcio	1500mg
Fósforo	850mg
Cinzas	10g
Arginina	1,5g
Isoleucina	1000mg
Lisina	1400mg
Metionina	400mg
Cistina + metionina	800mg
Treonina	900mg
Triptofano	300mg
Vitamina A	750mcg RE
Vitamina D3	10mcg
Vitamina E	8mg α -TE
Menadiona	0,64mg
Colina	280mg
Niacina	22mg
Pantotenato de cálcio	9mg
Vitamina B2 (Riboflavina)	1,2mg
Vitamina B12	4mcg
Biotina	0,02mg
Ácido fólico	1,3mg
Piridoxina	1,1mg
Vitamina B1 (Tiamina)	1,1mg
Magnésio	0,35mg
Sódio	200mg
Ferro	18mg
Cobalto	0,2mg
Cobre	3mg
Iodo	100mcg
Manganês	11mg
Zinco	11mg
Selênio	20mcg

Tabela 11: Composição centesimal de gelatina em pó incolor

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

Tabela 12: Composição centesimal de amido de milho

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

ANEXO II - SOLUÇÕES UTILIZADAS

Azul de Turkey

- 2% de ácido acético glacial
- 0,02% (v/v) de azul de metileno a 1%

SSBH (solução salina balanceada de Hanks; pH= 7,2)

- Cloreto de potássio a 5,37mM
- Cloreto de sódio a 137mM
- Cloreto de cálcio a 1,26mM
- Fosfato de sódio dibásico a 0,34mM
- Fosfato de potássio monobásico a 0,44mM
- Dextrose a 5,55mM
- Sulfato de magnésio a 0,81mM
- 0,001% de vermelho de fenol (p/v) em água milli-Q nhg