

José Luiz de Andrade Neto

Influência da suplementação nutricional com glutamina na translocação bacteriana, endotoxemia, liberação de fator de necrose tumoral alfa, em ratos Wistar submetidos à indução inflamatória sistêmica pelo zymosan

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Interna, do Setor de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do grau acadêmico de Doutor.

Coordenador : Dr. José Gastão Rocha de Carvalho
Orientador : Dr. João Carlos Domingues Repka

Curitiba

2003

de Andrade Neto, José Luiz

Influência da suplementação nutricional com glutamina na translocação bacteriana, endotoxemia, liberação de fator de necrose tumoral alfa, em ratos Wistar submetidos à indução inflamatória sistêmica pelo zymosan.
Curitiba, 2003.
f.83

Orientador : João Carlos Domingues Repka

Tese (Doutorado) – Setor de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná.

1. Glutamina
2. Translocação Bacteriana
3. Fator de Necrose Tumoral Alfa
4. Endotoxina
5. Sistema Complemento
6. Reação Inflamatória Sistêmica
7. Zymosan

Para

- Rosegil*
- Luiz Filipe*
- Luiz Guilherme*
- Letícia*

Agradecimentos

Consigno aqui, cumprindo um dever gratíssimo, os agradecimentos àqueles que como mestres, amigos ou colaboradores, contribuíram para a minha formação médica ou me estimularam no desenvolvimento desta tese.

Aos professores dos cursos de Medicina da Universidade Federal do Paraná, da Pontifícia Universidade Católica do Paraná e da Faculdade Evangélica de Medicina do Paraná, elenco ao qual tenho a honra de pertencer, pelo exemplo de dedicação ao ensino da ciência médica. Em especial aos médicos:

- *Acir Rachid*
- *Ayrton A. Russo*
- *Albano Manoel Chaves Luiz (in memorian)*
- *Alberto Accioly Veiga*
- *Álvaro Vieira Moura*
- *Ângelo Luiz Tesser*
- *Cesar Alfredo Pusch Kubiak*
- *Divonei Viana de Oliveira*
- *Heber de Moraes e Silva*
- *Ivan Jose Paredes Bartolomei*
- *Jarbas Accioly Rodrigues da Costa*
- *João Alceu Tilton*
- *Lisegle Cengia*
- *Luciane Alves Botelho*
- *Luiz de Lacerda Filho*
- *Luiz Salim Emed*
- *Lysandro Santos Lima (in memorian)*
- *Maria Cristina Vilatore Assef*
- *Miguel Ibraim Abboud Hanna Sobrinho*
- *Nelson Szpeiter*
- *Niazy Ramos Filho*
- *Roberto Pirajá M. de Araújo*
- *Rogério Andrade Mulinari*
- *Rosana Camargo*
- *Rosana Hermínia Scola*
- *Semi Haurani*
- *Sérgio Luiz Bizinelli*

Ao coordenador do programa pós-graduação em Medicina Interna da Universidade Federal do Paraná, professor José Gastão Rocha de Carvalho pelo importante exemplo de educador, pelo estímulo constante durante a fase de preparação do trabalho, pela compreensão nos momentos de dificuldades, pelo esforço em tornar nossa escola cada vez melhor.

Ao meu orientador professor João Carlos Domingues Repka a minha admiração e respeito pelo exemplo de cientista e professor nos árduos caminhos da ciência médica, pelos ensinamentos, pela paciência, pela humildade própria da sua genialidade, pela dedicação incansável na orientação deste estudo e sobretudo pela atitude sempre fraterna.

Aos professores Elia ne Mara Cesário Pereira Maluf, Jorge Fouto Mathias, Maria das Graças da Mota Silveira Sasaki, participantes da banca de pré-qualificação desta tese, pelas suas preciosas e oportunas correções.

Aos acadêmicos do curso de Medicina Rodrigo Theodoro Belila e Michel Wentz Antunes, da Faculdade Evangélica de Medicina do Paraná, integrantes do programa de iniciação científica da disciplina de Imunologia, sob a orientação do professor João Carlos Domingues Repka, pelo auxílio na fase experimental.

À senhorita Cristianlee Gonçalves, secretária da Coordenação de Ensino e Pesquisa do Hospital Angelina Caron pelo trabalho de digitação e formatação.

À professora Áurea Costin da biblioteca central do setor de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná, pela revisão da formatação e normatização, pelas suas preciosas sugestões e revisão das referências utilizadas.

À professora Eliana Maria Vidal Stabile pela revisão do idioma inglês.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	vii
LISTA DE TABELAS	viii
LISTA DE FIGURAS	ix
RESUMO.....	x
ABSTRACT.....	xi
1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVOS.....	5
3 REVISÃO DA LITERATURA.....	6
3.1 A TRANSLOCAÇÃO BACTERIANA	6
3.2 AS ENDOTOXINAS BACTERIANAS	9
3.3 A SUPLEMENTAÇÃO COM GLUTAMINA NA TRANSLOCAÇÃO BACTERIANA	13
3.4 SÉPSIS, FALÊNCIA DE MÚLTIPLOS ÓRGÃOS E TRANSLOCAÇÃO BACTERIANA	19
3.5 SÉPSIS – UM TEMA AINDA EM DISCUSSÃO	20
4 MATERIAL E MÉTODO.....	23
4.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	23
4.2 ANIMAIS UTILIZADOS	23
4.3 INDUÇÃO DE REAÇÃO INFLAMATÓRIA SISTÊMICA EM RATOS PELO ZYMOZAN	24
4.3.1 Preparação da solução de zymosan.....	24
4.3.2 Inoculação dos animais	24
4.4 SUPLEMENTAÇÃO NUTRICIONAL COM GLUTAMINA.....	25
4.5 COLETA DE AMOSTRAS	25
4.5.1 Coleta de sangue	25
4.5.2 Coleta de vísceras.....	26
4.6 AVALIAÇÃO DA TRANSLOCAÇÃO BACTERIANA	27
4.6.1 Preparação das amostras	27
4.6.2 Pesquisa de <i>Escherichia coli</i>	27
4.6.3 Pesquisa de <i>Enterococcus faecalis</i>	27
4.7 AVALIAÇÃO DA PERMEABILIDADE VASCULAR INTESTINAL	28
4.7.1 Preparação da solução de azul de Evans	28
4.7.2 Inoculação	28
4.7.3 Calibração do método.....	29

4.7.4	Obtenção de amostras para dosagem de azul de Evans	30
4.7.5	Extração e dosagem de azul de Evans	30
4.8	DOSAGEM DE ENDOTOXINAS	30
4.8.1	Materiais	31
4.8.2	Método.....	31
4.8.2.1	Preparação de materiais despirogenizados	31
4.8.2.2	Preparação do Reagente LAL	31
4.8.2.3	Preparação da endotoxina padrão.....	31
4.8.2.4	Análise qualitativa de endotoxina nas amostras de plasma de ratos	33
4.8.2.5	Análise quantitativa de endotoxina nas amostras de plasma de ratos... ..	33
4.9	DOSAGEM IMUNOENZIMÁTICA DOS NÍVEIS SÉRICOS DO FATOR DE NECROSE TUMORAL ALFA (TNF α)	33
4.9.1	Materiais	34
4.9.2	Método.....	34
4.10	DOSAGEM DE C3	35
4.10.1	Materiais utilizados.....	38
4.10.2	Método.....	38
4.10.2.1	Calibração do método.....	38
4.10.2.2	Dosagem de C3 em amostras de soros dos ratos	39
4.10.3	Interpretação dos resultados.....	40
4.11	AVALIAÇÕES ESTATÍSTICAS.....	40
5	 RESULTADOS	41
5.1	AVALIAÇÃO DA TRANSLOCAÇÃO BACTERIANA.....	41
5.2	DOSAGEM DE ENDOTOXINAS.....	47
5.3	DOSAGEM DE TNF α	48
5.4	DOSAGEM DE C3	50
5.5	AVALIAÇÃO DA PERMEABILIDADE VASCULAR	51
6	 DISCUSSÃO	53
6.1	O CONSUMO DE C3	54
6.2	A PERMEABILIDADE VASCULAR INTESTINAL.....	56
6.3	A ENDOTOXEMIA	58
6.4	A LIBERAÇÃO DE TNF α	62
6.5	GLUTAMINA E TRANSLOCAÇÃO BACTERIANA	64
7	 CONCLUSÕES	74
	 REFERÊNCIAS	75

LISTA DE ABREVIATURAS

μl	–	Microlitros
(r)	–	Coefficiente de Correlação
C3	–	Fragmento 3 do sistema complemento
C3a	–	Fragmento 3 ativado do sistema complemento
C5a	–	Fragmento 5 ativado do sistema complemento
CD	–	<i>Cluster of differentiation</i> (Clone de Diferenciação)
CIVD	–	Coagulação intravascular disseminada
COBEA	–	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
ELISA	–	<i>Enzyme Linked Immunesorbent Assay</i> (Teste Imunoenzimático)
FMO	–	Falência de múltiplos órgãos
GLN	–	Glutamina
IL	–	Interleucina
LAL	–	<i>Lymulus Amebocyte Lisate</i> (Lisado de Amébócitos de <i>Lymulus</i>)
LNM	–	Linfonodos Mesentéricos
LPS	–	Lipopolissacarídeo (endotoxina)
nm	–	Nanômetros
pg/ml	–	Picogramas por mililitro
pH	–	Potencial hidrogeniônico
PMN	–	Polimorfonucleares
RNA	–	Ácido ribonucléico
SDMO	–	Síndrome de disfunção de múltiplos órgãos
TB	–	Translocação Bacteriana
TNF	–	Fator de Necrose Tumoral
TNF α	–	Fator de Necrose Tumoral Alfa
UE/ml	–	Unidades endotóxicas por mililitro
UFC/ml	–	Unidades formadoras de colônias por mililitro
SRE	–	Sistema retículo-endotelial

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 -	DEMONSTRATIVO DO DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E DA ORGANIZAÇÃO DOS GRUPOS DE ESTUDO	23
TABELA 2 -	RELAÇÃO ENTRE CONCENTRAÇÃO DO AZUL DE EVANS DA SOLUÇÃO PADRÃO E DENSIDADE ÓPTICA A 620 nm FRENTE À SOLUÇÃO FISIOLÓGICA	29
TABELA 3 -	DILUIÇÕES DA ENDOTOXINA PADRÃO	32
TABELA 4 -	CALIBRAÇÃO DA SOLUÇÃO PADRÃO DE TNF α	35
TABELA 5 -	CALIBRAÇÃO DO PADRÃO DE C3	37
TABELA 6 -	PORCENTAGEM DE OCORRÊNCIA DE TB, CONFORME GRUPOS (ZYMOBAN NAS DOSES DE 1g E 2g OU SSI) E TRATAMENTOS COM GLUTAMINA OU SOLUÇÃO SALINA ISOTÔNICA	41
TABELA 7 -	AVALIAÇÕES ESTATÍSTICAS DAS PORCENTAGENS DE TRANSLOCAÇÃO BACTERIANA CONFORME OS GRUPOS ESTUDADOS	42
TABELA 8 -	AVALIAÇÕES ESTATÍSTICAS PELO MÉTODO DE ANOVA DAS PORCENTAGENS DE TRANSLOCAÇÃO BACTERIANA PARA O FÍGADO	44
TABELA 9 -	AVALIAÇÕES ESTATÍSTICAS PELO MÉTODO DE ANOVA DAS PORCENTAGENS DE TRANSLOCAÇÃO BACTERIANA PARA O SANGUE	45
TABELA 10 -	AVALIAÇÕES ESTATÍSTICAS PELO MÉTODO DE ANOVA DAS PORCENTAGENS DE TRANSLOCAÇÃO BACTERIANA PARA O BAÇO	
TABELA 11 -	AVALIAÇÕES ESTATÍSTICAS PELO MÉTODO DE ANOVA DAS DOSAGENS DE ENDOTOXINA	
TABELA 12 -	AVALIAÇÕES ESTATÍSTICAS PELO MÉTODO DE ANOVA DAS DOSAGENS DE TNF α	49
TABELA 13 -	MÉDIAS E DESVIOS-PADRÕES DOS RESULTADOS (mg/dl) DA AVALIAÇÃO DE C3	50
TABELA 14 -	AVALIAÇÕES ESTATÍSTICAS PELOS TESTES DE ANOVA	50
TABELA 15 -	MÉDIAS E DESVIOS-PADRÕES DOS RESULTADOS (μ g de azul de Evans/mg de amostra intestinal) DA AVALIAÇÃO DA PERMEABILIDADE VASCULAR INTESTINAL	52
TABELA 16 -	AVALIAÇÕES ESTATÍSTICAS PERMEABILIDADE VASCULAR INTESTINAL, OBTIDAS PELO TESTE DE ANOVA	52

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - ESTRUTURA DA PAREDE CELULAR DE BACTÉRIAS GRAM-NEGATIVAS	10
FIGURA 2 - DEMONSTRATIVO DOS HALOS DE PRECIPITAÇÃO C3-ANTI-C3 (A) ESQUEMA, (B) COMPLEXOS ANTÍGENO-ANTICORPOS CORADOS PELO AZUL DE COMASSIE	36
GRÁFICO 1 - CURVA DE CALIBRAÇÃO AZUL DE EVANS A 620nm.....	29
GRÁFICO 2 - REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DAS DILUIÇÕES DA ENDOTOXINA PADRÃO	32
GRÁFICO 3 - REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DA CALIBRAÇÃO DA SOLUÇÃO PADRÃO DE TNF α	35
GRÁFICO 4 - REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DA CALIBRAÇÃO DO PADRÃO DE C3 E DOS DIÂMETROS DOS HALOS DE LEITURA.....	37
GRÁFICO 5 - DEMONSTRATIVO DAS PORCENTAGENS DE ISOLAMENTO SIMULTÂNEO DE <i>Escherichia coli</i> e <i>Enterococcus faecalis</i> EM AMOSTRAS DE LNM, FÍGADO, SANGUE, BAÇO E INTESTINOS, CONFORME SUB-GRUPOS ESTUDADOS	43
GRÁFICO 6 - DEMONSTRATIVO DAS PORCENTAGENS DE ISOLAMENTO SIMULTÂNEO DE <i>Escherichia coli</i> e <i>Enterococcus faecalis</i> EM AMOSTRAS DE FÍGADO.....	44
GRÁFICO 7 - DEMONSTRATIVO DAS PORCENTAGENS DE ISOLAMENTO SIMULTÂNEO DE <i>Escherichia coli</i> e <i>Enterococcus faecalis</i> EM AMOSTRAS DE SANGUE	45
GRÁFICO 8 - DEMONSTRATIVO DAS PORCENTAGENS DE ISOLAMENTO SIMULTÂNEO DE <i>Escherichia coli</i> e <i>Enterococcus faecalis</i> EM AMOSTRAS DE BAÇO	46
GRÁFICO 9 - GRÁFICO DEMONSTRATIVO DAS MÉDIAS E DESVIOS-PADRÃO DAS DOSAGENS DE ENDOTOXINAS CONFORME OS SUB-GRUPOS ESTUDADOS.....	47
GRÁFICO 10 - GRÁFICO DEMONSTRATIVO DAS MÉDIAS E DESVIOS PADRÃO DAS DOSAGENS DE TNF α CONFORME OS SUB-GRUPOS ESTUDADOS	48
GRÁFICO 11 - GRÁFICO DEMONSTRATIVO DAS MÉDIAS E DESVIOS-PADRÃO DAS DOSAGENS DE C3 CONFORME OS SUB-GRUPOS ESTUDADOS.....	51
GRÁFICO 12 - GRÁFICO DEMONSTRATIVO DO COMPORTAMENTO DA PERMEABILIDADE VASCULAR INTESTINAL REPRESENTADA PELAS MÉDIAS E DESVIOS-PADRÃO DAS DOSAGENS DE AZUL DE EVANS EM AMOSTRAS INTESTINAIS CONFORME OS SUB-GRUPOS ESTUDADOS.....	52

RESUMO

Introdução: A sépsis associada com falência seqüencial de múltiplos órgãos e sistemas é uma das principais causas de morte de pacientes cirúrgicos ou sob atendimento intensivo. A letalidade nestas condições atinge cerca de 60%, apesar das excelentes condições de tratamento nas unidades de terapia intensivas e tratamento antibiótico. A translocação bacteriana (TB) é verificada sempre nestas situações, evidenciando que as enterobactérias, portadoras de LPS em sua estrutura, são as bactérias mais comumente implicadas. Eventos biológicos associados como ativação do sistema complemento, a endotoxemia e a liberação de $TNF\alpha$ têm repercussões sistêmicas importantes. Objetivos: Verificar se a suplementação com glutamina interfere na ocorrência de translocação bacteriana em vigência de diferentes doses de zymosan. Verificar se a suplementação com glutamina interfere na ocorrência de endotoxemia e liberação de fator de necrose tumoral alfa em vigência de diferentes doses de zymosan. Material e Método: Foram utilizados 60 ratos albinos machos, da linhagem Wistar, com pesos variando entre 282 a 312g, separados em dois grupos: inoculados com zymosan (ZYM, n=40) e inoculados com solução salina isotônica (SSI, n=20). Foram organizados sub-grupos de 10 animais, sendo o grupo ZYM separado conforme a dose de zymosan a ser inoculada (1 ou 2mg/100g) e conforme a suplementação ou não com glutamina (GLN), constituindo assim os seguintes sub-grupos: ZYM 1mg GLN, ZYM 1mg SSI, ZYM 2mg GLN e ZYM 2mg SSI. O grupo SSI (controle) foi subdividido em dois sub-grupos: SSI e SSI GLN. Após a inoculação do zymosan por via intra-peritoneal, os animais foram tratados com glutamina (sub-grupos GLN), com 0,1g/dia VO e observados por cinco dias, quando coletaram-se amostras de sangue e após a eutanásia, fragmentos de rins, baço, linfonodos mesentéricos (LNM), fígado e segmento intestinal. Foram procedidos estudos de dosagem de C3 por imunodifusão radial simples, dosagem de endotoxina pelo método de LAL, dosagem de $TNF\alpha$ por método de ELISA e pesquisa de *Escherichia coli* e *Enterococcus faecalis* para avaliação da translocação bacteriana. Os resultados foram avaliados estatisticamente pelo teste de ANOVA, sendo estabelecido $p<0,05$ como limite de significância para a rejeição da hipótese nula. Resultados: observaram-se níveis diferentes de TB, indicados pela porcentagem de órgãos infectados por *E.coli* e *Enterococcus faecalis* em função do estímulo inflamatório induzido (1mg ou 2mg/100g). Os maiores níveis de TB ($95\pm 8,66\%$) foram detectados nos ratos que receberam 2mg/100g de zymosan, que apresentaram também os maiores níveis séricos de endotoxina ($0,2656 \pm 0,08235$ UE/ml), $TNF\alpha$ ($0,76246\pm 113,98$ pg/ml), maior aumento de permeabilidade vascular ($123,15\pm 21,29$ μ g de azul de Evans/mg de tecido intestinal) e menores níveis séricos de C3. Para os ratos induzidos com 100mg/100g de ZYM foram significantes as diminuições dos níveis de TB em fígado e sangue ($p<0,05$) e para os ratos induzidos com 200mg/100g de ZYM foram significantes as diminuições dos níveis de TB no sangue ($p<0,05$). Conclusões: A suplementação nutricional com glutamina não impediu, mas minimizou a ocorrência de translocação bacteriana em grupos de ratos Wistar inoculados com 1mg/100g e de zymosan em fígado e sangue. Na dose de 2mg/100g de zymosan somente houve diminuição da translocação bacteriana para o sangue. A suplementação nutricional com glutamina diminuiu, mas não impediu a endotoxemia e liberação de fator de necrose tumoral alfa em vigência das doses de 1mg/100g e 2mg/100g de zymosan em ratos Wistar.

ABSTRACT

Introduction: Sepsis associated with multiple system organ failure is one of the major causes of death of surgical and intensive care unit patients. Such mortality reaches about 60%, despite the excellent treatment conditions provided in the intensive care units and antibiotic treatment. Bacterial translocation (BT) is always present in those situations, evidencing that enterobacteria carrying LPS in their structure are the most commonly involved. Related biological events, such as complement system activation, endotoxemia and TNF α release have significant systemic impact.

Objectives: To determine whether glutamine supplementation interferes in the occurrence of bacterial translocation in the presence of different doses of zymosan. To determine whether glutamine supplementation interferes in the occurrence of endotoxemia and tumor necrosis factor alpha release in the presence of different doses of zymosan.

Material and Methods: Sixteen male albino Wistar rats, weighting between 282-312g, separated into two groups, were used: inoculated with zymosan (ZYM, n=40) and inoculated with isotonic saline solution (SSI, n=20). The ZYM group was organized in sub-groups of 10 animals each, according to the dose of zymosan to be inoculated (1 or 2 mg/100g) and with or without glutamine (GLN) supplementation, namely: ZYM 1g GLN, ZYM 1g SSI, ZYM 2g GLN, and ZYM 2g SSI. The SSI (control) group was subdivided in two sub-groups: SSI and SSI GLN. After the intraperitoneal inoculation of zymosan, the animals were treated with glutamine (sub-groups GLN) at 0.1g/day PO and observed for five days, when blood samples were collected. Following the sacrifice, kidney, spleen, mesenteric lymphnodes (MLN), liver and gut segment specimens were collected. The following tests were performed: *single radial immunodiffusion* for C3, LAL for endotoxin, ELISA for TNF α , and *Escherichia coli* and *Enterococcus faecalis* research to evaluate bacterial translocation. The results were submitted to the ANOVA test, having $p < 0,05$ as the significance limit for the null hypothesis.

Results: Different levels of BT were found, indicated by the percentage of organs infected by *E. coli* and *Enterococcus faecalis* as a result of the induced inflammatory stimulus (1mg or 2mg/100g). The highest BT levels ($95 \pm 8,66\%$) were detected in rats receiving 2mg/100g of zymosan, which also had the highest serum levels of endotoxin ($0,2656 \pm 0,08235$ UE/ml), TNF α ($0,76246 \pm 113,98$ pg/ml), the greatest increase in vascular permeability ($123,15 \pm 21,29$ Evans blue/mg of gut tissue) and lowest C3 serum levels. The rats induced with 100mg/100g of ZYM showed significant decreases in the BT levels in the liver and blood ($p < 0,05$), and the rats induced with 200mg/100g of ZYM showed significant decrease in BT levels in the blood ($p < 0,05$).

Conclusions: Nutritional supplementation with glutamine did not prevent, but minimized the occurrence of bacterial translocation in the liver and blood in Wistar rats inoculated with 1mg/100g of zymosan. At 2mg/100g of zymosan, the BT level decrease was only found in blood. Nutritional supplementation with glutamine decreased, but did not prevent endotoxemia and the release of tumoral necrosis factor alpha in the presence of 1mg/100g and 2mg/100g.

Para a introdução deste tema é oportuna uma breve resenha histórica e o reconhecimento de estacado daqueles que foram os precursores, nos últimos anos, dos grandes avanços obtidos no conhecimento dos processos fisiopatológicos subjacentes aos quadros de reação inflamatória sistêmica e de disfunção de múltiplos órgãos.

Em 1950, SCHWEINBURG, SELIGMAN e FINE, demonstraram pioneiramente em experimentos animais, que zonas intestinais inflamadas mediante um fator irritante estéril, eram colonizadas por bactérias radiomarcadas administradas por via oral, o fato foi apenas citado em sua publicação, não havendo uma discussão consistente para amparar o fato biológico observado e o autor não mais investiu nesta área.

Na década de 70, já com um arsenal terapêutico e instrumentação mais adequada, TILNEY e colaboradores (1973), descreveram pela primeira vez, uma síndrome clínica caracterizada por falha progressiva e seqüencial de múltiplos órgãos, que ocorria no período pós-operatório de pacientes portadores de aneurisma abdominal roto. Estes quadros geralmente evoluíam com falha circulatória, seguida precocemente de falha ventilatória e mais tardiamente por falhas hepáticas, gastrointestinais e metabólicas.

Dois anos mais tarde (1975), BAUE ao analisar autópsias de pacientes submetidos a períodos de reanimação prolongada, em unidades de terapia intensiva, estabeleceu a existência de elementos anátomo-patológicos comuns, naqueles que cursaram com falha de múltiplos órgãos. Propôs que estas alterações se encontrariam relacionadas umas com outras, mas seu mecanismo era ainda desconhecido, e denominou estes quadros de "Síndrome dos anos 70".

Nos anos 80, com a Imunologia já não mais ancorada somente nas vacinas e nas grandes epidemias, mas definindo os mediadores imunológicos da inflamação (citocinas e sistema complemento), foi que GORIS e colaboradores (1986), estabeleceram a existência de quadros de disfunção de múltiplos órgãos em pacientes cuja patologia inicial era tanto de origem infecciosa (sépsis intra-abdominal), como não infecciosa (politraumatizados). A similaridade na incidência, severidade e seqüência de aparecimento de falha em múltiplos órgãos em ambos os grupos, considerando-se a diferença na presença de infecção associada, os fez concluir que a infecção não era uma condição indispensável para o

desenvolvimento de disfunção de múltiplos órgãos. Propuseram então a ocorrência de ativação massiva de mediadores da inflamação como conseqüência do dano tissular. Um ano mais tarde, o mesmo autor foi capaz de induzir quadros de "sépsis"¹ e disfunção de múltiplos órgãos em animais de experimentação, mediante a injeção de uma substância química ativadora do sistema Complemento e subseqüentemente, de toda a cascata inflamatória, na ausência de um foco infeccioso reconhecido, o zymosan.

Posteriormente foi proposto que nestes casos de disfunção de múltiplos órgãos sem foco infeccioso aparente, o trato digestivo, que apesar de não demonstrar alterações macroscópicas significantes, apresentava uma série de modificações como colonização de zonas habitualmente estéreis com bactérias multirresistentes e perda de função da barreira da mucosa intestinal, permitindo assim, que bactérias ou endotoxinas bacterianas, os lipopolissacarídeos passassem aos linfonodos mesentéricos e circulação portal, resultando em infecção invasiva pelo mecanismo denominado de "translocação bacteriana", sendo assim, responsáveis numa "segunda fase", pela manutenção do estado séptico e disfunção de múltiplos órgãos.

Postulou-se então que estas alterações intestinais, induziam as células de Küpffer, à liberação de numerosos mediadores imunologicamente reativos, em resposta à estimulação endotóxica². Assim sendo, definiram que o tubo digestivo e o fígado determinavam uma segunda agressão no paciente criticamente doente, respectivamente, aquele por ser reservatório de bactérias e este, por funcionar como uma "usina" de mediadores responsáveis pela disfunção de múltiplos órgãos.

Baseando-se nestas observações, MOCHIZUKI e colaboradores em 1984, postularam que o aumento da translocação bacteriana³, incrementa a resposta metabólica dos pacientes sépticos, induzindo o estado séptico na ausência de um foco infeccioso definido e BORDER e colaboradores em 1987 confirmaram a predisposição ou contribuição deste incremento ao desenvolvimento da falha de

¹ KNOBEL (1998), define sépsis como a infecção associada a uma síndrome de resposta inflamatória sistêmica, não havendo necessariamente hemocultura positiva. A síndrome da resposta inflamatória sistêmica é caracterizada por três sinais obrigatórios: taquipnéia, taquicardia e alterações de temperatura. Este autor conceitua choque séptico como "sépsis severa associada à hipotensão arterial".

² A liberação de citoquinas pelas células de Küpffer estavam, a partir de então, implicadas na gênese da disfunção de múltiplos órgãos, resultando na ativação da resposta séptica.

³ Considera-se que haja normalmente translocação bacteriana, porém de forma controlada em indivíduos normais.

múltiplos órgãos o que também foi confirmado posteriormente por outros autores (CARRICO e colaboradores, 1986; OFFENBARTL e BENGMARK, 1990).

TRACEY e colaboradores em 1986 demonstraram inequivocamente que o doente não é um sujeito passivo frente à translocação bacteriana, sofrendo as conseqüências das bactérias translocadas e sim, um ativo participante no desenvolvimento e progressão do "choque" e da disfunção de múltiplos órgãos. Este grupo de pesquisadores demonstraram experimentalmente que uma proteína produzida por macrófagos e liberada por estímulo endotóxico, anteriormente associada somente à caquexia cancerosa, se injetada na ausência de infecção era suficiente para provocar "choque" e disfunção de múltiplos órgãos, essa proteína era o fator de necrose tumoral alfa (TNF α).

A partir de 1986, reconheceu-se que a reversão do insulto orgânico inicial, imprescindível para o controle da translocação bacteriana, não é suficiente para reverter a disfunção de múltiplos órgãos e morte. Foi assim que a atenção dos pesquisadores voltou-se para a regulação e modulação das respostas imunológicas de hospedeiro, desencadeando a cascata de eventos inflamatórios, com suas respostas vasculares características, como citado por WITTMANN em 1993, "a inflamação é o braço armado do sistema imunológico".

Neste contexto de controle da translocação bacteriana, emergiu a glutamina (GLN), classificada com um aminoácido não-essencial, exceto em situações como trauma e infecções graves (O'DWYER e colaboradores, 1989; NEWSHOLME e EPAARRY-BILINGS, 1990) com aplicações na terapia nutricional devido às suas múltiplas funções, destacando-se sua influência no trofismo da barreira intestinal e função imune do intestino (SMITH e WILMORE, 1990).

A sépsis associada com falência seqüencial de múltiplos órgãos e sistemas é uma das principais causas de morte de pacientes cirúrgicos e sob atendimento intensivo. A letalidade nestas condições atinge cerca de 60%, apesar das excelentes condições de tratamento nas unidades de terapia intensivas e tratamento antibiótico. A TB é verificada sempre nestas situações, e videnciando que as enterobactérias, portadoras de LPS em sua estrutura, são as bactérias mais comumente implicadas (GORIS e colaboradores, 1991).

A glutamina é um aminoácido que aumenta a taxa de regeneração da mucosa intestinal "*in vivo*" e "*in vitro*". Muitos estudos correlacionam essa droga à

diminuição da translocação bacteriana e da endotoxemia, mas não existe relato da utilização dessa substância associada ao tratamento ou prevenção destas ocorrências quando induzidas por reação inflamatória sistêmica.

1. Verificar se a suplementação com glutamina interfere na ocorrência de translocação bacteriana em vigência de diferentes doses de zymosan;

2. Verificar se a suplementação com glutamina interfere na ocorrência de endotoxemia e liberação de fator de necrose tumoral alfa em vigência de diferentes doses de zymosan.

3 Revisão da Literatura

3.1 A TRANSLOCAÇÃO BACTERIANA

Classicamente aceita-se que a mucosa do trato digestivo, além do papel secretório e absorvivo, constitui também barreira que isola o lume intestinal, com sua microflora, dos linfáticos mesentéricos e das vênulas tributárias do sistema porta. Não ocorre translocação bacteriana maciça em vigência de barreira epitelial intacta, defesas imunológicas competentes e microflora normal no trato gastrintestinal, que em conjunto evitam a superpopulação de patógenos, e especialmente pelos bacilos entéricos, permitindo apenas um pequeno índice de translocação de microorganismos intestinais e de endotoxinas é um processo normal, até benéfico para estimular o sistema imunológico. E se essa barreira fosse vencida?

A primeira referência específica sobre este tema, provavelmente seja a publicação de JACOB, WEIDEL e GORDON em 1954, que relataram os efeitos da administração prévia de antibióticos não absorvíveis no aumento da sobrevivência de cães submetidos a choque hemorrágico experimental. Próximo a esta época, em 1957, LILLEHEI e colaboradores idealizaram interessante modelo experimental em cães sob perfusão intestinal com sangue doado por outros animais, levados a choque por sangria e obtinham importante redução na taxa de letalidade, o que não se conseguia quando perfundiam-se seletivamente, ao invés dos intestinos, o fígado ou o cérebro do animal. Concluíram que o principal fator determinante da morte, no choque hipovolêmico, era a isquemia intestinal.

Seguiram-se trabalhos que não aderiram aos conceitos que começavam a surgir. Entre estes estudos, McNULTY e LINARES em 1960, referiram letalidade similar em ratos que recebiam ou não antibioticoterapia, antes de se instalar choque hemorrágico experimental que era imediatamente revertido. Também NAGLERAL e ZWEIFACH em 1961, não conseguiram comprovar atividade endotóxica em coelhos submetidos à sangria extensa. Estes estudos foram controversos, uma vez que a hipovolemia induzida nos animais deveria propiciar a TB do trato intestinal e a antibioticoterapia deveria diminuir ou inibir este fenômeno.

As observações mais superficiais das décadas de 50 e 60 estabeleceram fundamentos para os trabalhos contemporâneos, sofisticados, que procuram detalhar intimamente o processo de translocação bacteriana.

DEITCH, MORISON e BERG em 1990, estudando a permeabilidade da mucosa intestinal a proteína marcada, em ratos, submetidos ou não à descontaminação seletiva com penicilina e estreptomicina, observaram que após duas horas de ressuscitação do choque hipovolêmico, havia translocação bacteriana e aumento da permeabilidade intestinal à proteína marcada, sugerindo que os mesmos fatores que favorecem a translocação também alteravam a permeabilidade da mucosa, talvez rompendo as junções firmes que existem entre as células epiteliais, ficando clara nestas condições experimentais, a correlação entre a passagem da proteína marcada e a endotoxina pelas túnicas intestinais, ou seja, o processo de translocação pode ser acompanhado de passagem de endotoxinas, agravando a situação infecciosa.

Outro elemento hoje muito discutido é a célula de Kupffer que por um lado atua como “filtro” dos elementos que ultrapassassem a mucosa intestinal em situações de estresse, por outro, sob essas circunstâncias, produziria substâncias capazes de afetar a função dos hepatócitos (WEST, KELLER e HYLAND, 1985).

Entre os fatores que favorecem a translocação bacteriana, são citados: doenças inflamatórias intestinais, obstrução intestinal, isquemia, alterações da microflora e agressões diretas à mucosa como radioterapia e quimioterapia; agressões à mucosa por alterações sistêmicas como a hipovolemia, vasoconstrição, sepse e ainda as alterações térmicas (AMBROSE et al., 1984; MOREHOUSE et al., 1986; DEITCH e BERG, 1987; GATHIRAN et al., 1987; MA et al., 1989; RUSH et al., 1989; HAJAR et al., 2002).

Nestas circunstâncias, os germes e as endotoxinas são fagocitados por macrófagos e vão ter aos linfonodos regionais. Uma grande carga de agentes agressores poderá ultrapassá-los e ganhar o ducto torácico e as veias tributárias do sistema porta; se passarem pelo fígado, atingirão o parênquima pulmonar.

Isso mostra que estudos de translocação que pretendam utilizar metodologia mais rigorosa devem incluir, além de amostras de tecido hepático amostras de gânglios mesentéricos e sangue.

A translocação bacteriana é definida como a passagem de bactérias viáveis ou não e seus produtos, do trato gastrointestinal para tecidos estéreis, muitos destas, destruídas pelo sistema de defesa, após ultrapassarem a barreira mucosa, algumas vezes nem chegando a ser identificadas laboratorialmente (BERG e

GARLLINGTON, 1979). As mais comumente isoladas são *E. coli*, *Klebsiella* sp, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus epidermidis*, *Candida albicans* e enterococos (WEST e colaboradores, 1985). Mais recentemente, HAJAR e colaboradores (2002), utilizaram como bactérias indicadoras apenas a *Escherichia coli* e o *Enterococcus faecalis*.

A obstrução intestinal é ótimo modelo para provar a translocação bacteriana, já que, nesses casos, é possível isolar germes nos gânglios mesentéricos, mesmo sem qualquer contaminação primária da cavidade peritoneal. O mecanismo pelo qual ocorre está relacionado à superpopulação bacteriana, aumento da permeabilidade intestinal e ruptura da barreira mucosa (DEITCH, 1989).

ZENI NETO e colaboradores (1997) estudaram a ocorrência de translocação bacteriana em ratos submetidos à oclusão intestinal do íleo terminal e do cólon descendente, com e sem isquemia e com isquemia isolada do íleo terminal. Os resultados permitiram concluir que ocorreu translocação bacteriana em ratos com oclusão intestinal do íleo terminal e do cólon descendente. Resultados semelhantes à laparotomia simples, com manipulação das alças intestinais, sendo a presença de isquemia do intestino delgado considerado por estes autores, um fator que aumenta significativamente o índice de translocação bacteriana.

Tanto as agressões diretas, como as indiretas à mucosa intestinal, por si só, justificam a facilitação à passagem de microorganismos.

Importante trabalho publicado em 1984 por ALEXANDER mostra, por outro lado, que, num modelo de grande queimado em animal levado previamente a estado de desnutrição grave, a *Candida albicans* marcada com C14 passa diretamente por células intactas da mucosa (à microscopia eletrônica), provocando lesão de microvilosidades no ponto de penetração. Isso já ocorre 12 horas após queimadura. As endotoxinas marcadas, por sua vez, preferem a via intercelular. Com relação à *E. coli*, a translocação é bem mais precoce, uma hora após a queimadura. O íleo terminal e o ceco são os locais em que o fenômeno é mais intenso, embora ele ocorra em todo o intestino, delgado e grosso. Neste mesmo trabalho, fica clara a relação entre a translocação e o número de microorganismos infundidos por gavagem refletindo a importância da superpopulação bacteriana patogênica no processo. Em particular, nos pacientes acometidos de grande redução do fluxo sanguíneo e desfuncionalização entérica por jejum prolongado, situação comum em

UTI, incide rápida atrofia da mucosa intestinal e perda de sua “função de barreira”. A penetração aumentada de germes e de endotoxinas ativa o sistema complemento a gerar grande número de produtos de degradação incluindo C3a, C3b, C3c e C3d, que são imunossupressores e aumentam a suscetibilidade a infecção bacteriana. Além disso, esses produtos têm efeitos secundários, de natureza inflamatória, capazes de reduzir ainda mais o fluxo esplâncnico. Os germes e as endotoxinas também estimulam os macrófagos a produzir grande quantidade de citocinas (interleucina 1, interleucina 6, fator de necrose tumoral, fator ativador de plaquetas e produto ativador do ácido araquidônico – prostaglandinas, leucotrienos, lipoxinas e tromboxanos), que, em excesso, são capazes de produzir insuficiência de múltiplos órgãos, síntese de proteínas da fase aguda do soro e liberação de neurotransmissores, que causarão liberação de hormônios catabolizantes pelo pâncreas e pelas adrenais.

Assim, a translocação pode perfeitamente explicar aqueles casos de estado séptico hipermetabólico sem foco infeccioso aparente, situação relativamente comum no paciente grave.

3.2 AS ENDOTOXINAS BACTERIANAS

O estudo das bactérias e seus efeitos deletérios no organismo humano teve grande avanço no final do século XIX, quando os bacteriologistas passaram a estudar as substâncias excretadas por estes microorganismos. Estas substâncias, denominadas exotoxinas, tinham como ponto comum a inativação pelo aquecimento. Nesse período descobriu-se que uma substância liberada pela lise bacteriana era resistente ao calor e se mostrava capaz de produzir efeitos biológicos importantes como febre e choque circulatório. Esta substância foi denominada de endotoxina (KNOBEL, 1998).

A endotoxina é um componente da membrana externa da parede celular de bactérias Gram-negativas. Atualmente, o termo lipopolissacarídeo (LPS) passou a ser utilizado como sinônimo de endotoxina. Há vários anos, a endotoxina é um produto biológico natural que fascina os pesquisadores (FREUNDENBERG e GALANOS, 1990). Dependendo da dose, pode desencadear vários efeitos no hospedeiro. A liberação de grandes quantidades de endotoxinas pelas bactérias

Gram-negativas resultam em sépsis e suas complicações: síndrome da resposta inflamatória sistêmica e choque séptico caracterizado por hipotensão, coagulação intra-vascular disseminada, falência de múltiplos órgãos e morte (PARILLO, 1993). Entretanto, existe contato permanente entre o organismo humano e o animal com a endotoxina, devido à presença de bactérias Gram-negativas no trato gastrointestinal e na pele, estas pequenas quantidades de endotoxinas podem aumentar a resistência às infecções e apresentar atividade anti-tumoral (NOLAN,1981).

O LPS é uma toxina termo-estável, composta por três subunidades: uma cadeia polissacarídica superficial, dita antígeno "O", responsável pela variabilidade antigênica das bactérias Gram-negativas, uma ponte também polissacarídica de localização intermediária e finalmente, o fosfolipídio A, inserido na membrana externa e responsável pela sensibilização do hospedeiro (FADEL, 1996) (figura 1).

O lipídio A é a porção com menor variação estrutural, responsável por todos efeitos maléficos e benéficos descritos até hoje. Constituído principalmente de glucosamina e fosfato, associado a um ácido graxo que contém 14 átomos de carbono. A liberação do lipídio A, separando-se da parede bacteriana, é necessária para que a molécula se torne ativa, fenômeno que ocorre somente quando as bactérias morrem ou se multiplicam.

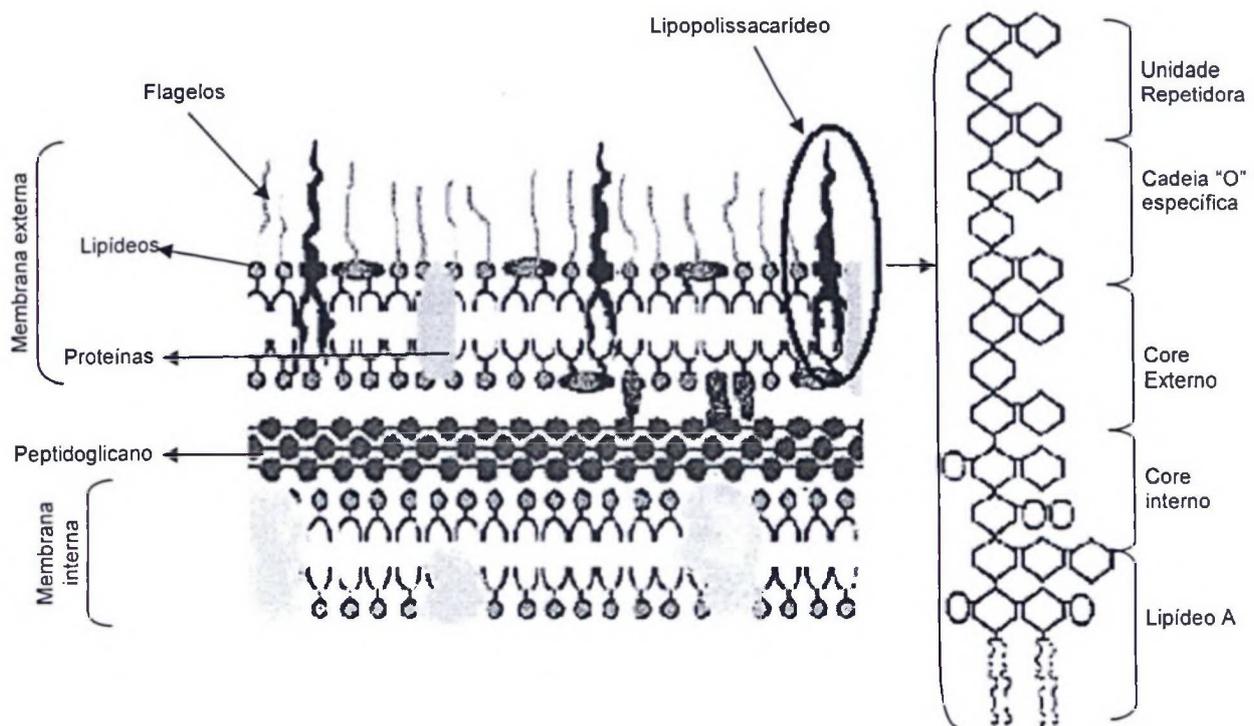


FIGURA 1: ESTRUTURA DA PAREDE CELULAR DE BACTÉRIAS GRAM-NEGATIVAS

A endotoxina (LPS), bem como os demais fragmentos de bactérias são capazes de induzir as células mononucleares humanas a produzir interleucina-1 (IL-1) e fator de necrose tumoral (TNF), que são duas citocinas integrantes da resposta imune. Dentre os múltiplos efeitos biológicos da IL-1 destacam-se a febre (ação no hipotálamo), a neutrofilia (ação na medula óssea), a proliferação de colágeno (estímulo de fibroblastos), a liberação de aminoácidos de músculos, a produção de IL-2 (ação nas células T), e a produção de anticorpos (ação nas células B) (DINARELLO, 1984).

As endotoxinas interagem com vários sistemas celulares e humorais. Após penetrar na circulação, ligam-se a lipoproteínas plasmáticas, resultando em redução de sua atividade biológica. Mesmo assim ativam o complemento, induzem a coagulação, afetam a função hepática e o sistema neuro-endócrino. Esta diversidade de respostas fisiológicas é direcionada à eliminação de endotoxinas, seus fragmentos, e até mesmo bactérias gram-negativas, e a seguir promover o reparo das lesões teciduais. Porém, devido às altas concentrações ou maior sensibilidade a endotoxinas, as ações dos sistemas de defesa tornam-se incontroláveis e, invés de contribuir, muitas destas respostas acabam sendo deletérias ao paciente.

A resposta pirogênica é o efeito mais conhecido, mas apenas um dos vários efeitos produzidos por endotoxinas, elas também induzem os macrófagos do Sistema Reticulo Endotelial (SRE) a liberar fatores antagonistas a glicocorticoide, fatores "insulina-like", fatores coagulantes, os quais, em conjunto determinam piora do quadro clínico por estarem relacionados com coagulação dentro de capilares, liberação de prostaglandinas, óxido nítrico (indutor de vasodilatação sistêmica e hipotensão no choque endotóxico), superóxidos e enzimas lisossômicas. Enfim, estas substâncias introduzidas iatrogenicamente, na corrente circulatória de pacientes em hemodiálise produzem tantos efeitos e afetam tantos sistemas que tornam difícil precisar e caracterizar um diagnóstico (DINARELLO, 1989).

JANSEN e colaboradores em 1991, descreveram um panorama geral do mecanismo indireto pelo qual atuam os produtos bacterianos, através de estudos com uma variedade de camundongo conhecida como C3H/HeJ. Como resultado de mutações genéticas espontâneas, estes animais não mostram nenhuma reatividade

ao LPS. Demonstrou-se que o transplante de medula utilizando doadores normais compatíveis, tornava estes animais suscetíveis aos efeitos letais do LPS. Por outro lado, a utilização de doadores C3H/HeJ na reconstituição da medula de camundongos normais, produzia animais quiméricos que não respondiam ao LPS. Concluiu-se que o mecanismo de ação da endotoxina é indireto, sendo mediado por células hematopoiéticas. Outros trabalhos, como LEPINE, e NEUGEBAUER, 1995, mostram que esta molécula é, por si só, pouco tóxica, necessitando de mediadores endógenos para produzir a totalidade dos eventos observados durante o choque séptico.

Durante o processo infeccioso, o organismo agredido entra em contato com o LPS no local da infecção e sistemicamente, através dos fragmentos bacterianos presentes na corrente sangüínea, liberados por ocasião do crescimento e multiplicação bacterianos. Após estudar a resposta de diversas células às endotoxinas, constatou-se que entre estas, os macrófagos são os mais ativados. DECKER, 1989, relatou que a endotoxina tem a capacidade de estimular as células de Kupffer a produzirem e liberarem citocinas como $TNF\alpha$, interferon α/β e IL-1. A interação da endotoxina com os macrófagos é, provavelmente, o principal fator da resposta inflamatória e do choque endotóxico.

O principal receptor para o LPS é o CD14, que é uma glicoproteína presente na superfície dos macrófagos e monócitos. Estudos com macrófagos normais e deficientes em CD14, mostraram que baixas doses de LPS necessitam da expressão do CD14, enquanto altas doses, podem desencadear a ativação dos macrófagos independente do receptor. GANGLOFF e colaboradores, 1999, determinaram se a variabilidade estrutural das moléculas de LPS, isoladas de diferentes espécies bacterianas, influenciavam a resposta dos macrófagos via receptores CD14. O estudo com LPS purificado de *Escherichia coli*, *Salmonella abortus-equi*, *Salmonella minnesota*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Neisseria meningitidis*, *Bacteroides fragilis* e *Rhodobacter sphaeroides* mostrou que a resposta dependente do CD14 requer um antígeno "O" específico, caracterizada por uma cadeia de carboidrato longa, com pelo menos 6 cadeias de acil no lipídeo A. O LPS que não tem o antígeno "O" específico é caracterizado por uma cadeia de carboidrato curta indutora da ativação dos macrófagos, independentemente da presença receptor CD14.

O LPS ligado aos receptores de membranas dos macrófagos induz a produção e secreção de glicoproteínas denominadas de citocinas. As citocinas têm ações locais e sistêmicas, controlando processos hormonais, imunológicos e inflamatórios. O $TNF\alpha$ é a primeira citocina a ser produzida durante o processo inflamatório e sua liberação irá induzir a síntese de diversas outras citocinas. A liberação de IL-1 também é precoce e, em conjunto com o $TNF\alpha$, estimula a síntese e modula a expressão de outras citocinas. As citocinas, também denominadas pró-inflamatórias, como o $TNF\alpha$, a IL-1, a IL-6, a IL-8, interagem de forma a constituir um ciclo vicioso no seu próprio processo de produção e liberação. Embora estas substâncias sejam necessárias para a resposta de defesa adequada, sem controle efetivo de sua produção elas induzirão estado de auto-agressão. Paralelamente, a síntese das citocinas anti-inflamatórias, IL-4, IL-10 e IL-13, é induzida. Do equilíbrio de forças entre as citocinas pró e anti-inflamatórias depende a homeostase do organismo (FADEL, 1996).

A reação generalizada de Shwartzman é caracterizada por necrose cortical renal bilateral, diátese hemorrágica e morte em 48 horas. Experimentalmente, duas injeções endovenosas de lipopolissacarídeo, com intervalo de 24 horas, desencadeiam este quadro, o qual foi observado durante a prenhez de coelhas e ratas com apenas uma injeção endovenosa de LPS, nos experimentos de APITZ, 1935; VIANA, 1948 e WONG, 1962.

3.3 A SUPLEMENTAÇÃO COM GLUTAMINA NA TRANSLOCAÇÃO BACTERIANA

Também como contribuição dos anos 70, foi a implementação de técnicas seguras para administrar nutrições parenterais totais, o que naquela época foi avaliado em casos de *translocação bacteriana intestinal e síndrome de disfunção de múltiplos órgãos*. Diversos trabalhos se somaram a este conhecer, como estudos clínicos ou modelos experimentais propostos para evitar e/ou diminuir a translocação bacteriana. Dentre eles, destaca-se o suporte nutricional com a utilização de nutrientes como a glutamina.

O enterócito é metabolicamente ativo (GATEHOUSE et al, 1978) e elabora grande número de importantes enzimas, hormônios e mediadores. A mucosa

intestinal tem alta taxa de renovação celular, mas é extremamente sensível ao jejum (CLARCK, 1975), já que as células nutrem-se diretamente do conteúdo do lúmen, além de receberem parte de suas necessidades calórico-protéicas basais por via sistêmica. A glutamina, juntamente com a alanina, é dos maiores transportadores de nitrogênio, para gliconeogênese, desde a musculatura esquelética consumida, no estresse severo. O consumo aumentado de glutamina, nessas condições, na mucosa jejunal, prova que o delgado é metabolicamente ativo no paciente grave (WILMORE et al, 1988).

MOORE et al em 1989, em estudo semelhante no homem, administraram nutrição parenteral total ou infusão enteral da mesma solução em dois grupos de pacientes – os índices de infecção foram, respectivamente de 37%, e de 9%, sugerindo que alimentação enteral é mais vantajosa, mesmo que de composição inadequada.

Mais que isso, a oferta de glutamina, por via enteral, tem-se mostrado efetiva na prevenção da translocação bacteriana em animais submetidos à quimioterapia ou radioterapia (FOX et al, 1988; SOUBA et al, 1990).

Nos pacientes absolutamente impossibilitados de receber nutrição enteral, o enriquecimento da nutrição parenteral total com glutamina tem-se mostrado útil na preservação das células intestinais (GRANT e SNYDER, 1988).

SPAETH e colaboradores (1993) realizaram estudo experimental com o objetivo de investigar se a glutamina possuiria efeito protetor sobre a barreira intestinal, quando utilizada com suplemento da nutrição parenteral. Primeiramente, 30 ratas Cr1:CD BR foram divididas em três grupos, recebendo dietas isocalóricas, nas quais foram implantados previamente cateteres na veia Jugular Interna. O grupo controle recebeu água *ad libitum*, ração para ratos e soro fisiológico pelos catéteres. O segundo grupo recebeu alimentação somente por via parenteral, com solução de 3,5% de aminoácidos solúveis e 1,5% de uma solução de alanina-Glutamina. No terceiro grupo (controle), as ratas recebiam alimentação somente por via parenteral e somente com alanina. Elas foram mantidas alimentadas dessa forma, por sete dias e, a seguir, foi realizada a eutanásia dos animais. Os linfonodos mesentéricos foram enviados para estudo quantitativo da população bacteriana, dosagem de IgA e estudo histológico da mucosa entérica. Secundariamente a concentração de alanina-Glutamina ou de alanina foi dobrada em 24 ratas Cr1:CD BR, que foram submetidas

ao mesmo período de tratamento e mesmos procedimentos a pós recebimento da dieta. Os resultados demonstraram que os grupos que receberam nutrição parenteral tiveram significativo supercrescimento bacteriano e índices de translocação bacteriana superiores ao controle. Em todos os grupos que receberam nutrição parenteral, foi observada atrofia similar da mucosa intestinal e os valores médios de IgA também foram semelhantes. Concluiu-se que não se justifica a suplementação de glutamina como uso rotineiro em solução de nutrição parenteral, podendo ser benéfica em pacientes criticamente enfermos.

XU e colaboradores (1993) investigaram o efeito da glutamina sobre a blastogênese linfocitária e a indução de translocação bacteriana. Utilizaram ratos Sprague-Dawley imunossuprimidos e separados em dois grupos. No primeiro grupo, os animais receberam dieta elementar composta sem glutamina. No grupo controle, os animais receberam ração para ratos que continha glutamina, também pelo mesmo período. Após o sétimo dia, foi realizada a eutanásia dos animais e seus órgãos foram enviados para cultura e estudo da população bacteriana. Os resultados demonstraram que a suplementação de glutamina não preveniu a translocação bacteriana, porém, foi limitada somente aos linfonodos mesentéricos. A resposta à blastogênese por mitógenos nos animais que receberam glutamina não foi superior à dos animais controle. Concluíram que a glutamina não diminui a translocação bacteriana e não alterou a imunossupressão.

ZAPATA-SIRVENT e colaboradores (1994) realizaram estudo experimental em camundongos CF-1, com o objetivo de verificar o efeito de diversas composições dietéticas sobre os índices de translocação bacterianas nos linfonodos mesentéricos. Os animais foram submetidos à queimadura de 32% da superfície corporal e no período pós-ressuscitação da queimadura foram divididos em diferentes grupos, conforme a dieta que recebiam: ração para camundongos e água *ad libitum*, dieta enteral com pouco resíduo, dieta enteral hiperproteica hipercalórica, dieta enteral com alta concentração de glutamina ou dieta enteral rica em fibras. Os resultados demonstraram que a letalidade nos animais receberam nutrição enteral, foi maior do que nos animais que não a recebeu, sendo verificado maior índice de letalidade entre aqueles que receberam dieta enteral com pouco resíduo. Os índices de translocação bacteriana foram estatisticamente menores nos animais que não receberam dieta enteral (30,8%) e nos animais que receberam dieta enriquecida

com glutamina (31,3%), sendo intermediários nos animais que receberam fibra (44,82%). Concluiu-se que, comparado com outras dietas enterais, a dieta enteral enriquecida com glutamina ou fibra tem papel protetor contra a translocação bacteriana.

BARK e colaboradores (1995) estudaram a suplementação de dieta enteral enriquecida com glutamina sobre os índices de translocação bacteriana, em modelo experimental de choque hemorrágico. Utilizaram ratos Sprague-Dawley que foram previamente submetidos a um período de 7 dias de alimentação com dieta suplementada com glutamina ou com dieta isocalórica e, após o período de alimentação, foram redivididos e submetidos a somente laparotomia, choque hemorrágico moderado ou choque hemorrágico grave. Após 24 horas foi realizada a eutanásia dos animais e os linfonodos mesentéricos foram enviados para cultura e o sangue para análise bioquímica. Os resultados demonstraram que somente bactérias Gram-negativas foram observadas nas culturas dos linfonodos mesentéricos, sendo a *Escherichia coli* a bactéria mais encontrada. Os animais dos grupos que sofreram choque hemorrágico grave tiveram índices de translocação bacteriana estatisticamente superiores aos que sofreram somente laparotomia, porém não houve diferença entre os animais que receberam glutamina e os animais que receberam outros aminoácidos durante o período inicial de alimentação. Concluiu-se que a suplementação de glutamina parece não diminuir os índices de translocação bacteriana para os linfonodos mesentéricos em ratos submetidos a choque hemorrágico.

TORRES (1997) realizou estudo experimental para avaliar a ocorrência de translocação bacteriana em ratos submetidos à oclusão intestinal e verificação da capacidade de uma dieta imunoestimuladora em reduzir a incidência de translocação bacteriana nesses animais. Utilizou no estudo, 24 ratos Wistar divididos em três grupos. Os animais do grupo I (Imunomodulação) receberam uma dieta imunoestimuladora, os animais do grupo C (Controle) receberam ração padrão para ratos e os animais do grupo D (Desnutrição) recebeu metade da oferta calórica da mesma ração do Grupo Controle. Após 7 dias do início do estudo todos os animais foram submetidos à ligadura do íleo terminal, realizando-se a eutanásia dos animais 18 horas a seguir. Segmentos dos baços, fígados e os linfonodos mesentérico foram enviados para estudo microbiológico e histológico. Os resultados demonstraram que

as culturas dos baços, fígados e linfonodos mesentéricos foram positivas em 100% dos animais do grupo D, em 58,3% do grupo I e em 62,5% dos ratos do grupo C. as diferenças nas alterações histológicas foram mínimas entre os três grupos. Concluiu-se que a translocação bacteriana ocorre em ratos submetidos à oclusão intestinal e que o suporte nutricional com dieta imunoestimuladora é capaz de reduzir a incidência de translocação bacteriana em ratos com oclusão intestinal.

GENNARI e ALEXANDER (1995) estudaram os efeitos da arginina, glutamina e da dehidroepiandrosterona sobre a redução da suscetibilidade à infecção causada pela prednisona em modelo experimental de queimadura. Utilizaram fêmeas de camundongos BALB/C, que foram alimentados previamente por 14 dias, com dieta enriquecida com glicina (controle), e arginina e/ou glutamina em concentrações que variaram de 2% a 4,5%. Em seguida, os animais receberam por cinco dias, dehidroepiandrosterona ou prednisona. Antes de serem submetidos a injúria térmica, eles receberam por gavagem *Escherichia coli* marcada com Índio¹¹¹. Os animais foram submetidos à queimadura de 20% da superfície corporal e quatro horas após foi realizada a eutanásia dos animais. Linfonodos mesentéricos, baços e fígados foram enviados para cultura e detecção do radioisótopo. Os resultados demonstraram que a letalidade foi menor nos animais que receberam glutamina, arginina ou dehidroepiandrosterona. Os índices de translocação bacteriana e de bactérias detectadas no detector de Índio¹¹¹ foram menores nos animais tratados com arginina, glutamina ou arginina e glutamina, ou que receberam dehidroepiandrosterona do que nos animais que receberam prednisona e/ou foram tratados com glicina. Concluiu-se que alimentação suplementada com glutamina, arginina ou ambos, bem como o tratamento com dehidroepiandrosterona revertem a suscetibilidade à sepse intestinal causada pela prednisona e que podem ser agentes potentes na prevenção de infecção em pacientes que usam corticóide.

FOITZIK e colaboradores (1999) estudaram o efeito da suplementação de glutamina em dois modelos de lesão da barreira intestinal. Utilizaram ratos Sprague-Dawley que foram divididos em dois grupos, conforme a injúria a que eram submetidos. No grupo P, pancreatite aguda severa foi induzida pela infusão de Ceruleína intravenosa e de Ácido Glicodeoxicólico no ducto biliar comum; no grupo C colite severa foi induzida através da infusão intra-retal de ácido trinitrobenzenosulfônico. Em seguida, os animais foram redivididos em dois grupos,

conforme o tipo de suporte nutricional que recebiam, suplementado com glutamina ou glicina, iniciado 6 horas após a indução da pancreatite e 8 horas após a indução da colite. Após 48 horas foi realizada a eutanásia de alguns animais e segmentos colônicos foram enviados para estudo microscópico do fluxo sangüíneo mesentérico, estudo eletrofisiológico do intestino delgado e da resistência da parede colônica ao fluxo de manitol. Após 96 horas, foi realizada a eutanásia no restante dos animais e segmentos dos linfonodos mesentéricos, baço, fígado e rins destes animais foram enviados para estudos histológicos e culturas. Os resultados demonstraram que no modelo de pancreatite a suplementação de glutamina aumenta significativamente a resistência transmucosa colônica, diminui o fluxo capilar e também o fluxo de manitol pelo epitélio. A letalidade dos animais que receberam suplementação de glutamina foi um terço menor do que naqueles que não a receberam. O número de culturas positivas foi de 33% nos animais que receberam suplementação de glutamina e de 86% nos animais que não receberam esta suplementação. No modelo de colite, a suplementação de glutamina não alterou esses parâmetros, exceto pela melhora do fluxo sangüíneo da mucosa colônica. Concluíram que a suplementação da dieta com glutamina estabiliza a barreira mucosa em determinadas doenças e diminui os índices de translocação bacteriana na pancreatite aguda.

ERSIN e colaboradores (2000) estudaram o efeito profilático e terapêutico da arginina e da glutamina em um modelo de enterite pós-irradiação em ratos. Utilizaram 35 ratos Sprague-Dawley divididos aleatoriamente, em cinco grupos de sete animais cada, conforme o tipo de dieta oferecida antes ou após receberem irradiação de 1100cGy por fonte convencional de raios-X. Os animais do grupo II receberam arginina (50ml/dia) por 7 dias que precederam e 7 dias que sucederam a irradiação. Os animais do grupo III receberam glutamina (15ml/dia) por 7 dias que sucederam a irradiação, sendo-lhes dada água *ad libitum* e ração para ratos nos 7 dias que precederam a irradiação. Os animais do grupo IV receberam arginina (60ml/dia) por 7 dias que sucederam a irradiação, água *ad libitum* e ração para ratos nos 7 dias que precederam a irradiação. Os animais do grupo V (controle) receberam água *ad libitum* e ração para ratos sete dias que precederam e nos próximos sete dias que sucederam a irradiação. Após este período, os animais foram submetidos à laparotomia e os linfonodos mesentéricos foram enviados para estudo microbiológico. Amostras de sangue foram enviadas ao laboratório para

dosagem sérica de glutamina ou arginina, e segmentos de jejuno, íleo e cólon foram enviados para estudo histológico. Os resultados demonstraram que a translocação bacteriana foi significativamente maior ($p < 0,005$) no grupo V em relação aos outros grupos. A contagem das vilosidades e tamanho foi significativamente maior em todos os grupos que receberam arginina ou glutamina, em relação ao grupo V ($p < 0,05$ e $p < 0,001$; respectivamente). Os níveis séricos de arginina e glutamina nos grupos que as receberam, também foram estatisticamente maiores do que no grupo V ($p < 0,05$). Concluiu-se que arginina e a glutamina possuem papel protetor da mucosa entérica após irradiação, porém a administração prévia e posterior dos aminoácidos não oferece proteção adicional em relação à administração somente após a irradiação.

3.4. SÉPSIS, FALÊNCIA DE MÚLTIPLOS ÓRGÃOS E TRANSLOCAÇÃO BACTERIANA

Até a presente data, grande quantidade de estudos clínicos, experimentais e laboratoriais têm acumulado evidências suficientes sobre a participação ativa da cascata inflamatória na gênese de quadros de falência de múltiplos órgãos.

A sépsis está associada com o início e propagação de uma intensa cascata inflamatória, envolvendo células inflamatórias e mediadores imunológicos. Muitas destas células e mediadores foram identificados durante os últimos anos sendo as suas ações específicas, exploradas cuidadosa e intensamente. Mais recentemente os investigadores iniciaram a avaliação destes mediadores como ferramentas de diagnóstico e prognóstico em pacientes sépticos.

Existem três fases arbitrárias da cascata inflamatória: iniciação, ampliação e agressão durante as quais se estudam os mediadores circulantes. Muitas substâncias são capazes de iniciar a cascata inflamatória. As endotoxinas foram responsabilizadas como iniciadoras da cascata inflamatória em muitos doentes, por isso foram extensamente estudadas em doentes em risco de sépsis e assinalados como marcadores diagnósticos. Dos vários estudos realizados não ficou claro se as endotoxinas seriam um bom marcador de uso clínico. Não existe ainda consenso sobre a pesquisa de um único marcador que diagnostique a sépsis, ficou como

hipótese que as endotoxinas iniciam e ampliam a cascata inflamatória através de vários mecanismos incluindo o "priming" de neutrófilos para uma resposta aumentada ao estímulo tal como fragmentos do complemento e ativação da cascata do complemento.

Muitos componentes da cascata incluindo C3, C3a, C5a e o complexo terminal C5b-9 foram medidos em doentes com sépsis. Dos estudos realizados, ficou clara a evidência que a ativação do complemento ocorre em doentes com sépsis, mas a medição simples da ativação do complemento não provou ser clinicamente útil como marcador diagnóstico e prognóstico da sépsis.

As endotoxinas podem estimular a liberação de várias citocinas, incluindo o fator de necrose tumoral alfa ($TNF\alpha$), interleucinas 1, 6 e 8, os quais foram implicados na patogênese da sépsis sendo estudadas as suas potencialidades diagnósticas e prognósticas de cada um destes mediadores. Muitos destes demonstraram resultados entusiasmadores, especialmente os níveis circulantes de IL-6, contudo, a avaliação destes mediadores na corrente circulatória de pacientes sépticos não ainda de uso rotineiro (ABBAS e ABUL, 2000):

3.5 SÉPSIS – UM TEMA AINDA EM DISCUSSÃO

Conforme observado no XXXI CONGRESSO DE TERAPIA INTENSIVA em San Diego (Califórnia – USA), em janeiro de 2002, existem ainda controvérsias sobre a caracterização de um estado séptico.

Com respeito à fisiopatologia da sépsis severa e suas implicações no tratamento, chamou-se a atenção para o fato de que, mesmo nos EUA não existem dados estatísticos suficientes para que seja conhecida precisamente sua letalidade, porque trata-se de um evento que ocorre em pacientes que têm outro diagnóstico primário, fato que causa alguma confusão no registro das informações. Estima-se que há nos EUA mais de 750.000 casos/ano. Foram abordadas as definições de Infecção, SIRS, sépsis, sépsis severa e choque séptico. Apesar da revisão feita em 2001, as definições correntes não foram modificadas.

O ponto em que ainda há controvérsia é a questão relacionada com o fato de que alguns consideram a sépsis como uma "resposta normal" do organismo diante

de uma infecção, enquanto outros a consideram como uma “resposta deletéria” ao próprio organismo. Enfatizou-se para a necessidade de classificar corretamente o estágio em que se encontra o paciente, como sépsis ou sépsis severa, fato que pode ter conseqüências em sua terapêutica. Na prática, muitos pacientes são classificados como portadores de sépsis quando têm apenas Infecção ou SIRS, ou então quando já apresentam sépsis severa. Foi sugerido o sistema “PIRO” para abordagem do paciente, que significa análise da “*Predisposition, Infeccion, Response and Organ Failure*”, sendo essa abordagem uma útil ferramenta para a correta classificação do estágio.

Foi apresentada extensa revisão do papel dos monócitos/macrófagos e das células endoteliais na fisiopatologia da sépsis, abordando os principais mediadores envolvidos, entre estes, a relação LPS e $TNF\alpha$ e os efeitos pró-inflamatórios e pró-coagulantes dos mesmos, demonstrando também a interação entre os sistemas pró-inflamatório e pró-coagulante. Saliou que o grande número de mediadores envolvidos no processo e o grande número de vias de interação entre eles são os responsáveis pela falha da maior parte dos “*trials*” relacionados com as drogas anti-trombóticas.

Foi relevante a sessão plenária “Implicações e aplicações da era da genética no paciente grave”, onde se demonstraram as evidências atuais, através de inúmeros trabalhos, que comprovam a existência de variáveis genéticas que: 1) predispõem o hospedeiro à infecções; 2) modificam a resposta do paciente à determinada terapêutica 3) tornam determinados patógenos mais agressivos e 4) modificam a resposta de certos patógenos à determinada terapêutica.

Dessa forma, a identificação de genes responsáveis por alterações desse tipo e a possibilidade de intervir nos mesmos trazem novas perspectivas de tratamento para pacientes críticos.

Apesar das definições estabelecidas em consenso, demonstrou-se que 36 % dos envolvidos nos debates discordam das definições, e que em 81% das vezes há confusão quando se tenta classificar um paciente dentro das definições estabelecidas. Assim sendo, em 2001 houve uma conferência para revisão do tema. Como resultado, não foram feitas modificações nas definições, pois se concluiu que

o problema não está nelas, mas na heterogeneidade dos pacientes, levando à dificuldade de classificá-lo corretamente. Introduziu-se o sistema PIRO para auxiliar na avaliação. "P" de predisposição, onde são levados em consideração os fatores genéticos, as doenças pré-existentes e os hábitos que influenciam a saúde e a possibilidade de translocação bacteriana intestinal. "I" de insulto, que pode ser um trauma, isquemia, infecção, agressão por endotoxina em vigência de translocação bacteriana. "R" de resposta, como manifestação de marcadores genéticos, mediadores específicos, presença de choque, exemplificando, a SIRS como um exemplo de resposta. "O" de "*organ failure*", onde se especificam as falências orgânicas.

4 Material e Método

4.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

O presente estudo foi realizado no laboratório de Microbiologia e Imunologia da Faculdade Evangélica de Medicina do Paraná.

Foi avaliada a ação da glutamina (GLN) na translocação bacteriana e suas repercussões imunológicas como : liberação endotoxina bacteriana (LPS), consumo de C3 e liberação de $TNF\alpha$, em um modelo experimental de indução de resposta inflamatória sistêmica (RIS) induzido pelo zymosan (ZYM).

Adotaram-se as Normas para Apresentação de Trabalhos Científicos da Universidade Federal do Paraná (2000), Nomina Anatômica Veterinária (1985)¹, bem como os Princípios Éticos na Experimentação Animal, propostas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA-1995). A organização dos grupos e sub-grupos deste estudo está demonstrada na tabela 1.

TABELA 1 - DEMONSTRATIVO DO DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E DA ORGANIZAÇÃO DOS GRUPOS DE ESTUDO

Organização dos Grupos de Animais			Descrição	
Grupos	Sub-grupos	N		
Zymosan (ZYM)	1mg/100g	Glutamina	10	Avalia o efeito da GLN na indução de RIS por 1mg/100g de ZYM
		SSI	10	Controle da indução de RIS por 1 mg/100g de ZYM
	2mg/100g	Glutamina	10	Avalia o efeito da GLN na indução de RIS por 2 mg/100g de ZYM
		SSI	10	Controle da indução de RIS por 2 mg/100g de ZYM
Solução Salina Isotônica (SSI)	Glutamina	10	Controle do uso da GLN em ratos normais	
	SSI	10	Controle do experimento (sub-grupo de referência)	

4.2 ANIMAIS UTILIZADOS

Foram utilizados 60 ratos albinos machos, (*Rattus norvegicus*, *Rodentia*, *mammalia*, da linhagem Wistar) provenientes do biotério da Faculdade Evangélica do Paraná, com pesos variando entre 282 a 312g.

¹ International Comitee on Veterinary Gross Anatomical Nomenclature

Os animais foram alojados em ambiente controlado, em grupos de cinco, em caixas de polipropileno, à temperatura ambiente entre 19 a 24°C, umidade relativa do ar de 50 a 60%, ciclos de iluminação claro/escuro de 12 por 12 horas sob exaustão, recebendo água e ração específica para a espécie (Nuvilab[®] CR1, Nuvital), *ad libitum*.

4.3 INDUÇÃO DE REAÇÃO INFLAMATÓRIA SISTÊMICA EM RATOS PELO ZYMOSAN

Foi utilizado o modelo experimental proposto por GORIS e colaboradores (1986), no qual é utilizado o zymosan como droga indutora de reação inflamatória pela sua capacidade de ativação do sistema complemento pela via alternativa *in vivo*.

4.3.1 Preparação da solução de zymosan

- 2,5g de zymosan (SIGMA[®] artigo Z-4250) foram ressuspendidas em 100ml de parafina líquida (REAGEN[®]) e homogeneizado em agitador magnético (FANEN[®]);
- A seguir foi esterilizado em banho-maria a 100°C por 80 minutos;
- A esterilidade foi testada por semeadura em caldo tioglicolado de sódio (BIOBRÁS[®]) incubado por quatro dias a 37°C;
- Antes da utilização, a suspensão de zymosan em parafina foi aquecida a 40°C e agitado por 10 minutos em agitador magnético;

4.3.2 Inoculação dos animais

Os ratos a serem inoculados com zymosan (n=40), após pesagem, foram separados em dois grupos: ZYM 1mg (n=20) e ZYM 2mg (n=20). A seguir foram anestesiados por inalação com éter sulfúrico e receberam a injeção de ZYM por via intraperitoneal, conforme descrito na tabela 1, sendo respectivamente 1mg e 2mg para cada 100g de peso corpóreo, conforme o grupo e mantidos em biotério seguindo as condições descritas no item 4.2. durante 4 dias.

Os ratos do grupo SSI, receberam 1ml de solução salina isotônica por via intraperitoneal e igualmente e mantidos em biotério seguindo as condições descritas no item 3.2. durante 4 dias.

4.4 SUPLEMENTAÇÃO NUTRICIONAL COM GLUTAMINA

Foi preparada uma solução de glutamina (SIGMA[®]), a 10%. Esta solução era mantida sob agitação magnética durante o procedimento e era administrada por gavagem, num volume diário de 1ml da solução, correspondente a 0,1g. Este procedimento era feito após sedação dos animais com éter sulfúrico. O grupo SSI recebia, nas mesmas condições, solução salina isotônica.

Os ratos foram submetidos à suplementação nutricional com glutamina durante os cinco dias subseqüentes à inoculação pelo zymosan.

4.5 COLETA DE AMOSTRAS

No quinto dia de evolução, após a inoculação do ZYM, suplementados ou não com glutamina, os animais foram submetidos à anestesia inalatória com éter sulfúrico e coletadas amostra de sangue e baço, fígado, linfonodos mesentéricos e intestino. A seguir, ainda anestesiados foram submetidos à eutanásia por inalação letal de éter sulfúrico.

4.5.1 Coleta de Sangue

Com o animal anestesiado por inalação de éter sulfúrico, foram executados os seguintes procedimentos :

- Degermar a pele da região torácica com algodão embebido em álcool 90°GL
 - Puncionar o tórax do animal na posição em que se perceba os batimentos cardíacos.
 - Aspirar sangue com seringas e agulhas heparinizadas até o volume mínimo de 2ml.
 - Para a pesquisa de *Escherichia coli* e *Enterococcus faecalis*, 1ml de sangue era imediatamente semeado no meio de cultura de enriquecimento Brain Heart
-

Infusion e incubados a 37°C por 5 dias, sendo selecionados os frascos que demonstrassem crescimento positivo e submetidos à identificação bacteriana conforme TRAYA (1998) e HAJAR (2002).

4.5.2 Coleta de vísceras

Após a coleta de sangue, ainda com os animais anestesiados foram feitos os seguintes procedimentos :

- Degermar a pele das regiões abdominal e torácica com algodão embebido em álcool 90°GL
 - Proceder abertura ampla da pele, em forma de cunha, retirando totalmente o retalho
 - Degermar o tecido sub-cutâneo exposto com polivinilpirrolidona-iodo (Povidine, DARROW®)
 - Com auxílio de pinça e tesoura esterilizadas abrir igualmente toda a musculatura abdominal e retirar o retalho muscular correspondente
 - Proceder inventário da cavidade, assinalando os seguintes achados macroscópicos : líquido livre em cavidade peritoneal, aderências do intestino delgado sobre a região isquemiada, presença de áreas intestinais enegrecidas.
 - Com novos jogos de pinças e tesouras esterilizadas, coletar : rins, baço, linfonodos mesentéricos (LNM), fígado e segmento intestinal
 - Acondicionar as amostras coletadas individualmente em placa de Petri esterilizadas.
 - Remeter o animal à cuba plástica saturada com éter sulfúrico e submetê-lo à eutanásia por inalação letal.
-

4.6 AVALIAÇÃO DA TRANSLOCAÇÃO BACTERIANA

Esta avaliação tem como princípio o isolamento das bactérias entéricas *Escherichia coli* e *Enterococcus faecalis* em amostras de sangue e macerados de fígado, baço e linfonodos mesentéricos.

4.6.1 Preparação das amostras

As amostras foram preparadas conforme a metodologia a seguir :

- Triturar de cada órgão separadamente, sobre tela de nylon esterilizada com 20µ de porosidade.
- Diluição do macerado em 5ml de água peptonada a 10%.
- Semear em duplicatas 1ml desta solução nos meios de cultura específicos para o cultivo e identificação bacteriana.

4.6.2 Pesquisa de *Escherichia coli*

Foi empregado o caldo lactosado com indicador de pH - vermelho de metila, sendo semeados 1ml do macerado de cada víscera em cada um dos dois tubos com 10ml de meio. As amostras que não demonstraram crescimento nas primeiras 48 horas, foram incubadas até o 7º dia para comprovação da negatividade.

Após incubação por três dias à 37°C e viragem de pH, utilizou-se agar eosina-azul de metileno - BIOBRÁS® para seleção de colônias lactose-positivas que eram evidenciadas pela coloração verde-metálica, típica de *Escherichia coli* neste meio de cultivo, após incubação por 24 horas à 37°C. Ao término deste período, as colônias típicas de *Escherichia coli* foram submetidas à identificação bioquímica proposta por ISEMBERG (1998).

4.6.3 Pesquisa de *Enterococcus faecalis*

Utilizou-se o Kenner Fecal Streptococcus agar (DIFCO®) suplementado com cloreto de trifeniltetrazolium (Merck® artigo 12.340) sendo semeados 1ml do

macerado de cada víscera em cada um dos dois tubos com 10ml de meio. As culturas positivas em Kenner Fecal Streptococcus foram repicadas para caldo simples.

As amostras que não demonstraram crescimento nas primeiras 48 horas, foram incubadas até o 7º dia para comprovação da negatividade. Ao término das incubações das colônias típicas de *Enterococcus faecalis* em Caldo Simples foram submetidas à prova da catalase e hidrólise da esculina, sendo assim caracterizadas as amostras de *Enterococcus faecalis*, conforme ISEMBERG (1998).

4.7 AVALIAÇÃO DA PERMEABILIDADE VASCULAR INTESTINAL

Conforme descrito por BORDON DE CORVALAN (1994), aplicado por HAJAR (1994) seguiram-se as seguintes etapas :

4.7.1 Preparação da solução de azul de Evans

Foi preparada uma solução do azul de Evans a 2,5% (p/v), (MERCK® artigo 3169), em solução fisiológica, num volume suficiente para todo o experimento. A solução resultante apresentava 20 mg/ml, sendo filtrada em membrana esterilizante de 0,22µ, MILLIPORE®, e conservada em temperatura entre 4 a 8°C.

4.7.2 Inoculação

Foi realizada a inoculação do azul de Evans em todos os animais dos grupos sob indução de isquemia e manipulações, 8 horas antes do sacrifício. Cada rato sob efeito anestésico de éter sulfúrico, foi colocado em decúbito dorsal. O pênis foi tracionado e a veia peniana puncionada com agulha número 13 x 4,5mm. A seguir foi injetada a solução do azul de Evans na dose de 20mg/kg de peso.

4.7.3 Calibração do Método

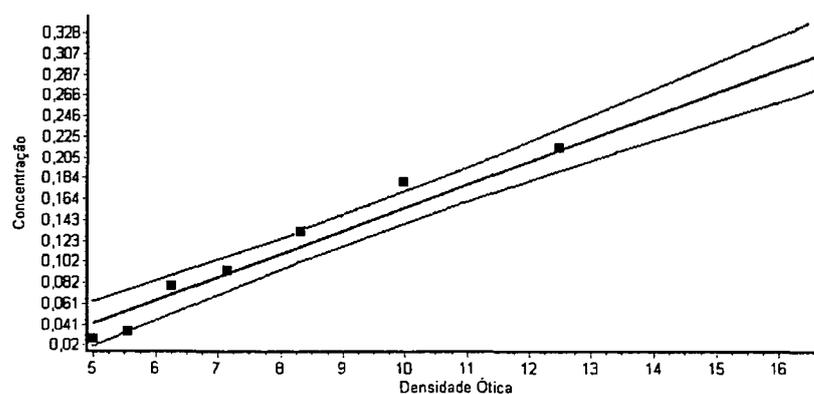
Tomou-se uma alíquota da solução do azul de Evans a 2,5% para padronização do método de microleitura espectrofotométrica. Nesta solução nas

diluições compreendidas entre 1/1500 a 1/5000 calculou-se o coeficiente de extinção no comprimento de onda de 620 nm, frente ao padrão branco de formamida, utilizando leitor de micro-placas de ELISA-BIOTEK BT-100[®]. Os valores de densidade ótica obtidos nas diluições da solução padrão do azul de Evans em relação às concentrações das mesmas foram interpolados.

TABELA 2 - RELAÇÃO ENTRE CONCENTRAÇÃO DO AZUL DE EVANS DA SOLUÇÃO PADRÃO E DENSIDADE ÓPTICA A 620 nm FRENTE À SOLUÇÃO FISIOLÓGICA

Concentrações (µg/ml)	Densidade Ótica
16,66	0,290
12,50	0,214
10,00	0,180
8,33	0,132
7,14	0,093
6,25	0,078
5,55	0,033
5,00	0,027

GRÁFICO 1 - CURVA DE CALIBRAÇÃO AZUL DE EVANS A 620nm²



4.7.4 Obtenção de amostras para dosagem de azul de Evans

Os animais dos grupos estudados foram sacrificados através da inalação letal de éter sulfúrico, a seguir, com o animal em decúbito dorsal, extremidades fixadas e anti-sepsia local, foi realizada laparotomia mediana xifo-púbica. Procedeu-

² Coeficiente de Correlação (r)= 0,98435

se à coleta das amostras dos segmentos e foram individualmente pesados em balança eletrônica e colocadas em tubos de ensaio, acrescentando-se a estas Formamida na proporção de 4ml/mg de peso da amostra.

4.7.5 Extração e dosagem de azul de Evans

Os extratos de azul de Evans em Formamida foram distribuídos em volumes de 150 µl, com auxílio de uma pipeta automática GILSON[®], em cada um dos orifícios da placa de Terazaki CORNING[®], realizou-se leitura espectrofotométrica em leitor de ELISA com filtro de 620 nm de comprimento de onda. Foi utilizada solução de Formamida como branco para o teste.

As leituras obtidas foram interpoladas por regressão linear na curva de calibração da solução do azul de Evans e suas concentrações nas amostras calculadas em microgramas do corante por miligrama da amostra intestinal.

4.8 DOSAGEM DE ENDOTOXINAS

Para a dosagem de endotoxinas, foi empregado o método do *Lymulus Amebocyte Lisate* (ENDOSAFE[®] 1073), descrito por BERTÓK (1997), que tem por princípio a capacidade dos amebócitos extraídos do crustáceo *Limulus polyphemus* gelificarem-se na presença de endotoxinas (LPS). Esta gelificação é consequência da ativação da enzima zimogênica serin-protease, em presença de cátions divalentes que produzem o coagulogênio do *Limulus*.

4.8.1 Materiais

- Reagente LAL (Lisado de Amebócitos de *Limulus* sp.);
 - Endotoxina padrão de *Escherichia coli* (50UE/ml);
 - Tubos de vidro despirogenizados para hemólise
 - Frascos de 20ml despirogenizados
 - Pipetas de vidro 2,0; 5,0 e 10ml;
 - Agitador de tubos;
-

-
- Banho-Maria regulado a 37°C
 - Pipetas automáticas Gilson® com ponteiros apirogênicos.

4.8.2 Método

4.8.2.1 Preparação de materiais despirogenizados

As pipetas e os frascos de vidro foram embalados com papel alumínio e colocados em forno Pasteur à temperatura de 180°C por 3 horas.

4.8.2.2 Preparação do reagente LAL

- O lisado foi reconstituído com água apirogênica no volume indicado pelo fabricante do reagente.
- Homogenizou-se evitando a formação de espuma. Aliquotou-se, o lisado, com pipeta automática: 0,1ml do reagente LAL em tubos de hemólise. Os tubos foram conservados em freezer a -20°C.

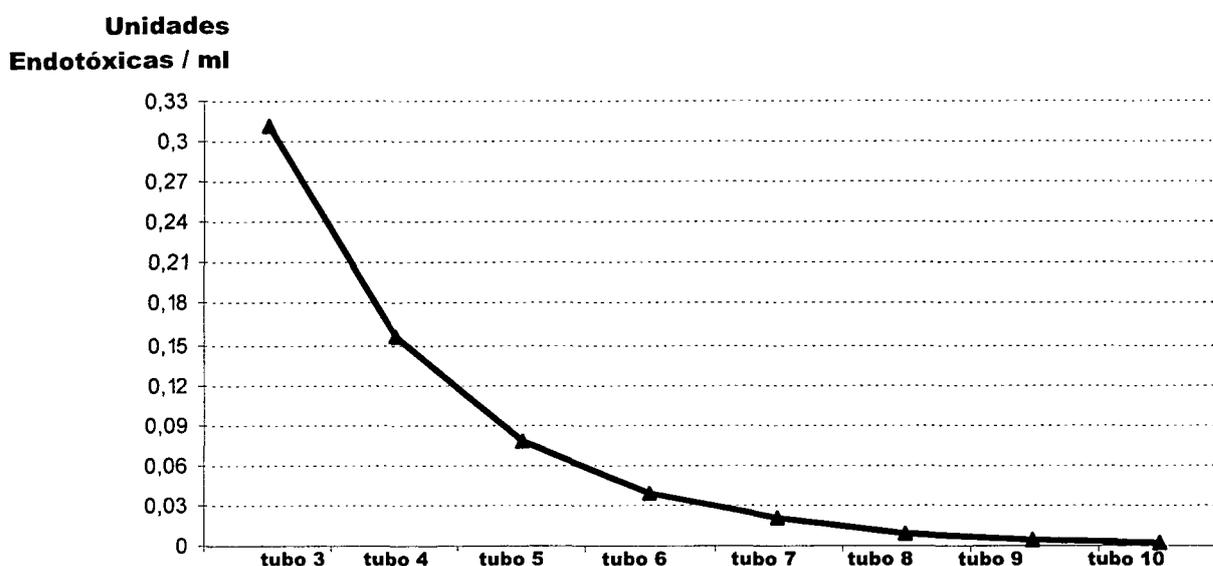
4.8.2.3 Preparação da endotoxina padrão

- O liofilizado de endotoxina padrão foi reconstituído com água e materiais despirogenizados, conforme as orientações do fabricante. A solução padrão de endotoxina continha 50UE/ml.
 - Preparação da curva padrão de endotoxina :
Foram preparadas diluições do padrão de endotoxina conforme a tabela abaixo :
-

TABELA 3 - DILUIÇÕES DA ENDOTOXINA PADRÃO

Tubo	Volume a ser transferido (ml)	Água Apirogênica	Unidades Endotóxicas (UE/ml)	Resultado
1	0,5ml de endotoxina padrão (50 UE/ml)	4,5ml	2,5	Positivo
2	0,5ml do tubo 1	0,5ml	1,25	Positivo
3	0,5ml do tubo 2	0,5ml	0,3125	Positivo
4	0,5ml do tubo 3	0,5ml	0,15625	Positivo
5	0,5ml do tubo 4	0,5ml	0,078125	Positivo
6	0,5ml do tubo 5	0,5ml	0,0390625	Positivo
7	0,5ml do tubo 6	0,5ml	0,01953125	Positivo
8	0,5ml do tubo 7	0,5ml	0,00976562	Negativo
9	0,5ml do tubo 8	0,5ml	0,00488281	Negativo
10	0,5ml do tubo 9	0,5ml	0,00244140	Negativo

GRÁFICO 2 - REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DAS DILUIÇÕES DA ENDOTOXINA PADRÃO



- A cada diluição realizada, o tubo foi agitado em vórtex, durante 5 minutos e após distribuído 0,1ml de cada uma das diluições nos tubos com o reagente LAL. Incubou-se por 1 hora em "banho-Maria" 37°C. A leitura foi realizada com a inversão dos tubos a 180°C. O resultado positivo foi indicado pela formação de gel que não se desprendia do fundo do tubo.
- A sensibilidade do reagente LAL, foi acertada como a última diluição com reação de gelificação positiva = 0,01953125UE/ml.

4.8.2.4 Análise qualitativa de endotoxina nas amostras de plasma de ratos

- Distribuiu-se 0,1ml da amostra em tubo contendo o reagente LAL. Realizou-se a prova com controle positivo (endotoxina padrão 5 UE/ml) e controle negativo (água apirogênica).
- Foi incubado a 37°C por 1 hora e após realizou-se a leitura. Se a amostra produzisse reação de gelificação, procedia-se à análise quantitativa, conforme descrito abaixo:

4.8.2.5 Análise quantitativa de endotoxina nas amostras de plasma de ratos

- Realizaram-se diluições seriadas do plasma, com fator 2 de diluição 1:2, 1:4, 1:8, 1:16 e 1/32, em água apirogênica.
- Distribuiu-se 0,1ml de cada diluição em tubos contendo 0,1ml do reagente LAL e incubou-se a 37°C por 1 hora e realizou-se a leitura.
- Se a amostra produzir reação de gelificação, proceder ao cálculo de teor de endotoxina em unidades endotóxicas por mililitro de plasma, multiplicando a sensibilidade do reagente LAL (0,01953125UE) pela última diluição que produziu reação de gelificação.

4.9 DOSAGEM IMUNOENZIMÁTICA DOS NÍVEIS SÉRICOS DO FATOR DE NECROSE TUMORAL ALFA (TNF α)

Esta dosagem emprega a técnica imunoenzimática quantitativa, conforme proposição de SPRONG e colaboradores (1986), na qual um anticorpo monoclonal específico anti-TNF α é fixado em placa de Terazaki para posterior captura do antígeno TNF α . Foi empregado o conjunto de reativos BIOTRA Tumor Necrosis Factor ELISA System (Amersham Pharmacia code RPN 2718[®]).

As amostras de plasma eram distribuídas em cada um dos orifícios da placa, em volumes de 50 μ l, a seguir eram incubadas e submetidas à revelação com anticorpos monoclonais anti-TNF α conjugados com peroxidase, os quais reagindo com peróxido de hidrogênio, desenvolvem cor mensurável em espectrofotômetro a

450nm de comprimento de onda. O desenvolvimento da cor indica a presença do TNF α na amostra, que será diretamente proporcional à leitura espectrofotométrica.

4.9.1 Materiais

- Placa de Terazaki sensibilizada com anticorpos monoclonais anti- TNF α de rato.
- Padrão de TNF α de rato
- Anticorpos monoclonais anti- TNF α de rato, conjugado à peroxidase
- Peróxido de hidrogênio a 30%
- Solução de ácido sulfúrico 10N.
- Solução tampão fosfatos pH 7,5
- Solução tampão citrato pH 5,0

4.9.2 Método

- Distribuir 50 μ l a amostra em cada orifício da placa de Terazaki.
 - Distribuir 50 μ l de cada diluição do TNF α padrão que contenham: 43pg/ml, 86pg/ml, 172pg/ml, 344pg/ml, 697pg/ml, 1.375pg/ml e 2.000pg/ml.
 - Incubar por 2 horas à temperatura ambiente.
 - Esvaziar o conteúdo da placa por inversão e lavar três vezes com tampão fosfatos pH7,5.
 - Distribuir 100 μ l do conjugado diluído a 1/3.000 (anticorpo monoclonal anti-TNF α conjugado à peroxidase), em cada um dos orifícios.
 - Incubar 1 hora à temperatura ambiente.
 - Esvaziar o conteúdo da placa por inversão e lavar três vezes com tampão fosfatos pH7,5.
 - Distribuir 20 μ l de peróxido de hidrogênio a 30%, em cada um dos orifícios.
 - Distribuir 10 μ l de Ortofenilienodiamino (50mg em 25ml de tampão citrato pH5,0) e incubar por 15 minutos.
 - Adicionar em cada orifício 10 μ l de ácido sulfúrico 10N
 - Ler a absorbância do conteúdo de cada orifício em espectrofotômetro a 450nm.
 - Interpolar as leituras dos padrões de TNF α de rato às leituras das amostras.
-

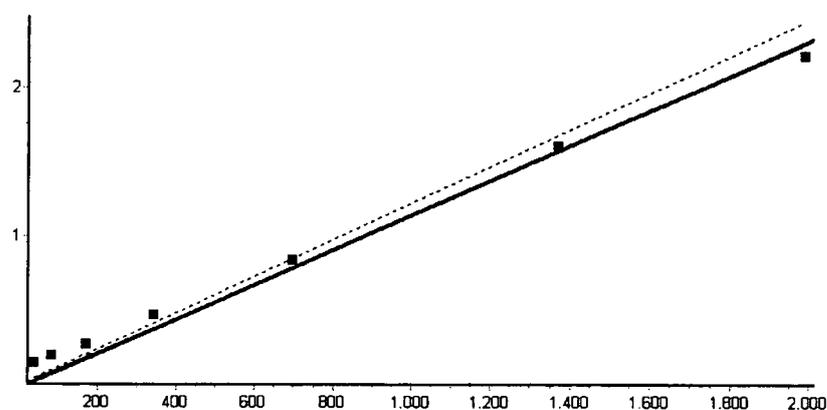
- Calcular por regressão linear a quantidade de $\text{TNF}\alpha$ presente nas amostras em picogramas/ml.

TABELA 4 - CALIBRAÇÃO DA SOLUÇÃO PADRÃO DE $\text{TNF}\alpha$

Concentração do Padrão de $\text{TNF}\alpha$ de rato em pg/ml	Tubo	Densidade Ótica a 450nm
Solução Tampão Fosfatos pH7,5	1	0,1
43	2	0,149
86	3	0,199
172	4	0,277
344	5	0,466
698	6	0,841
1.375	7	1,598
2.000	8	2,203

GRÁFICO 3 - REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DA CALIBRAÇÃO DO PADRÃO DE $\text{TNF}\alpha$:

**Densidade Ótica
a 450nm**



4.10 DOSAGEM DE C3

$\text{TNF}\alpha$ (pg/ml)

O teste de imunodifusão radial simples permite determinar a concentração de um antígeno em uma amostra de material biológico. Neste estudo aplicou-se a metodologia proposta por OUCHTERLONY (1958), na qual anti-soro específico (anti-C3 AMERSHAM PHARMACIA®) é incorporado na agarose a 1% que recobre uma placa de vidro. Em orifícios feitos na agarose, são adicionadas diferentes concentrações da amostra contendo o antígeno correspondente ao anti-soro (C3). A placa é então incubada por 48 horas na temperatura de 35°C, em câmara hermeticamente fechada. Durante a incubação ocorre a difusão do antígeno na

agarose, com a formação de complexos antígeno-anticorpo. Os complexos precipitam e formam um halo ao redor do orifício, que são revelados após fixação e coloração com azul de Comassie, correspondentes à complexação antígeno a ser determinado e anticorpo presente no anti-soro (figura 2).

Existe uma relação linear entre o diâmetro do halo e a concentração do antígeno. Com o uso de antígeno padronizado (C3 murino-AMERSHAM PHARMACIA®) de concentrações conhecidas pode-se fazer uma curva padrão, permitindo determinar a concentração em amostras desconhecidas.

FIGURA 2 - DEMONSTRATIVO DOS HALOS DE PRECIPITAÇÃO C3-ANTI-C3 (A) ESQUEMA, (B) COMPLEXOS ANTÍGENO-ANTICORPOS CORADOS PELO AZUL DE COMASSIE:

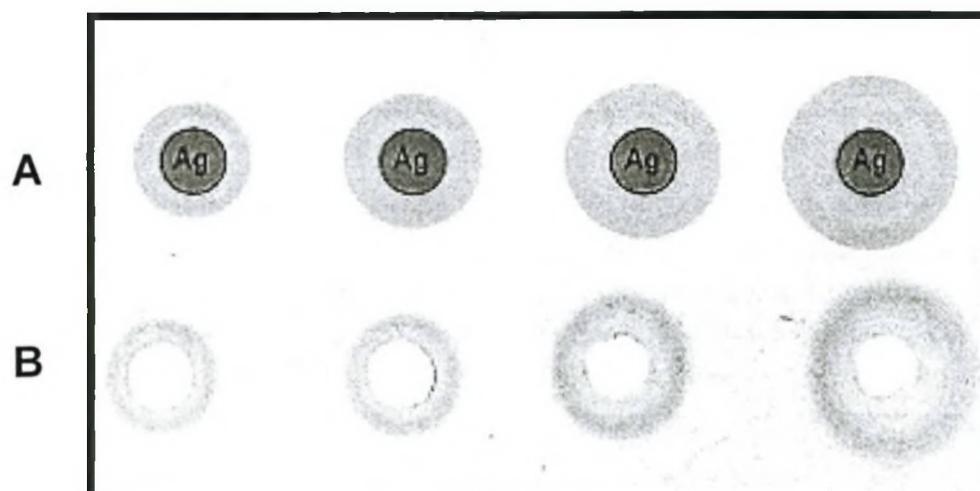
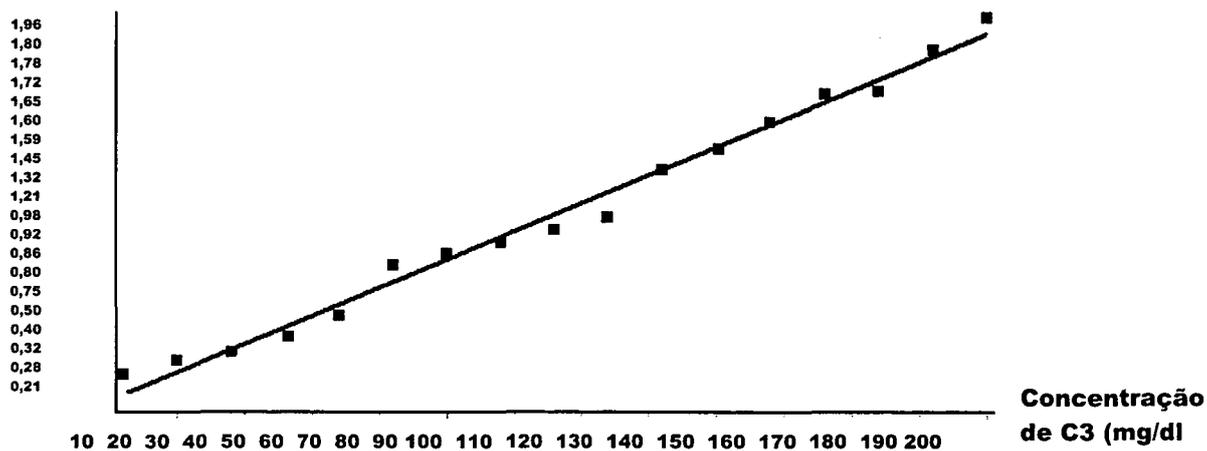


TABELA 5 - CALIBRAÇÃO DO PADRÃO DE C3

Diâmetro dos Halos (cm)	Concentrações (mg/dl)
0,21	10
0,28	20
0,32	30
0,40	40
0,50	50
0,75	60
0,80	70
0,86	80
0,92	90
0,98	100
1,21	110
1,32	120
1,45	130
1,59	140
1,60	150
1,65	160
1,72	170
1,78	180
1,80	190
1,96	200

GRÁFICO 4 - REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DA CALIBRAÇÃO DO PADRÃO DE C3³ E DOS DIÂMETROS DOS HALOS DE LEITURA :**Diâmetros dos halos (cm) frente ao anti-C3 a 1/125**

Após serem obtidos os halos da solução padrão de C3 com anti-soro anti-C3, as leituras foram submetidas à análise de regressão linear e calculado o coeficiente de correlação $(r)^2$, e então passou-se a análise dos soros dos animais.

4.10.1 Materiais utilizados

- Soro anti-C3 murino (AMERSHAM PHARMACIA[®])
- C3 murino (AMERSHAM PHARMACIA[®])
- Micropipetas Gilson de 100 e 1000 μ l
- Placas de Petri de vidro esterilizadas
- Agarose (SIGMA[®]), em solução a 1% em solução tampão Veronal (SIGMA[®])
- Solução tampão fosfatos (PBS) pH7,4.
- Solução de ácido tricloro-acético (MERCK[®]) a 10%
- Solução de azul de Comassie (SIGMA[®]) a 1%
- Solução descolorante (éter etílico 25%, clorofórmio 25% e ácido acético 50%)
- Paquímetro
- Estufa (FANEN[®]), regulada a 35°C \pm 1
- Câmara hermética plástica

4.10.2 Método

4.10.2.1 Calibração do método

- Preparar uma série de tubos contendo diluições do padrão de C3 (10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200 mg/dl) em solução tampão Veronal.
- Preparar diluições do anti-soro anti-C3 (1/5, 1/10, 1/25, 1/100, 1/125, 1/200) em solução tampão fosfatos (PBS) pH7,4.
- Fundir sete tubos contendo 15ml solução de agarose a 1%, aguardar resfriamento a 45°C, adicionar 1ml de cada uma das diluições do anti-soro e distribuir em placas de Petri. Preparar uma placa sem anti-soro.
- Após a solidificação da agarose, abrir 21 orifícios com instrumento adequado (vazador)
- Adicionar 20 μ l de cada uma das diluições do padrão de C3

³ Coeficiente de Correlação (r)= 0.9939.

-
- Incubar em estufa a 35°C em câmara hermética com algodão embebido em água, por 48 horas
 - Retirar as placas da incubação e cobrir com solução de ácido tricloro-acético por 10 minutos
 - Esvaziar as placas e cobrir com solução tampão fosfatos por 10 minutos
 - Esvaziar a placa e cobrir com solução de azul de Comassie a 1% por 1 hora
 - Esvaziar a placa e lavar com solução tampão fosfatos
 - Descolorir o excesso de corante com a solução específica até obter visualização perfeita dos halos (figura 1)
 - Medir os halos com paquímetro
 - Escolher a diluição do anti-soro que obteve os maiores halos e melhor coeficiente de correlação (r), neste estudo foi 1/125 (diluição padronizada)

4.10.2.2 Dosagem de C3 em amostras de soros dos ratos

- Preparar a diluição de uso do anti-soro anti-C3 (1/125) em solução tampão fosfatos (PBS) pH7,4.
 - Fundir tubos contendo 15ml solução de agarose a 1%, aguardar resfriamento a 45°C, adicionar 1ml de cada uma das diluições do anti-soro e distribuir em placas de Petri. Preparar uma placa sem anti-soro.
 - Após a solidificação da agarose, abrir 21 orifícios com instrumento adequado (vazador)
 - Adicionar 20µl de cada uma das diluições do soro dos animais, bem como do soro puro.
 - Incubar em estufa a 35°C em câmara hermética com algodão embebido em água, por 48 horas
 - Retirar as placas da incubação e cobrir com solução de ácido tricloro-acético por 10 minutos
 - Esvaziar as placas e cobrir com solução tampão fosfatos por 10 minutos
 - Esvaziar a placa e cobrir com solução de azul de Comassie a 1% por 1 hora
 - Esvaziar a placa e lavar com solução tampão fosfatos
-

-
- Decolorir o excesso de corante com a solução específica até obter visualização perfeita dos halos (figura 1)
 - Medir os halos com paquímetro

4.10.3 Interpretação dos resultados

As leituras dos diâmetros dos halos (em centímetros) obtidos foram interpoladas na curva de calibração pelo programa GraphPad Software e assim convertidos em mg/dl.

4.11 AVALIAÇÕES ESTATÍSTICAS

Após a obtenção dos resultados dos isolamentos de *Escherichia coli* e *Enterococcus faecalis* no sangue, baço, fígado e linfonodos mesentéricos, dosagem de TNF α e dosagem de endotoxina, estes foram tabulados conforme os grupos de ratos e calculados: valores médios, desvios-padrão, intervalo de confiança 95%.

Os resultados de porcentagem de TB, dosagem de TNF α , dosagem de endotoxina e avaliação da permeabilidade vascular obtidos no grupo controle foram comparados aos demais grupos pelo teste de ANOVA, sendo estabelecido $p < 0,05$ como limite de significância para a rejeição da hipótese nula de que não houvesse diferença estatística entre os grupos analisados e foram classificados como $p < 0,05 =$ significativo*, $p < 0,001 =$ muito significativo** e $p < 0,0001 =$ altamente significativo***.

Utilizou-se para este propósito o programa GraphPad Software (www.graphpad.com), adquirido e licenciado para uso por Ulrich Andreas Dietz e João Carlos Domingues Repka.

5.1 AVALIAÇÃO DA TRANSLOCAÇÃO BACTERIANA

Conforme o critério estabelecido na metodologia deste estudo, para considerar positiva a ocorrência de TB, devem ser isoladas as bactérias indicadoras de contaminação com flora intestinal, a *Escherichia coli* e o *Enterococcus faecalis*, em amostras de vísceras abdominais normalmente não colonizadas por elas, o que indica sua translocação do trato gastrointestinal, mediante o estímulo induzido. Como controle deste processo, foram investigadas as presenças de *Escherichia coli* e *Enterococcus faecalis* no segmento intestinal de todos os ratos e teve como resultado 100% de presença de ambas as bactérias como flora normal. Os resultados da avaliação de TB são apresentados de duas formas. Em médias e desvio-padrão das porcentagens de ocorrências e m LNM, fígado, sangue e baço, conforme os grupos de animais na tabela 6. Também são apresentados por médias de TB em cada víscera e sangue.

Entre os animais que receberam 2mg/100g zymosan, observou-se que em média, o sub-grupo tratado com solução salina isotônica, apresentou maiores níveis de TB ($95\% \pm 8,66$). Estes resultados quando comparados aos do sub-grupo tratado com glutamina ($77,5\% \pm 14,79$), pelo teste de ANOVA, não demonstraram significância estatística entre ambos ($p=0,2365$). Entre os animais que receberam 1mg/100g de zymosan, observou-se que em média, no sub-grupo tratado com solução salina isotônica ocorreram maiores níveis de TB ($85\% \pm 20,62$). Estes resultados quando comparados aos do sub-grupo tratado com glutamina ($50\% \pm 41,23$), pelo teste de ANOVA, não apresentaram significância estatística entre ambos ($p=0,3085$).

TABELA 6 - PORCENTAGEM DE OCORRÊNCIA DE TB, CONFORME GRUPOS (ZYMOZAN NAS DOSES DE 1mg E 2 mg OU SSI) E TRATAMENTOS COM GLUTAMINA OU SOLUÇÃO SALINA ISOTÔNICA

Amostras	Grupos					
	Zymosan				SSI	
	Sub-grupo 1mg/100g		Sub-grupo 2mg/100g		GLN (%)	SSI (%)
	GLN (%)	SSI (%)	GLN (%)	SSI (%)		
LNM	100	100	100	100	0	0
Fígado	20	90	80	100	0	0
Sangue	0	50	60	100	0	0
Baço	80	100	70	80	0	0
Média	50	85	77,5	95	0	0
Desvio Padrão	41,23	20,62	14,79	8,66	0	0

Legenda – GLN: glutamina, SSI: solução salina isotônica

TABELA 7 - AVALIAÇÕES ESTATÍSTICAS DAS PORCENTAGENS DE TRANSLOCAÇÃO BACTERIANA CONFORME OS GRUPOS ESTUDADOS :

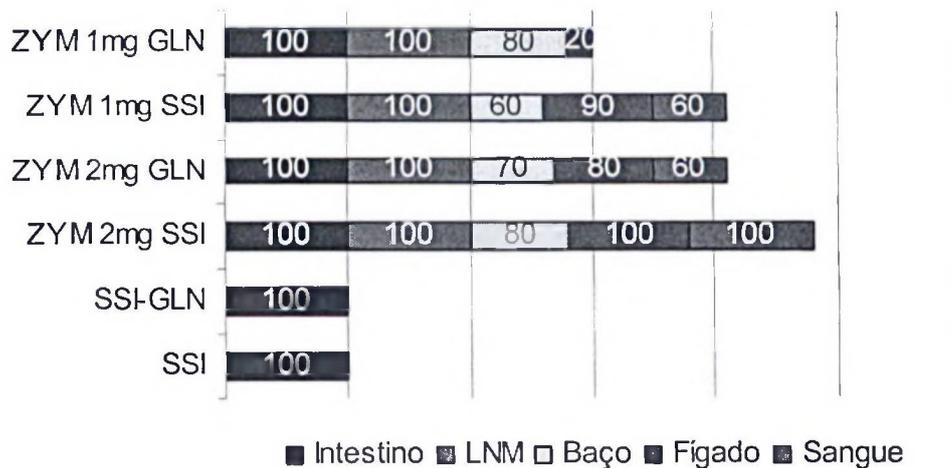
Grupos comparados	Significância	Valor de p
ZYM 2mg GLN X GLN	**	p<0,01
ZYM 2mg GLN X SSI	**	p<0,01
ZYM 1mg SSI X GLN	***	p<0,001
ZYM 1mg SSI X SSI	***	p<0,001
ZYM 2mg SSI X GLN	***	p<0,001
ZYM 2mg SSI X SSI	***	p<0,001
ZYM 1mg GLN X ZYM 1mg SSI	ns	p>0,05
ZYM 1mg GLN X ZYM 2mg GLN	ns	p>0,05
ZYM 1mg GLN X ZYM 2mg SSI	ns	p>0,05
ZYM 1mg GLN X GLN	ns	p>0,05
ZYM 1mg GLN X SSI	ns	p>0,05
ZYM 1mg SSI X ZYM 2mg GLN	ns	p>0,05
ZYM 1mg SSI X ZYM 2mg SSI	ns	p>0,05
ZYM 2mg GLN X ZYM 2mg SSI	ns	p>0,05
GLN X SSI	ns	p>0,05

Legenda : ** = diferença muito significativa *** = diferença altamente significativa;
ns = não significativa

Através do teste de ANOVA, foram procedidas as comparações entre os todos os grupos que não receberam zymosan e os demais grupos inoculados com 1mg/100g e 2mg/100g, bem como entre estes grupos (tabela 7). Foram observadas diferenças significantes entre os grupos ZYM 2mg GLN X GLN e ZYM 2mg GLN X SSI. Entre os grupos ZYM 1mg SSI X GLN, ZYM 1mg SSI X SSI, ZYM 2mg SSI X GLN e ZYM 2mg SSI X SSI foram observadas diferenças altamente significantes.

O gráfico 5 demonstra o comportamento dos grupos de ratos induzidos com reação inflamatória sistêmica pelo zymosan, conforme tratamento ou não com glutamina. Observa-se que nos grupos que não receberam inoculação a indução inflamatória (SSI e SSI-GLN), não ocorreu translocação bacteriana.

GRÁFICO 5 - DEMONSTRATIVO DAS PORCENTAGENS DE ISOLAMENTO SIMULTÂNEO DE *Escherichia coli* e *Enterococcus faecalis* EM AMOSTRAS DE LNM, FÍGADO, SANGUE, BAÇO E INTESTINOS, CONFORME SUB-GRUPOS ESTUDADOS



O gráfico acima demonstra que em 100% dos animais de todos os grupos, controles (SSI e SSI-GLN) e inoculados com ZYM, tratados ou não pela GLN, foram isoladas as bactérias indicadoras *Escherichia coli* e *Enterococcus faecalis* nos intestinos. Esta determinação foi feita como controle, para avaliar se efetivamente estas bactérias estavam presentes em suas microbiotas intestinais.

As bactérias indicadoras foram também isoladas em 100% das amostras de linfonodos mesentéricos, nos grupos submetidos à inoculação com ZYM, independentemente de tratamento com GLN, contudo, não foram isoladas nos grupos LNM de ratos dos grupos controle.

Os resultados das porcentagens de isolamentos em cada uma das vísceras estudadas foram também comparados estatisticamente :

GRÁFICO 6 - DEMONSTRATIVO DAS PORCENTAGENS DE ISOLAMENTO SIMULTÂNEO DE *Escherichia coli* e *Enterococcus faecalis* EM AMOSTRAS DE FÍGADO

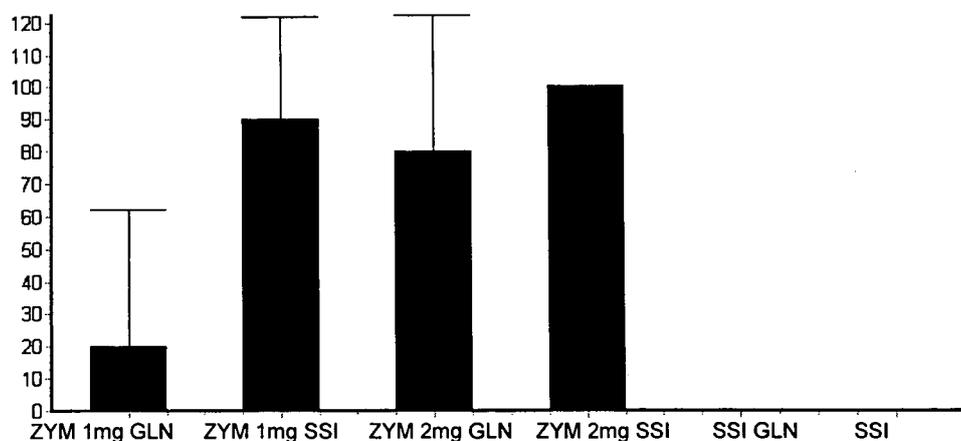


TABELA 8 - AVALIAÇÕES ESTATÍSTICAS PELO MÉTODO DE ANOVA DAS PORCENTAGENS DE TRANSLOCAÇÃO BACTERIANA PARA O FÍGADO

Grupos comparados	Significância	Valor de p
ZYM 1mg GLN X ZYM 1mg SSI	***	p<0,001
ZYM 1mg SSI X SSI	***	p<0,001
ZYM 2mg GLN X GLN	***	p<0,001
ZYM 2mg GLN X SSI	***	p<0,001
ZYM 2mg SSI X GLN	***	p<0,001
ZYM 2mg SSI X SSI	***	p<0,001
ZYM 1mg GLN X GLN	ns	p>0,05
ZYM 1mg GLN X SSI	ns	p>0,05
ZYM 2mg GLN X ZYM 2mg SSI	ns	p>0,05

Legenda : ** = diferença muito significativa *** = diferença altamente significativa;
ns = não significativa

Nas amostras de fígado, não houve TB nos animais dos grupos controles, porém, nos animais inoculados com zymosan a TB ocorreu em 100% no sub-grupo ZYM 2mg SSI, em 80% no ZYM 2mg GLN, em 90% dos animais do grupo ZYM 1mg SSI e em 20% no grupo ZYM 1mg GLN. Quando comparadas as porcentagens nesta víscera observaram-se de forma destacada diferenças estatisticamente significantes entre os grupos ZYM 1mg GLN X ZYM 1mg SSI (tabela 8).

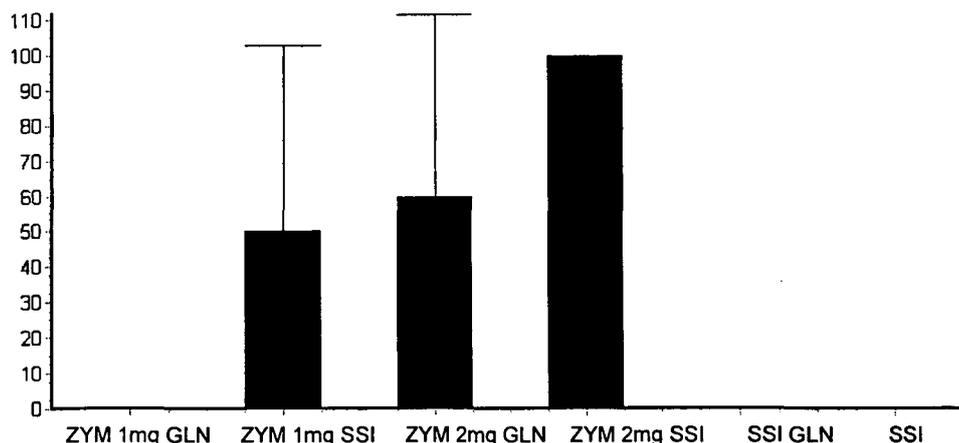
GRÁFICO 7 - DEMONSTRATIVO DAS PORCENTAGENS DE ISOLAMENTO SIMULTÂNEO DE *Escherichia coli* e *Enterococcus faecalis* EM AMOSTRAS DE SANGUE

TABELA 9 - AVALIAÇÕES ESTATÍSTICAS PELO MÉTODO DE ANOVA DAS PORCENTAGENS DE TRANSLOCAÇÃO BACTERIANA PARA O SANGUE

Grupos comparados	Significância	Valor de p
ZYM 1mg GLN X ZYM 1mg SSI	**	p<0,01
ZYM 1mg GLN X GLN	ns	p>0,05
ZYM 1mg GLN X SSI	ns	p>0,05
ZYM 1mg SSI X GLN	**	p<0,01
ZYM 2mg GLN X ZYM 2mg SSI	*	p<0,05
ZYM 2mg GLN X GLN	***	p<0,001
ZYM 2mg GLN X SSI	***	p<0,001
ZYM 2mg SSI X GLN	***	p<0,001

Legenda : * diferença significativa; ** = diferença muito significativa; *** = diferença altamente significativa; ns = não significativa

Nas hemoculturas as bactérias indicadoras de TB foram isoladas em 100% dos animais do sub-grupo ZYM 2mg SSI, em 60% do sub-grupo ZYM 2mg GLN e em 60% do sub-grupo ZYM 1mg SSI. Não foram detectadas nas amostras de sangue dos grupos controle e do sub-grupo ZYM 1mg GLN. Quando comparadas as porcentagens de TB no sangue, observaram-se de forma destacada diferenças estatisticamente significantes entre os grupos ZYM 1mg GLN X ZYM 1mg SSI e ZYM 2mg GLN X ZYM 2mg SSI, (tabela 9).

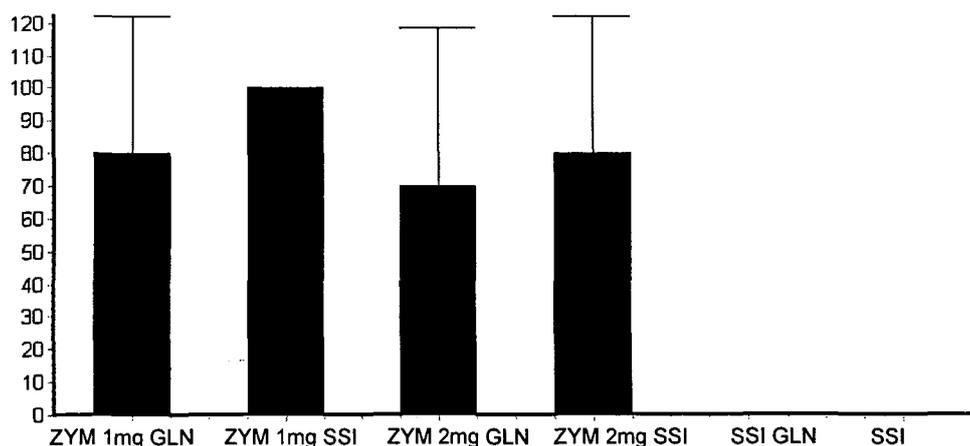
GRÁFICO 8 - DEMONSTRATIVO DAS PORCENTAGENS DE ISOLAMENTO SIMULTÂNEO DE *Escherichia coli* e *Enterococcus faecalis* EM AMOSTRAS DE BAÇO

TABELA 10 - AVALIAÇÕES ESTATÍSTICAS PELO MÉTODO DE ANOVA DAS PORCENTAGENS DE TRANSLOCAÇÃO BACTERIANA PARA O BAÇO

Grupos comparados	Significância	Valor de p
ZYM 1mg GLN X GLN	***	p<0,001
ZYM 1mg GLN X SSI	***	p<0,001
ZYM 1mg SSI X GLN	***	p<0,001
ZYM 1mg SSI X SSI	***	p<0,001
ZYM 2mg GLN X GLN	***	p<0,001
ZYM 2mg GLN X SSI	***	p<0,001
ZYM 2mg SSI X GLN	***	p<0,001
ZYM 2mg SSI X SSI	***	p<0,001
ZYM 1mg GLN X ZYM 1mg SSI	ns	p>0,05
ZYM 2mg GLN X ZYM 2mg SSI	ns	p>0,05

Legenda : *** = diferença altamente significante; ns = não significante

Nas amostras de baço, as bactérias indicadoras não foram isoladas dos animais controles (grupos SSI e SSI-GLN). Nos animais inoculados com ZYM, houve isolamento das bactérias indicadoras de TB nesta víscera em todos os grupos, havendo maiores níveis (80%) nos grupos ZYM 2mg SSI e ZYM 1mg GLN, seguindo-se de 70% no grupo ZYM 2mg GLN e ZYM 1mg SSI, conforme a tabela 10, não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes entre os grupos ZYM 1mg GLN X ZYM 1mg SSI e ZYM 2mg GLN X ZYM 2mg SSI.

5.2 DOSAGEM DE ENDOTOXINAS

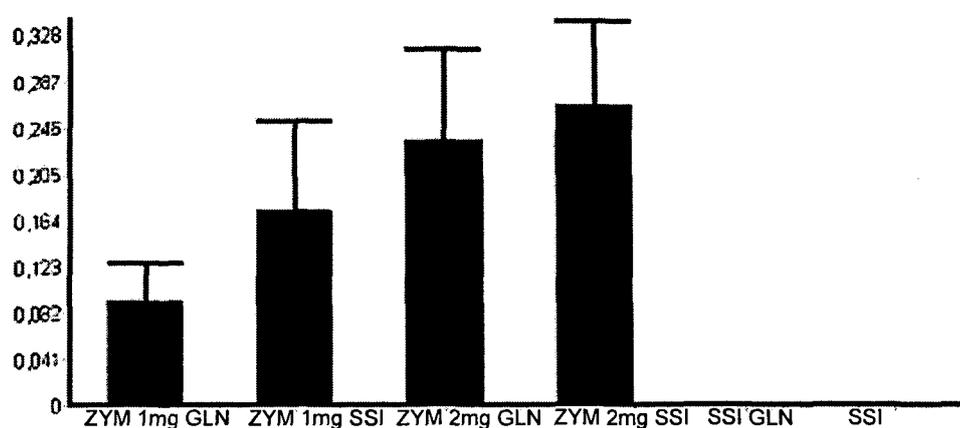
As dosagens de endotoxinas séricas circulantes estão demonstradas no gráfico 9. Observa-se que os maiores níveis foram obtidos nos animais que receberam a inoculação de 2mg de zymosan e não foram suplementados com GLN ($0,2656 \pm 0,07547\text{UE/ml}$), estes resultados não diferiram significativamente ($p>0,05$) dos resultados obtidos nos animais do mesmo grupo mas que foram suplementados com glutamina ($0,2344 \pm 0,08235\text{UE/ml}$).

Entre os animais do grupo 1mg de zymosan, houve diferença estatisticamente significativa ($p<0,05$) entre os sub-grupos suplementados e não suplementados com GLN, respectivamente $0,09374 \pm 0,03294 \text{ UE/ml}$ e $0,1719 \pm 0,08068 \text{ UE/ml}$.

Nos animais não inoculados com zymosan não foram detectados níveis séricos de endotoxinas. As avaliações estatísticas entre todos os grupos estão demonstradas na tabela 11.

GRÁFICO 9 - GRÁFICO DEMONSTRATIVO DAS MÉDIAS E DESVIOS-PADRÃO DAS DOSAGENS DE ENDOTOXINAS CONFORME OS SUB-GRUPOS ESTUDADOS

Endotoxinas (UE/ml)



Sub-grupos de ratos

TABELA 11 - AVALIAÇÕES ESTATÍSTICAS PELO MÉTODO DE ANOVA DAS DOSAGENS DE ENDOTOXINA

Grupos comparados	Significância	Valor de p
ZYM 1mg GLN X ZYM 1mg SSI	*	p<0,05
ZYM 1mg GLN X GLN	**	p<0,01
ZYM 1mg GLN X SSI	**	p<0,01
ZYM 1mg SSI X ZYM 2mg SSI	**	p<0,01
ZYM 1mg GLN X ZYM 2mg GLN	***	p<0,001
ZYM 1mg GLN X ZYM 2mg SSI	***	p<0,001
ZYM 1mg SSI X GLN	***	p<0,001
ZYM 1mg SSI X SSI	***	p<0,001
ZYM 2mg GLN X GLN	***	p<0,001
ZYM 2mg GLN X SSI	***	p<0,001
ZYM 2mg SSI X GLN	***	p<0,001
ZYM 2mg SSI X SSI	***	p<0,001
ZYM 1mg SSI X ZYM 2mg GLN	ns	p>0,05
ZYM 2mg GLN X ZYM 2mg SSI	ns	p>0,05
GLN X SSI	ns	p>0,05

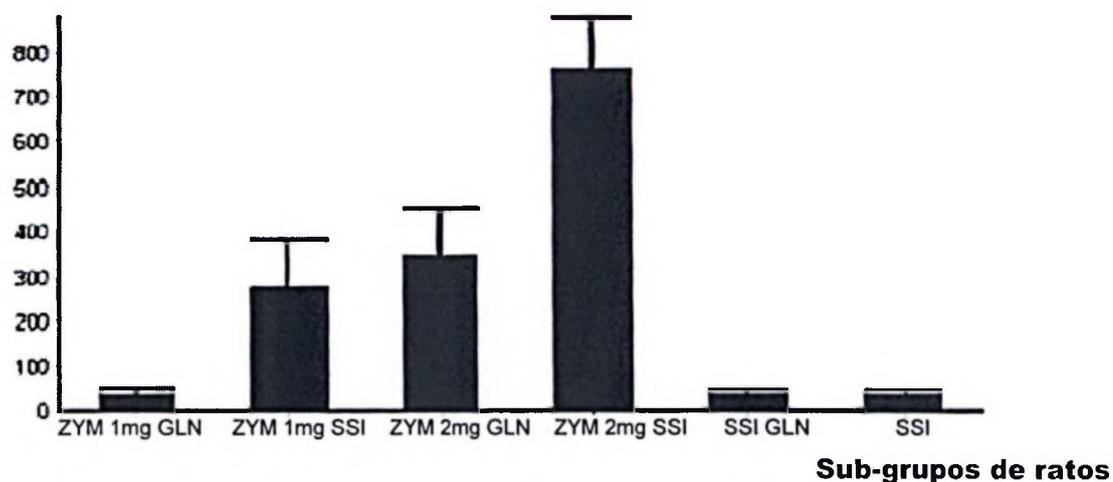
Legenda : ns = não significante, ** = diferença muito significante *** = diferença altamente significante;

5.3 DOSAGEM DE TNF α

As médias e desvios-padrão das dosagens de TNF α estão demonstradas no gráfico 10. Observa-se que os maiores níveis foram obtidos nos animais que receberam a inoculação de 2mg de zymosan e não foram suplementados com GLN ($0,76246 \pm 113,98$ pg/ml), estes resultados diferiram significativamente ($p < 0,001$) dos resultados obtidos nos animais do mesmo grupo mas que foram suplementados com glutamina ($347,47 \pm 109,46$ pg/ml).

Entre os animais do grupo 1 mg de zymosan, houve também diferença estatisticamente significante ($p < 0,001$) entre os sub-grupos suplementados e não suplementados com GLN, respectivamente $37,658 \pm 6,643$ pg/ml e $275,90 \pm 103,42$ pg/ml.

Nos animais não inoculados com zymosan os níveis séricos de TNF α foram de $33,64 \pm 7,75$ pg/ml (suplementados com GLN) e $35,42 \pm 6,714$ pg/ml (não suplementados). Não observou-se diferença estatisticamente significante ($p > 0,05$) entre os grupos não tratado com zymosan e suplementado com GLN e o grupo que recebeu 1mg de zymosan com posterior suplementação com GLN. As avaliações estatísticas entre todos os grupos estão demonstradas na tabela 12.

GRÁFICO 10 - GRÁFICO DEMONSTRATIVO DAS MÉDIAS E DESVIOS-PADRÃO DAS DOSAGENS DE TNF α CONFORME OS SUB-GRUPOS ESTUDADOSTNF α (pg/ml)TABELA 12 - AVALIAÇÕES ESTATÍSTICAS PELO MÉTODO DE ANOVA DAS DOSAGENS DE TNF α

Grupos comparados	Significância	Valor de p
ZYM 1mg GLN vs ZYM 1mg SSI	***	p<0,001
ZYM 1mg GLN vs ZYM 2mg GLN	***	p<0,001
ZYM 1mg GLN vs ZYM 2mg SSI	***	p<0,001
ZYM 1mg SSI vs ZYM 2mg SSI	***	p<0,001
ZYM 1mg SSI vs GLN	***	p<0,001
ZYM 1mg SSI vs SSI	***	p<0,001
ZYM 2mg GLN vs ZYM 2mg SSI	***	p<0,001
ZYM 2mg GLN vs GLN	***	p<0,001
ZYM 2mg GLN vs SSI	***	p<0,001
ZYM 2mg SSI vs GLN	***	p<0,001
ZYM 2mg SSI vs SSI	***	p<0,001
ZYM 1mg GLN vs GLN	ns	p>0,05
ZYM 1mg GLN vs SSI	ns	p>0,05
ZYM 1mg SSI vs ZYM 2mg GLN	ns	p>0,05
GLN vs SSI	ns	p>0,05

Legenda : ns = não significante, ** = diferença muito significante *** = diferença altamente significante;

5.4 DOSAGEM DE C3

Os resultados das médias e desvios-padrão das dosagens de C3 estão demonstrados no gráfico 9. Os valores considerados de referência para estas dosagens foram os obtidos no grupo SSI (inoculados com solução salina isotônica) ficando entre 136,52 a 163,48 mg/dl (intervalo de confiança 95% obtido pelo teste de ANOVA), demonstrados na tabela 13 e avaliação estatística entre os grupos, demonstrada na tabela 14.

TABELA 13- MÉDIAS E DESVIOS-PADRÕES DOS RESULTADOS (mg/dl) DA AVALIAÇÃO DE C3

Grupo	N	Média	Desvio Padrão
ZYM 1mg GLN	10	105,70	37,080
ZYM 1mg SSI	10	101,40	35,793
ZYM 2mg GLN	10	56,800	29,442
ZYM 2mg SSI	10	68,600	18,464
SSI GLN	10	150,50	20,046
SSI	10	150,00	18,838

Observaram-se as seguintes avaliações estatísticas:

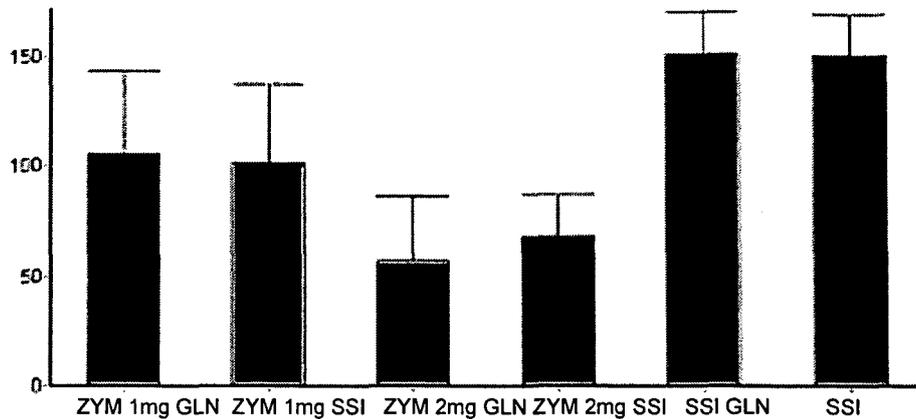
TABELA 14 - AVALIAÇÕES ESTATÍSTICAS OBTIDAS PELO TESTE DE ANOVA

Grupos comparados	Significância	Valor de p
ZYM 1 mg GLN X ZYM 1 mg SSI	ns	p>0,05
ZYM 1 mg GLN X ZYM 2 mg GLN	**	p<0,01
ZYM 1 mg GLN X ZYM 2 mg SSI	*	p<0,05
ZYM 1 mg GLN X SSI GLN	**	p<0,01
ZYM 1 mg GLN X SSI	**	p<0,01
ZYM 1 mg SSI X ZYM 2 mg GLN	**	p<0,01
ZYM 1 mg SSI X ZYM 2 mg SSI	**	p<0,01
ZYM 1 mg SSI X SSI GLN	**	p<0,01
ZYM 1 mg SSI X SSI	**	p<0,01
ZYM 2 mg GLN X ZYM 2 mg SSI	ns	p>0,05
ZYM 2 mg GLN X SSI GLN	***	p<0,001
ZYM 2 mg GLN X SSI	***	p<0,001
ZYM 2 mg SSI X SSI GLN	***	p<0,001
ZYM 2 mg SSI X SSI	***	p<0,001
GLN X SSI	ns	p>0,05

Legenda : ns = não significante, ** = diferença muito significante *** = diferença altamente significante;

GRÁFICO 11 - GRÁFICO DEMONSTRATIVO DAS MÉDIAS E DESVIOS-PADRÃO DAS DOSAGENS DE C3 CONFORME OS SUB-GRUPOS ESTUDADOS

C3 (mg/dl)



Sub-grupos de ratos

Conforme a tabela 14, as dosagens de C3 do grupo SSI (controle) diferiram significativamente dos grupos: ZYM 1 mg GLN ($p < 0,01$), ZYM 1 mg SSI ($p < 0,01$), ZYM 2 mg GLN SSI ($p < 0,001$), ZYM 2 mg SSI ($p < 0,001$).

Entre os grupos (ZYM 2 mg GLN x ZYM 2 mg SSI, ZYM 1 mg SSI x ZYM 2 mg SSI e ZYM 1 mg GLN x ZYM 1 mg SSI), que receberam estímulo inflamatório pelo zymosan, não houve significância estatística ($p > 0,05$).

5.5 AVALIAÇÃO DA PERMEABILIDADE VASCULAR

O comportamento da permeabilidade vascular entre os grupos de ratos estudados estão representadas através das médias e desvios-padrão obtidos entre os grupos, no gráfico 9. A permeabilidade vascular normal dos ratos foi representada pelas dosagens de azul de Evans obtidas nos ratos do grupo SSI ($48,70 \pm 5,27 \mu\text{g}$ de azul de Evans/mg de amostra intestinal).

TABELA 15 - MÉDIAS E DESVIOS-PADRÕES DOS RESULTADOS (μg de Azul de Evans/mg de amostra intestinal) DA AVALIAÇÃO DA PERMEABILIDADE VASCULAR INTESTINAL

Grupo	N	Média	Desvio Padrão
GLN	10	49,530	5,787
SSI	10	48,700	5,272
ZYM 1 mg SSI	10	81,825	12,890
ZYM 1 mg GLN	10	52,066	5,248
ZYM 2 mg GLN	10	87,235	13,915
ZYM 2 mg SSI	10	123,15	21,291

Observaram-se as seguintes avaliações estatísticas:

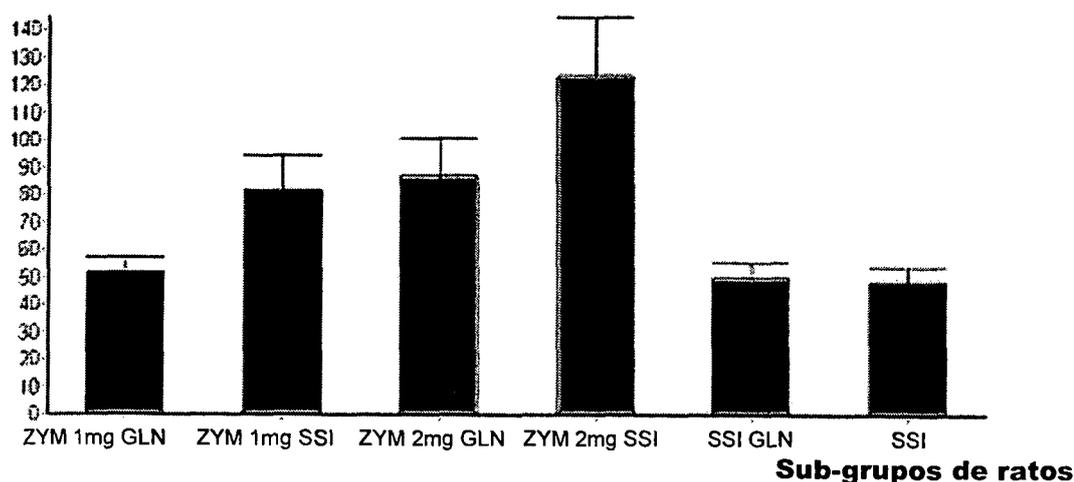
TABELA 16 - AVALIAÇÕES ESTATÍSTICAS PERMEABILIDADE VASCULAR INTESTINAL, OBTIDAS PELO TESTE DE ANOVA

Grupos comparados	Significância	Valor de p
ZYM 1 mg GLN x ZYM 1 mg SSI	***	p<0,001
ZYM 1 mg GLN x ZYM 2 mg GLN	***	p<0,001
ZYM 1 mg GLN x ZYM 2 mg SSI	***	p<0,001
ZYM 1 mg SSI x ZYM 2 mg SSI	***	p<0,001
ZYM 1 mg SSI x SSI GLN	***	p<0,001
ZYM 2 mg GLN X SSI GLN	***	p<0,001
ZYM 2 mg GLN X SSI	***	p<0,001
ZYM 2 mg SSI X SSI GLN	***	p<0,001
ZYM 2 mg SSI X SSI	***	p<0,001
ZYM 1 mg SSI X SSI	***	p<0,001
ZYM 2 mg GLN X ZYM 2 mg SSI	***	p<0,001
ZYM 1 mg GLN x SSI GLN	ns	p>0,05
ZYM 1 mg GLN x SSI	ns	p>0,05
ZYM 1 mg SSI x ZYM 2 mg GLN	ns	p>0,05
SSI GLN X SSI	ns	p>0,05

Legenda : ** = diferença muito significativa *** = diferença altamente significativa;
ns = não significativa

GRÁFICO 12 - GRÁFICO DEMONSTRATIVO DO COMPORTAMENTO DA PERMEABILIDADE VASCULAR INTESTINAL REPRESENTADA PELAS MÉDIAS E DESVIOS-PADRÃO DAS DOSAGENS DE AZUL DE EVANS EM AMOSTRAS INTESTINAIS CONFORME OS SUB-GRUPOS ESTUDADOS

Azul de Evans ($\mu\text{g}/\text{mg}$ da amostra)



No presente estudo, observaram-se níveis médios diferentes de TB, indicados pela porcentagem de órgãos infectados por *E.coli* e *Enterococcus faecalis* (gráfico 5 e tabela 6), em função do estímulo inflamatório induzido (1mg ou 2mg/100g) de zymosan, porém sem significância estatística entre as médias e desvios padrões de TB em cada grupo (tabela 7). Quando foram comparadas as médias e desvios padrões separadamente, por vísceras, foram observadas diferenças estatisticamente significantes entre estas médias para os grupos suplementados e não suplementados pela GLN. Nas amostras de fígado (gráfico 6 e tabela 8), a diminuição da TB somente foi observada entre os sub-grupos que receberam indução inflamatória de 1mg de ZYM ($p < 0,001$). No sub-grupo 2mg de ZYM não houve diferença significativa entre os grupos suplementados ou não com GLN. Esta ocorrência pode ter sido ocasionada em função da elevada magnitude da reação inflamatória sistêmica, induzida pela dose de 2mg de ZYM.

Nas amostras de sangue (gráfico 7 e tabela 9), foram observadas diminuições significantes entre os grupos suplementados com GLN entre os grupos que receberam 1mg e 2mg de ZYM.

Ao serem analisados os índices de TB isoladamente por vísceras analisadas, verificou-se que em referência às amostras de baço, não foram observadas diminuições nos níveis de TB entre os sub-grupos estudados, caberia a este respeito salientar a função do baço como captador de agentes circulantes estranhos ao organismo, o que levaria a questionar a diferenciação entre a captura esplênica de bactérias circulantes ou TB (tabela 10).

Em comparação aos controles (tabela 7 - grupos não inoculados com zymosan: ZYM e SSI), os maiores níveis de TB ($95 \pm 8,66\%$) foram detectados nos ratos que receberam 2mg/100g de zymosan sem suplementação com GLN e que apresentaram também os maiores níveis séricos de endotoxina ($0,2656 \pm 0,08235$ UE/ml), $\text{TNF}\alpha$ ($0,76246 \pm 113,98$ pg/ml), maior aumento de permeabilidade vascular ($123,15 \pm 21,29$ μg de azul de Evans/mg) e menores níveis séricos de C3. No presente estudo não ocorreram óbitos dos animais de qualquer grupo estudado, contudo foram observadas mudanças comportamentais, diminuição de deambulação e prostração nos ratos inoculados com zymosan durante os cinco dias do estudo.

Durante a reação inflamatória sistêmica, os intestinos, como órgãos de choque, parecem ser os primeiros a se alterarem entre os órgãos envolvidos. A

translocação bacteriana do trato intestinal, ou seja, o “intestino em choque” representa o “gatilho” indutor da falência orgânica (DEITCH, BERG e SPECIAN, 1987).

Neste contexto, o fator mais proeminente é a endotoxina (LPS) de bactérias Gram-negativas, a qual também exacerba a ativação de sistemas imunológicos celular e humoral, pois a fase hiperdinâmica pós-trauma em humanos, comumente inicia entre três a cinco dias é principalmente causada por bacteremia e/ou endotoxemia. A função dos macrófagos tem impacto maior nesta fase tardia, ou da falência de órgãos e o principal mediador celular do efeito letal da endotoxina parece ser a caquetina ou fator de necrose tumoral α , que é secretado por estas células, em resposta ao LPS. As citocinas derivadas de macrófagos ativados pelo LPS induzem as células endoteliais para o aumento de adesão de PMN. O LPS também é um importante indutor da coagulação intravascular disseminada (CIVD), associado à ativação de células endoteliais, induzindo micro-tromboses, sendo este o efeito principal para a falha de múltiplos órgãos. Assim sendo, pode-se dizer que a lesão celular levando à morte celular em vários órgãos, causada pelo TNF α é pré-condição para ambos, anterior e posterior falha de órgãos, conhecida como síndrome da falência de múltiplos órgãos (KNOBEL, 1998).

6.1. O CONSUMO DE C3

A avaliação de C3 neste estudo baseou-se no trabalho de DEITCH e colaboradores (1992), que estudaram a relação entre sobrevivência, sépsis de origem intestinal e translocação bacteriana, num modelo experimental de reação inflamatória sistêmica, induzida pelo zymosan. Evidenciaram muitos fatores incluindo inflamação não controlada, falência de barreira intestinal e sépsis no desenvolvimento de falência de múltiplos órgãos (FMO). Ocorreram em todos os animais a ativação do sistema complemento com diminuição sistêmica do componente C3. Concluíram que o zymosan induziu falha de barreira intestinal e infecção sistêmica dose dependente e também que havia relação entre a TB e sépsis de origem intestinal dependente da magnitude da indução do fenômeno inflamatório.

A ativação do sistema complemento é avaliada pela dosagem de seus componentes ou da prova da atividade hemolítica (CH50). Entre os componentes, o que mais se utiliza como indicador de ativação é o C3 (ativado ou não), porque é o centro da cascata de ativação por qualquer uma das vias (clássica, alterna ou das lectinas). A sua mensuração é útil na avaliação do grau de atividade de uma doença, assim como a resposta ao tratamento, reflete o balanço entre o complemento sintetizado e o que é consumido, tanto na ligação de antígenos com anticorpos como em estados catabólicos. Em condições inflamatórias, os componentes do sistema complemento têm comportamento de reagentes de fase aguda, podendo, antes de iniciar o consumo, ter um nível aumentado. Com isto, o valor final após o consumo "cai para um valor normal", podendo causar falsa impressão de que não houve consumo (KIRSCHFINK, 1997).

Desta forma poder-se-ia justificar os resultados obtidos neste estudo, pois ao maior estímulo inflamatório utilizado, 2mg/100g de zymosan, correlacionaram-se os mais elevados resultados de permeabilidade vascular (tabela 9), conseqüente ao processo inflamatório induzido, conforme descrito por ABBAS e ABUL (2000), com significativo consumo de C3 da circulação (tabela 13). Quanto ao estímulo inflamatório com 1mg/100g de zymosan, verificaram-se menores níveis de consumo do C3, contudo, sem diferenças estatisticamente significantes (tabela 14).

Nos animais que não sofreram estimulação inflamatória (grupos SSI e SSI GLN), não houve diferenças estatisticamente significantes, evidenciando que a GLN não altera a ativação do sistema complemento. Contudo, ao serem comparados os resultados dos grupos ativados pelo zymosan, houve consumo de C3, compatível com a evolução de quadros de reação inflamatória sistêmica (tabela 14).

Estes resultados sugerem que a inoculação de zymosan nas doses de 1 e 2mg/100g, induzem reação inflamatória sistêmica com acometimento inflamatório intestinal. Entre as doses estudadas houve diferença estatisticamente significativa tanto na permeabilidade vascular, quanto no consumo de C3. No que diz respeito à ação da glutamina, esta não ofereceu proteção à ativação e consumo de C3.

STEINBERG e colaboradores, (1989), ao observarem a falta de critério que permitisse a definição da síndrome de falência de múltiplos órgãos, incluindo pulmões, fígado, rins e disfunção da barreira intestinal simultaneamente e, sobretudo, a ausência de mudanças histopatológicas intestinais características que

pudessem auxiliar a elucidação daqueles casos, conceberam um modelo experimental com zymosan em ratos, que reproduzia a fisiopatologia e a histopatologia da síndrome de falência de múltiplos órgãos. Os animais que receberam zymosan desenvolveram hipoxia, diminuição do clearance da creatinina, diminuição da atividade do citocromo P450, de C3 circulante e também na atividade da arginina-hidroxilase. Observaram a ocorrência sobreposta de TB para pulmões, fígado, rins dos animais que receberam zymosan com mudanças histológicas destas vísceras, evidenciando edema e aumento dos calibres de vasos. Concluíram que o modelo preencheu os critérios para estudo da síndrome de falência de múltiplos órgãos.

SCHLAG e colaboradores (1991), observaram que lesões em órgãos ocorridas após traumas múltiplos e choque, são exemplos típicos de inflamação de origem não infecciosa, provocadas pela ativação de vários mediadores de ambos os sistemas celular e humoral. Anafilotoxinas (C3a e C5a) e a síndrome de baixo fluxo, durante a fase de choque, tributam para o aumento da marginação vascular de PMN, os quais por sua vez, facilitam influxo de leucócitos nos pulmões e promovem a infiltração massiva de PMN, liberação de radicais livres de oxigênio, proteinases, eicosanóides e fator agregador de plaquetas. Este conjunto de eventos está associado à ocorrência de lesão de células endoteliais, especialmente nos pulmões. Estes autores enfatizam que após a ativação do sistema complemento, ocorre a aderência de PMN no endotélio e estes desenvolvem um microambiente com altas concentrações de enzimas proteolíticas e radicais livres de oxigênio, os quais exercem efeitos deletérios na membrana celular. Esta injúria na membrana celular endotelial leva ao aumento da permeabilidade vascular e edema celular. Somente quando o trauma é severo é que ocorre a falência precoce do órgão, o qual neste estágio pode ser denominado de inflamação não bacteriana.

6.2. A PERMEABILIDADE VASCULAR INTESTINAL

A permeabilidade vascular intestinal foi estudada pioneiramente em nosso meio por BORDON DE CORVALAN (1994) e HAJAR (1994), com o intuito de desenvolverem um método para avaliar a reação inflamatória intestinal em modelos experimentais de colite ulcerativa. Este método parte do princípio de que em

vigência de citocinas pró-inflamatórias como o $\text{TNF}\alpha$, anafilotoxinas (C3a e C5a) e derivados do ácido araquidônico, o fluxo transcapilar intestinal sofre aumento em relação ao fluxo normal, permitindo a saída de plasma para o interstício sendo este, o fenômeno indicador da resposta inflamatória.

Na a bordagem experimental do presente estudo, o uso do zymosan como indutor de ativação do sistema complemento pela via alternativa, conforme descrito por DEITCH e colaboradores (1992), confirmou esta hipótese e associando os resultados das dosagens séricas de C3 aos da avaliação da permeabilidade vascular, observaram-se concordância entre o aumento do fluxo transcapilar intestinal em animais inoculados com zymosan em relação aos inoculados com solução salina isotônica, o que indica efetivamente a presença de inflamação no tecido intestinal. No presente estudo, ao aumento da permeabilidade vascular intestinal, nos grupos inoculados pelo zymosan, relacionaram-se aos maiores níveis de endotoxemia, níveis de $\text{TNF}\alpha$ circulante e translocação bacteriana.

SWANK e DEITCH (1996), estabeleceram que o aumento da permeabilidade intestinal e a TB exercem importante papel na falência de múltiplos órgãos (FMO). A falha da barreira intestinal é a principal hipótese para explicar o escape das toxinas da luz intestinal, contribuindo para a ativação dos mecanismos de defesa levando a auto-intoxicação e destruição de tecidos. A translocação de bactérias e endotoxinas podem ativar mecanismos do sistema imune levando a produção de citocinas e outros mediadores da inflamação como o $\text{TNF}\alpha$. Estes mediadores podem aumentar a resposta inflamatória sistêmica e aumentar a permeabilidade intestinal criando assim um ciclo vicioso. Adicionalmente, as células inflamatórias locais e sistêmicas que foram ativadas no intestino, contribuem para resposta sistêmica característica da sépsis e da FMO. Se o sistema inflamatório imune é o "motor da FMO", o intestino é um dos maiores "pistões" que movimenta o motor.

Neste mesmo contexto, FARQUHAR e colaboradores (1996) desenvolveram a técnica de microscopia intravital da mucosa do intestino delgado em modelo animal de sépsis, com pressão arterial normal. Observaram que a translocação de bactérias e endotoxinas levam a sépsis animais submetidos a queimaduras ou isquemia intestinal e sugeriram que este fato pode ser mediado em parte por disfunção da microcirculação da mucosa intestinal.

FUJITA e SAKURAI (1995), verificaram que o epitélio intestinal intacto e tecido linfático atuam como defesa corporal contra toxinas da luz intestinal. Esta barreira pode ser comprometida nas doenças inflamatórias do cólon que levam ao aumento de permeabilidade mucosa e subsequente translocação de endotoxinas. O efeito da glutamina sobre a atividade da ornitina decarboxilase da mucosa intestinal e sobre níveis de endotoxinas sangüíneas na veia porta foi estudado em cobaias, num modelo de colite experimental. Apesar de não ter sido efetiva para mostrar a indução da atividade da ornitina-decarboxilase pela administração de glutamina, a diminuição do nível de endotoxina no sangue portal foi estatisticamente significativa nos animais alimentados com glutamina. Concluíram que a dieta enriquecida com glutamina trouxe benefícios terapêuticos para doenças inflamatórias do cólon.

No presente estudo, a utilização da glutamina foi determinante na permeabilidade vascular intestinal, pois os grupos suplementados apesar de não apresentarem normalidade da permeabilidade vascular intestinal, demonstraram resultados menores de exsudação intestinal do azul de Evans (tabelas 15 e 16).

6.3. A ENDOTOXEMIA

Já conhecido desde a década de 50, o lipopolissacarídeo bacteriano e a conseqüente endotoxemia por ele causada, ainda vêm sendo cada vez mais alvo de estudos.

Em nosso meio, estes estudos foram pioneiramente efetuados por VIANA (1948), emérito professor da Universidade Federal do Paraná, na área de Microbiologia. Em seu trabalho proposto para defesa de cátedra, denominado "Plaquetopênia e fenômeno de Sanarelli-Schwartzman", estudou em coelhos os efeitos de LPS extraído de bacilos entéricos Gram-negativos, ressalta-se que este procedimento foi feito no Instituto Butantan de São Paulo, com o auxílio do Dr. Otto Guilherme Bier, face à dificuldade e sofisticação para a época. Evidenciou a íntima relação entre endotoxemia e a palquetopenia em coelhos.

Nos dias de hoje, as pesquisas se voltam para o bloqueio por anticorpos monoclonais ou ultrafiltrações plasmáticas, evitando os efeitos hemodinâmicos do LPS, induzidos em pacientes sépticos, pois esta molécula é apontada como a grande desencadeadora do choque endotóxico.

No presente estudo, a dosagem de LPS circulante foi empregada como indicadora da liberação desta molécula da luz intestinal ou de células bacterianas translocadas para a circulação sanguínea, aos moldes do que ocorre em pacientes críticos em vigência de síndrome inflamatória sistêmica.

Conforme os resultados obtidos (gráfico 9), os grupos não inoculados com zymosan não demonstraram endotoxemia, não se pode efetivamente afirmar a sua ausência, pois o método empregado neste estudo tem limite de sensibilidade até 0,01953 UE/ml de plasma. Contudo, nos demais grupos deste estudo, os inoculados com zymosan e tratados ou não com glutamina demonstraram efetivamente a ocorrência sérica desta molécula, confirmando a liberação de endotoxina para a corrente circulatória e justificando os resultados obtidos na avaliação da permeabilidade capilar intestinal, que nestes grupos encontrava-se aumentada. Conforme também demonstrado no gráfico 9, a glutamina exerceu efeito na quantificação sérica de LPS, pois a endotoxemia foi menor nos grupos suplementados que nos não suplementados por este aminoácido.

DEITCH, WINTERTON e BERG (1986) procederam estudo para determinar a influência da desnutrição isolada ou em combinação com endotoxemia no desenvolvimento de TB do trato gastrintestinal. A TB não ocorreu nos controles que apenas estavam em jejum ou desnutridos, mas nos ratos que receberam endotoxina por via endovenosa e estavam desnutridos apresentaram alta incidência de TB e a letalidade estava diretamente ligada ao grau de desnutrição.

DEITCH e colaboradores em 1987, avaliaram a resistência natural contra endotoxina por camundongos da linhagem C3H/HeJ em comparação aos camundongos da linhagem CD-1. Avaliaram também se as vias intraperitoneal ou intramuscular de inoculação de LPS influiriam sobre a TB para LNM e destes, para a circulação sistêmica. Concluíram que a resistência natural contra a endotoxina não protege da TB e que não importa a via de inoculação de LPS para a sua ocorrência.

DEITCH e colaboradores em 1989 avaliaram a redução da TB induzida por endotoxina em camundongos. Compararam os efeitos de doses não letais de endotoxinas de diferentes cepas de *Escherichia coli* a 026:B6 e 0111:B4. Concluíram que não houve diferença entre ambas na indução de TB, o alopurinol e tungstênio inibem a atividade da xantina-oxidase com conseqüente diminuição da

lesão da mucosa intestinal e que a geração de radicais livres de oxigênio pela xantina-oxidase aumentam a TB.

DEITCH e colaboradores em 1989, estudaram os mecanismos de indução de TB pela endotoxina (LPS) bacteriana. Determinaram qual a porção da molécula da endotoxina que estava relacionada com o incremento de TB, bem como a atividade da xantina-oxidase na patogênese da TB induzida pela endotoxina. Observaram que doses não letais de endotoxina de *Salmonella*, a qual contem uma porção polissacarídica terminal na região do *core*, enquanto que se diminuïrem os açúcares terminais para apenas três, não ocorria TB. Observaram também que somente a inoculação de endotoxinas que induzem TB é que causavam injúria da mucosa intestinal, aumento da atividade das enzimas xantina-dehidrogenase e xantina-oxidase. A inibição da atividade da xantina-oxidase pelo alopurinol preveniu a lesão da mucosa intestinal induzida pela endotoxina. Sugeriram que a ocorrência de TB mediada por endotoxina é dependente de polissacarídeos no *core* do LPS e que os oxidantes gerados pela xantina-oxidase são importantes na patogênese da lesão da mucosa intestinal induzida por endotoxinas e TB.

DUDRICK e colaboradores em 1992, estudaram os efeitos do LPS no transporte jejunal da glutamina. A inoculação do LPS ocorreu na dose de 7,5mg.Kg⁻¹, quatro horas antes da administração oral de glutamina. Concluíram que dietas enriquecidas com glutamina podem ser uma estratégia nutricional para a proteção do transporte jejunal de aminoácidos durante uma reação inflamatória sistêmica provocada por endotoxina.

INOUE e colaboradores (1993), estudaram em ratos a aceleração do metabolismo hepático da glutamina em vigência de endotoxemia. Esta hipótese é baseada no aumento do transporte ativo de plasma pela membrana em hepatócitos. A endotoxemia foi induzida pela inoculação de LPS de *Escherichia coli* e a permeabilidade de membrana de hepatócitos a glutamina foi avaliada pela dosagem de glutamina tritiada. Concluíram que os níveis séricos elevados de endotoxina induzem ao aumento da entrada de glutamina nos hepatócitos, fato este causado pelo aumento de influxo de Na⁺, e que, portanto, incrementa a sua metabolização.

DEITCH (1994), demonstrou o papel da TB e endotoxinas na gênese da enterocolite necrotizante e definiu a função da mucosa intestinal como principal local de defesa para prevenir que as bactérias que colonizam o intestino invadam órgãos

e tecidos. Concluiu que o intestino, em vigência de inflamação pode perder a função de barreira intestinal e nestas condições a TB pode acontecer.

GO e colaboradores em 1995 examinaram *in vitro* a função da mucosa intestinal na TB em amostras de ratos inoculados com LPS. Observaram que *in vivo* a TB de *Escherichia coli* ocorreu em 100% dos animais inoculados com LPS, com alta significância em relação ao grupo controle (25%; $p < 0,05$). *In vitro* a passagem de *Escherichia coli* aconteceu em 78% das amostras de intestino dos animais tratados com LPS e nos animais controles em 14% ($p < 0,05$). A avaliação histológica de segmentos intestinais de ambos os grupos demonstrou diferenças estruturais importantes. Concluíram que o aumento da permeabilidade a bactérias contribuem para a TB na endotoxemia.

KELLY e colaboradores em 1997 questionaram se endotoxina em circulação poderia ser o desencadeante da síndrome da resposta inflamatória sistêmica. Avaliaram pacientes após trauma severo ou queimaduras, bem como, procederam a um estudo experimental de queimadura em camundongos para determinar a relação entre níveis séricos de endotoxina e produção de citocinas pró-inflamatórias e subsequente resistência à infecção. Estes autores concluíram que efetivamente houve associação entre a liberação de LPS intestinal após trauma severo em humanos e em camundongos após queimadura induzida, acompanhada pelo aumento de níveis séricos de $TNF\alpha$, IL1 e IL6.

MANZURUL e colaboradores (1997), estudaram em ratos os efeitos de endotoxina e glutamina na hemodinâmica intestinal. Após doze horas da indução de endotoxemia pela injeção de 10mg.Kg^{-1} de LPS foram avaliados os seguintes parâmetros: fluxo sanguíneo na aorta abdominal, veia mesentérica superior, pressão arterial média, pressão venosa central e atividade da glutaminase. Observaram os seguintes resultados: decréscimo da pressão sanguínea média, aorta abdominal e veia mesentérica superior ($p < 0,05$), enquanto que a pressão venosa central aumentou ($p < 0,05$), quando comparadas às pressões do grupo controle inoculado com solução salina isotônica. Concluíram que a endotoxina produz efeito hipodinâmico em ratos após 12 horas de inoculação e diminuição do metabolismo intestinal da glutamina e sua capacidade absorptiva.

GAUDIO e colaboradores (1993), avaliaram em ratos qual dose de endotoxina que seria efetiva para a indução de translocação bacteriana. Utilizaram

60 ratos divididos em dois grupos, um grupo recebeu 8mg.Kg⁻¹ de endotoxina e o outro grupo solução salina isotônica, ambas por via intramuscular. Após seis horas e vinte e quatro horas de evolução, grupos de animais foram sacrificados e avaliada a TB. Observaram aumento significativo de TB entre estes períodos, sendo 40% nas seis horas e 60% nas vinte e quatro horas ($p < 0,01$). A avaliação histológica demonstrou que a injúria intestinal ocorreu após 24 horas da inoculação de endotoxina e se caracterizava por pronunciado edema intersticial com lesões em membrana basal, vilo e glândulas. Concluíram que bactérias e produtos bacterianos do trato intestinal cruzam a barreira mucosa e colonizam vísceras abdominais e pulmão após baixa dose de endotoxina inoculada por via intramuscular.

6.4 A LIBERAÇÃO DE TNF α

Uma das principais causas de óbito entre pacientes internados nas Unidades de Terapia Intensiva é o choque séptico, com letalidade maior que 40% nos dias atuais. A definição de choque séptico mostra a associação da síndrome séptica e hipotensão arterial, com pelo menos uma evidência de perfusão orgânica alterada, seja ela hipoxemia, lactacidemia, oligúria ou alteração do nível de consciência.

O TNF α é produzido principalmente por monócitos e macrófagos, mas também pode ser liberado por linfócitos e mastócitos, é considerado o primeiro fator que promove o recrutamento de PMNs do compartimento vascular para o pulmão (MONTÓN e colaboradores, 1998).

Estudos em humanos voluntários têm demonstrado que após a administração de endotoxina, apesar dos altos níveis de citocinas circulantes, não há nenhuma resposta inflamatória significativa no pulmão (TNF α , citocinas e G-CSF) (BOUJOUKOS e colaboradores, 1993). Estes resultados sugerem a existência da resposta inflamatória compartimentalizada, que foi confirmada recentemente em um modelo de pneumonia por bactérias Gram-negativas induzida em coelhos (FOX-DEWHURST e colaboradores 1997).

Em alguns estudos feitos em pacientes com pneumonia comunitária foram encontrados altos níveis de TNF α no plasma que também confirmou a compartimentalização da resposta inflamatória pela observação de maiores níveis de

TNF α e outras citocinas no BAL do pulmão envolvido na pneumonia unilateral (DEHOUX e colaboradores, 1994). Foi observada relação significativa entre níveis de TNF α no plasma e o APACHE II, marca de severidade em pacientes com pneumonia comunitária grave, concluindo que esta citocina pode ser um marcador usual de severidade na pneumonia (PUREN e colaboradores, 1995).

As bactérias Gram negativas possuem em sua parede uma endotoxina composta por lipopolissacarídeos que são danosos ao organismo animal e ativadores de mecanismos de resposta imunológica. O lipídeo A é o componente mais importante deste lipopolissacarídeo, sendo constituído de glucosamina, fosfato que são ligados a um ácido graxo com 14 átomos de carbono. Quando a bactéria morre ou se multiplica há uma grande liberação de lipídeos A que então se tornam imunogênicos induzindo a ação de macrófagos. Estes macrófagos possuem receptores de superfície CD-14 capazes de se ligar a um complexo formado por proteínas carregadoras e a endotoxina, além de receptores para endotoxina livre. Os receptores funcionam como sinalizadores da indução de diversas substâncias capazes de reproduzir os achados do choque séptico.

A liberação de lipopolissacarídeos faz com que haja uma liberação de receptores de membrana de leucócitos mononucleares resultando na produção de diversas proteínas denominadas de citocinas. Duas citocinas são as primariamente envolvidas no mecanismo de sepse: Interleucina-1 e Fator de Necrose Tumoral.

Os receptores do TNF α existem em muitos tecidos e pequenas quantidades de RNA mensageiro codificador são detectadas em diversas células de indivíduos normais, sendo que a síntese de produção de TNF α é mais acentuada no rim, baço, pulmão, útero, tuba uterina, pâncreas e coração, órgãos alvo de agressão no choque séptico.

Quando a Interleucina-1 e o Fator de Necrose Tumoral estão associados, desencadeia-se uma seqüência de eventos que constituem a sépsis, tais como: mudança de temperatura, variações de resistência e permeabilidade vascular, febre, anorexia, sonolência, neutrofilia ou neutropenia, aumento dos fatores estimulantes de colônias e interleucina-6 e aumento de proteínas de fase aguda.

O TNF α e a IL-1 também estimulam a síntese, modulação e expressão de outras citocinas, sendo a IL-8 de grande importância, pois ativa leucócitos

polimorfonucleares que causam dano tecidual e levam a disfunção orgânica. Na presença de IL-1, a síntese de IL-8 é aumentada e seus efeitos são amplificados nos tecidos inflamatórios. No processo clínico desenvolvido pelo choque séptico, é importante que se valorize os efeitos imunopatológicos do choque séptico para que seja obtida melhor compreensão dos achados hemodinâmicos e para poder desenvolver um suporte imunoterápico eficaz que contribua com a queda das taxas de letalidade, (ABBAS e ABUL, 2000)

No presente estudo, os resultados obtidos nas dosagens de $TNF\alpha$ (gráfico 10), seguiram a mesma tendência das dosagens de endotoxinas, ou seja, tanto os níveis mais elevados, como os menores e a negatividade foram encontrados nos mesmos grupos de animais (tabela 12), mostrando a inter-relação entre a endotoxemia e a liberação de $TNF\alpha$.

6.5 GLUTAMINA E TRANSLOCAÇÃO BACTERIANA

No presente estudo foram observadas diferenças estatisticamente significantes nas porcentagens de TB para LNM, fígado, sangue e baço quando comparados os grupos que receberam zymosan e os que não receberam, o que demonstra o efeito estimulatório desta droga. Quando foram analisados estatisticamente os grupos que receberam o zymosan, não foram observadas diferenças estatisticamente significantes entre estes grupos, embora o sub-grupo ZYM 2mg SSI foi o que demonstrou maior porcentagem de TB (tabela 6). A ação desta droga está relacionada com a indução de reação inflamatória sistêmica e consequente quebra da barreira intestinal.

A barreira intestinal é um conjunto de mecanismos imunológicos e não imunológicos que em condições normais preserva a passagem de bactérias e suas toxinas da luz intestinal para a circulação sistêmica e outros órgãos, processo este denominado translocação bacteriana. A quebra desta barreira, induzida por distintas causas, permite a translocação e neste contexto, os modelos experimentais vêm sendo desenvolvidos, com a intenção de estudar especificamente os mecanismos promotores da translocação bacteriana e também as vias pelas quais as bactérias presentes na luz entérica atingem os órgãos à distância e a circulação sanguínea (WELLS e colaboradores 1988, DEITCH, 1994; BERG, 1981; BERG, 1995; AKÇAY

et al, 1996; FOITZIK e colaboradores 1999; ERSIN et al, 2.000; ROCHA, 2000; HAJAR e colaboradores 2002). No estudo estatístico da TB por vísceras em separado, houve vantagens no uso da GLN, quando se analisaram em fígado e sangue., sendo que no fígado somente no sub-grupo 1mg de ZYM.

O rato, *Rattus norvegicus*, *Rodentia*, *Mammalia*, é um animal de manipulação fácil, transporte e acondicionamento, com regime alimentar rudimentar e fácil adaptação em ambientes laboratoriais de experimentação, com todas as variáveis controladas e disponibilidade em nosso meio.

A translocação bacteriana é determinada em laboratório pelo isolamento de bactérias indicadoras de contaminação fecal, a *Escherichia coli* e o *Enterococcus faecalis*, por serem estas, de habitat exclusivamente intestinal. A *Escherichia coli* é descrita como a bactéria mais encontrada nas culturas dos estudos de translocação bacteriana (ALVERDY e colaboradores, 1985; DEITCH e colaboradores 1990) e também a mais relacionada com sépsis e insuficiência de múltiplos órgãos (O'BOYLE, 1998; SWANK, 1996).

O trajeto pelo qual as bactérias presentes na luz entérica ultrapassam a barreira intestinal e atingem os órgãos à distância e na circulação sanguínea não estão totalmente evidenciados (MacFIE e McNAUGHT, 2002; WELLS e colaboradores 1988). Estas bactérias já foram encontradas nos espaços intercelulares (ALEXANDER e colaboradores 1990), com evidências de penetração via transcelular, através dos complexos juncionais do epitélio intestinal, das placas de Peyer, do ápice das vilosidades e dos macrófagos. A possibilidade da ocorrência de translocação bacteriana por vias consideradas paracelulares foi sugerida baseada na migração transmucosa, na migração retrógrada das bactérias entéricas para o pulmão, na migração transmural direta através da parede intestinal e na migração bacteriana direta para os linfonodos mesentéricos e/ou fígado, através dos vasos sanguíneos e/ou linfáticos (WELLS e colaboradores 1988; ALEXANDER e colaboradores 1990).

Diversos avanços têm sido obtidos para o melhor conhecimento do processo de translocação bacteriana e suas possíveis soluções terapêuticas.

A utilização da glutamina na tentativa de diminuir a translocação bacteriana é polêmica e controversa, cria divisões entre os especialistas da área e diariamente, ganha adeptos, incrédulos ou combatadores. A glutamina é o aminoácido mais

abundante no organismo humano, equivalendo a cerca de 60% do total de aminoácidos existentes. Há duas enzimas responsáveis pela sua síntese e degradação, respectivamente glutamina-sintetase e glutaminase. Elas são distribuídas heterogeneamente entre os diversos tecidos, havendo dessa forma, um fluxo inter-órgãos, com predomínio de produção ou degradação, conforme as necessidades orgânicas e as necessidades de cada órgão ou tecido (SOUBA e colaboradores, 1990). Possui várias funções, destacando-se entre elas, importante papel regulatório na síntese de nucleotídeos e de proteínas, regulação da produção de amônia renal, e regulação do pH sangüíneo. Além disso, funciona como combustível celular para células, com grande capacidade de replicação como células endoteliais dos vasos sangüíneos, renais, entéricas, fibroblastos, linfócitos e células neoplásicas. O intestino funciona como principal órgão consumidor de glutamina, acreditando-se que ela exerça o papel protetor sobre a mucosa entérica. O consumo intestinal desse aminoácido aumenta e a sua reserva diminui cerca de 30 a 50% em situações de *stress* e de hipercatabolismo, sendo considerado um aminoácido essencial nessas condições, onde sua ingesta diminui e seu consumo aumenta (Van ACKER e colaboradores, 1999).

No que diz respeito aos resultados da utilização de glutamina sobre a translocação bacteriana em estudos experimentais são extremamente controversos, pois alguns estudos apresentam efeitos benéficos (ZAPAPATA-SIRVENT e colaboradores, 1987, FOITZIK e colaboradores, 1999; ERSIN e colaboradores, 2000) ao contrário do estudo de XU e colaboradores (1993) não demonstraram alterações pelo seu uso, embora estes estudos sejam em diferentes situações experimentais.

Estudos clínicos têm sido realizados, visando a preservação da barreira intestinal, comparando diferentes vias de utilização de farmaconutrientes, para que se possam verificar possíveis benefícios na redução da translocação bacteriana e complicações sépticas, melhora da imunidade, permeabilidade intestinal, letalidade, tempo de permanência hospitalar e custos. Cabe nesta discussão de forma muito sutil incitar a dúvida sobre em quantos pacientes, diagnosticados com quadros de infecção hospitalar, não estaria ocorrendo translocação bacteriana ?

GRIFFTHS e colaboradores em 1997 realizaram estudo clínico com o objetivo de comprovar que a deficiência de glutamina, em pacientes gravemente

enfermos, gera prolongamento do internamento hospitalar e aumento da letalidade. Estudaram 84 pacientes que recebiam nutrição parenteral em Unidades de Terapia Intensiva e concluíram que em pacientes incapazes de receber nutrição enteral, a suplementação de glutamina na nutrição parenteral melhora a sobrevida e diminui o custo de internamento hospitalar.

HOUDIJK e colaboradores (1998) realizaram estudo clínico com o objetivo de investigar o efeito da suplementação de glutamina na morbidade de pacientes politraumatizados. Em uma série de 72 pacientes que receberam glutamina por pelo menos 5 dias após o trauma, concluíram que houve diminuição da frequência de pneumonia e sépsis.

POWELL-TUCK e colaboradores (1999) avaliaram se a inclusão de glutamina em solução de nutrição parenteral diminuiria o tempo de internamento hospitalar e letalidade em 168 pacientes de unidades de terapia intensiva, criticamente enfermos. Concluíram que não houve diferença em relação à letalidade e tempo de internamento hospitalar entre os dois grupos. No entanto, observaram benefícios com diminuição do tempo de internamento dos pacientes cirúrgicos e da letalidade dos portadores de neoplasia.

O exato papel terapêutico da glutamina, como farmaconutriente em humanos, ainda não é completamente elucidado, não tendo sido demonstrada relação direta de causa e efeito entre o seu uso e a diminuição da translocação bacteriana, contudo, poucos estudos prospectivos controlados, com grande número de pacientes, foram publicados, para que haja consenso (MACFIE e McNAUGHT, 2002).

BURKE e colaboradores, (1989), demonstraram que glutamina como importante fonte de combustível para o intestino. Este estudo avaliou o seu efeito na nutrição parenteral total na função imunológica do intestino. Os resultados indicaram que a nutrição parenteral total suplementada com glutamina protege contra TB do intestino e que este efeito pode ser mediado por IgA secretória.

A administração oral da glutamina são necessárias algumas precauções, pois sendo um aminoácido instável e que possui baixa solubilidade, a solução aquosa se precipita em poucos minutos. Para evitar esta situação, neste estudo a suspensão foi mantida permanentemente sob agitação magnética para sua correta homogeneização durante a gavagem dos animais, que foi feita sob sedação dos

animais com éter sulfúrico. Apesar desta via ser pouco utilizada na literatura, sendo mais encontradas referências da sua administração em ração especialmente formulada com glutamina (ERSIN et al, 2000; BARK et al, 1995; GENARI E ALEXANDER, 1995; TORRES, 1997), que apesar de ser mais fácil, ressalta-se que se os animais não ingerirem toda ração que lhes foi oferecida ou houver precipitação do aminoácido, a dose previamente calculada não será administrada.

Na abordagem experimental deste estudo não foram encontrados obstáculos para suplementação nutricional dos ratos, uma vez que a administração orogástrica de fármacos em ratos, já é procedimento rotineiro no laboratório onde este estudo foi procedido. No presente estudo, optou-se então pela inoculação via orogástrica para que se tivesse certeza absoluta de que todos os animais estavam recebendo a mesma dose de aminoácido, sendo administrada com o menor tempo de sedação possível, não se observando complicações diretamente relacionadas a essa administração.

Em relação à dose diária do aminoácido, optou-se por 0,1g diariamente, conforme descrito BARK e colaboradores (1995), no mesmo horário e com os mesmos manipuladores dos animais (item 3.10), pois é necessário um consumo de altas doses de glutamina em estados hipercatabólicos (WILMORE e SHABERT, 1998), para que se evite atrofia da mucosa entérica em ratos (Mc CULEY e colaboradores, 1998).

BERG (1981), caracterizou os mecanismos promotores de translocação bacteriana, como sendo: hipercrecimento bacteriano, deficiência imunológica do hospedeiro e hiperpermeabilidade da mucosa e a lesão da barreira intestinal, atuando isolada ou sinergicamente. De acordo com o envolvimento de um ou mais dos seus mecanismos promotores, a translocação bacteriana ocorrerá em vários estágios. No primeiro estágio, com o crescimento da população bacteriana, os patógenos chegam colonizam os linfonodos mesentéricos. Em segundo estágio, caso haja perda da função da barreira intestinal, as bactérias alcançam outros órgãos à distância como baço, fígado, pulmões e rins. No terceiro estágio, se houver deficiência imunológica do hospedeiro, os patógenos atingem a circulação sangüínea, podendo nessa fase, gerar sépsis, insuficiência de múltiplos órgãos e morte do paciente.

SAADIA e colaboradores (1990), demonstraram evidências de que a falência de múltiplos órgãos não é sempre o resultado de um foco séptico estabelecido. Voltaram suas atenções para o fato de que o intestino fosse um reservatório de bactérias e toxinas que pudessem atravessar a barreira mucosa do intestino, iniciando um estado séptico, e definiram que a falência de múltiplos órgãos pode ocorrer de três formas: ruptura física da mucosa, dano no sistema de defesa, alteração da ecologia bacteriana.

MOORE e colaboradores, (1989), em estudo retrospectivo concluíram que infecção com sépsis era o caminho comum para o desenvolvimento de síndrome do estresse respiratório agudo e eventualmente falência de múltiplos órgãos. Os estudos publicados de 1977 a 1987 se concentraram nos eventos tardios da SIRS. Atualmente acredita-se que o insulto inicial traumático maciço pode induzir severa SRIS, independente de infecção. Porém um insulto traumático de menor intensidade pode desenvolver um ambiente inflamatório que mais tarde precipitaria o início da SRIS. Este fato levou os pesquisadores nos últimos cinco anos a mudar suas investigações para os eventos clínicos precoces como consumo de oxigênio fluxo dependente, isquemia/ reperfusão e ativação da resposta inflamatória.

FOX e colaboradores (1988) estudaram a administração de dieta básica para ratos que receberam metotrexate (MTX), por via intraperitoneal que nesta condição induz 100% de letalidade por enterocolite severa. Este estudo investigou o efeito da glutamina mais dieta básica sobre o estado nutricional, morfometria intestinal, TB, sobrevivência em um modelo de injúria letal, baseado em estudos anteriores que mostraram que glutamina não está presente na dieta básica e é o substrato oxidativo preferido para o intestino podendo facilitar a recuperação intestinal após a injúria. Estes autores mostraram que a glutamina mais dieta básica melhorou o estado nutricional, diminuiu a injúria intestinal, diminuiu a TB e resultou na melhora da sobrevida em modelo murino de enterocolite.

KLIMBERG e colaboradores, (1990), verificaram que a glutamina é um componente essencial da dieta, com função de apoio ao crescimento e funcionamento da mucosa intestinal. Estes autores avaliaram o efeito da glutamina como suplemento da dieta elementar, administrada antes da radiação abdominal observando metabolismo da glutamina no intestino, forma e medida da mucosa intestinal e TB. Concluíram que a glutamina exerceu efeito protetor sobre a mucosa

do intestino delgado por proporcionar a proliferação de células da cripta acelerando a cura do intestino irradiado.

DEITCH e colaboradores (1990), servindo-se da característica principal do zymosan como ativador do sistema complemento e conseqüente indutor de síndrome de falência de múltiplos órgãos, propôs o estudo que objetivava avaliar em animais desnutridos, a predisposição para sépsis de origem intestinal. Utilizaram o zymosan na dose de 0,1mg/kg em camundongos, os quais foram sacrificados 24 horas após a inoculação e foram coletadas amostras de sangue para dosagem de C3 e C4 e as vísceras para avaliação bacteriológica. Demonstraram intensa ativação do sistema complemento pelo consumo de seus componentes (C3 e C4), e nestes grupos, TB para pulmões, fígado, baço e LNM.

AUSTGEN e colaboradores (1991), avaliaram o metabolismo esplâncnico da glutamina em ratos, após doze horas da inoculação de LPS de *Escherichia coli*. Observaram que durante a endotoxemia o fígado tornou-se o principal órgão de consumo da glutamina. Houve acelerada utilização de fontes de carbono, gliconeogênese, utilização de nitrogênio para a ureagênese, substrato para nucleotídeos e biossíntese de glutation, para suportar o reparo celular e reações de detoxificação.

GORIS e colaboradores (1991), avaliaram em ratos se a descontaminação seletiva do trato gastrointestinal preveniria a falha de múltiplos órgãos após a inoculação de zymosan na dose de 100mg para cada 100g de peso corpóreo. Durante os 12 dias sucessivos à inoculação do zymosan, foram tratados com trimetropina e estreptomicina e coletadas amostras de conteúdo retal para contagem bacteriana. Os animais foram avaliados quanto aos sinais e sintomas clínicos e foram sacrificados e coletadas amostras de rins, fígado, baço e pulmões para pesquisa de bactérias entéricas. Concluíram que a descontaminação seletiva do trato gastrointestinal diminui os níveis de TB em ratos, porém não altera os níveis de sobrevivência.

RODRIGUEZ e colaboradores (1995) avaliaram o efeito da administração de glutamina intraluminal sobre "bypass" jejunoileal (BJI), induzindo anormalidades no perfil protéico plasmático em ratos. TB ocorreu em ambos os grupos de estudo: BJI salina e BJI salina-glutamina, sendo que os ratos suplementados com glutamina mostraram diminuição nos níveis de colesterol. Entretanto glutamina não preveniu as

alterações induzidas pelo BJI no perfil protéico plasmático e na histopatologia do cólon.

BUCHMAN (1996), em estudo prospectivo definiu que a glutamina é um aminoácido não essencial o qual pode ser sintetizado a partir do glutamato e do ácido glutâmico pela glutamina-sintetase, atuando na preservação e aumento dos vilos do intestino delgado, da permeabilidade intestinal e da função imunológica intestinal. Este autor enfatiza que ainda é obscuro se a nutrição exclusivamente parenteral promove deficiências intestinais em humanos e a inexistência de dados sobre o uso da glutamina como a proposta de preservação da morfologia e função intestinal e prevenção de TB em humanos deve estimular novos estudos.

SCHEPPACH e colaboradores (1996), avaliaram a estrutura e a função dos colonócitos de ratos alimentados com L-glutamina e o n-butilato. A glutamina reduziu a passagem de manitol, lactulose e de *E.coli*. Os resultados sugeriram que a L-glutamina repara a mucosa colônica após injúria. Este efeito sobre o intestino está relacionado com a estimulação da proliferação das células da cripta.

SCHIMPL e colaboradores (1996) investigaram a incidência de TB na hipertensão portal e icterícia obstrutiva e avaliaram os efeitos do alopurinol e glutamina. As concentrações de malondialdeído da mucosa intestinal e a atividade da mieloperoxidase liberada da ativação dos neutrófilos foram utilizadas como indicadores para peroxidação lipídica, e ambas estavam significativamente aumentadas nos ratos não tratados. Concluíram que alopurinol e glutamina reduziram de forma significativa a TB assim como atividade de mieloperoxidase e malondialdeído.

SALVALAGGIO (2000), observou papel protetor da glutamina administrada previamente à indução da lesão oclusiva intestinal em ratos, quando comparada a sua ação com os efeitos da glicina. Os resultados do presente estudo, referem-se à ação da GLN de forma isolada uma vez que não foi comparada à ação de outro amino-ácido com mesmo peso molecular em grupos similares de ratos, ficando os animais suplementados com GLN recebendo um aporte nitrogenado superior que os demais grupos, apesar de que a tendência atual em estudos experimentais com fármaco-nutrientes orienta para a comparação entre grupos que recebam dietas isoprotéicas e isocalóricas.

MacFIE e McNAUGHT (2002), propuseram uma revisão sobre a função da glutamina sobre a barreira intestinal. Afirmam estes autores que a glutamina é o principal substrato utilizado pelos enterócitos e colonócitos e pouco utilizada por células do sistema imunológico. O tecido muscular esquelético libera grande quantidade de glutamina após a sépsis, trauma, operações e outras formas de estresses catabólicos resultando na sua diminuição no músculo e sangue, sendo observado seu elevado consumo e metabolismo no tecido intestinal durante estresse metabólico. Em animais a suplementação parenteral ou enteral induz o crescimento da mucosa intestinal, reparo de lesões e melhora de função, diminuindo a TB e melhorando o balanço nitrogenado em modelos de atrofia, injúria ou adaptação intestinal.

Os mecanismos de ação pelos quais a glutamina exerce seus efeitos homeostáticos e protetores da barreira intestinal ainda não estão completamente evidenciados. Pode exercer papel importante na prevenção e/ou diminuição da resposta inflamatória, já que o fluxo interorgânico existente entre os diversos órgãos que consomem ou produzem glutamina é completamente alterado em pacientes sépticos. Isso poderia explicar a progressão da sépsis para insuficiência de múltiplos órgãos e sistemas e corroborar com a hipótese da origem intestinal da sépsis.

WILMORE e SHABERT (1998) mencionam que o suporte nutricional no século XXI proporcionará que um dia possamos saber como e quando utilizar cada nutriente especificamente. Saberemos também como esses nutrientes atuarão no metabolismo, como poderão modificar doenças e ajudar em vários aspectos da prática clínica diária. Até lá, muitos estudos precisarão ser realizados com cada nutriente específico e em particular, também com a glutamina, para que possamos descobrir, confirmar e provar seus efeitos, indicações, limitações e reais benefícios.

Ao término do presente estudo, seus resultados permitem que sejam feitas algumas considerações sobre as interações fisiopatológicas ocorridas:

- O zymosan induziu ativação do sistema complemento e conseqüentemente reação inflamatória sistêmica, sendo esta de maior magnitude na dose de 2mg/100.
- A ocorrência de reação inflamatória sistêmica foi indicada pela alteração do fluxo transcapilar intestinal, nesta fase, com a perda da função da

barreira intestinal houve saída de LPS para a corrente circulatória, o qual ativou macrófagos CD14 para a liberação de $\text{TNF}\alpha$.

- Talvez simultaneamente ou de forma indeterminada temporalmente, por ocasião da perda da função da barreira intestinal, bactérias intestinais tiveram a oportunidade de translocarem e colonizarem outras vísceras, ampliando ainda mais os níveis séricos de LPS e reiniciando, ou perpetuando a ativação de macrófagos CD14 e conseqüente liberação de $\text{TNF}\alpha$.
 - Na suplementação com glutamina, estes efeitos foram minimizados, mas não evitados, pois embora sem significação estatística quando analisadas as médias globais de vísceras que sofreram TB, foram menores nos grupos de animais suplementados por este aminoácido e a liberação de $\text{TNF}\alpha$, permeabilidade vascular intestinal e endotoxemia, também acompanharam esta tendência. Quando se analisam os resultados de TB por víscera isolada, verificam-se estatisticamente os efeitos da glutamina.
-

7 Conclusões

Os resultados deste estudo experimental sugerem que :

- A suplementação nutricional com glutamina não impediu, mas minimizou a ocorrência de translocação bacteriana em grupos de ratos Wistar inoculados com 1mg/100g de zymosan em fígado e sangue. Na dose de 2mg/100g de zymosan somente houve diminuição da translocação bacteriana para o sangue.

 - A suplementação nutricional com glutamina diminuiu, mas não impediu a endotoxemia e liberação de fator de necrose tumoral alfa em vigência das doses de 1mg/100g e 2mg/100g de zymosan em ratos Wistar.
-

Referências

- ABBAS, ABUL K.; Lichtman, Andrew H.; Pober, Jordans S. O sistema complemento. In: **Imunologia Celular & Molecular**. 3ª edição, Rio de Janeiro: Revinter, 2000. 305-309.
- AKÇAY, M. N.; ÇAPAN, M. Y.; GÜNDOĞDU, C. et al. Bacterial translocation in experimental intestinal obstruction. **J. Int. Med. Res.** West Sussex, v.24, n.1, p.17, Jan./Feb. 1996.
- ALEXANDER, J. W.; BOYCE, S. T.; BABCOCK, G. F.; GIANOTTI, L.; PECK, M. D.; DUNN, D. L., et al. The process of microbial translocation. **Ann Surg.** v.212, n.4, p.496, 1990.
- ALEXANDER, J. W. How do complement components and fragments affect cellular phagocytic function? **J Trauma.** v.24, (supl), p.122, 1984.
- ALVERDY, J. C.; CHI, H. S.; SHELDON, G. F. The effect of parenteral nutrition on gastrointestinal immunity. **Ann Surg.** v.202, p.681, 1985.
- AMBROSE, N.S.; JOHNSON, BURDON, D. W. Incidence of pathogenic bacteria from mesenteric lymph nodes and ileal serosa during Crhon's disease surgery. **Br J Surg.** v.71, p.623, 1984.
- APITZ, K. A study of the generalized Shwartzman phenomenon. **Journal Immunology.** v.29, p.255, 1935.
- AUSTGEN, T. R.; CHEN, M. K.; FLYNN, T. C.; SOUBA, W. W. The effects of endotoxina on the splanchnic metabolism of glutamine and related substrates. **The Journal of Trauma.** v.31, n.6, p.742, 1991.
- BARK, T.; KATOULI, M.; LJUNGQUIST, O.; MÖLLBY, R.; TORGNY, S. Glutamine supplementation does not prevent bacterial translocation after non-lethal haemorrhage in rats. **Eur J Surg.** v.161, p.3, 1995.
- BAUE, A. E. Multiple, progressive or sequential systems failure. **Arch Surg.** v.110, p.779, 1975.
- BERG, R. D. Bacterial translocation from the gastrointestinal tract. **Trends in Microb.** Cambridge-UK. v.3, n.4, p.149, 1995.
- BERG, R. D. Promotion of the translocation of enteric bacteria from the gastrointestinal tracts of mice by oral treatment with penicillin, clyndamycin, or metronidazol. **Infect Immun.**v.33, p.954, 1981.
- BERG, R. D.; GARLINGTON, A. W. Translocation of certain endogenous bacteria from the gastrointestinal tract to the mesenteric lymph nodes and other organs in a gnotobiotic mouse model. **Infect Immunol.** v.23, p.403, 1979.
- BERG, R. D. Bacterial translocation from the gastrointestinal tract. **Journal of Medicine.** v.23, n^{os}. 3 & 4, p.217, 1992.
- BERTÓK, L. Role of endotoxins and bile acids in the pathogenesis of septic circulatory shock. **Acta Chir Hung.** v.36, n^o 1, p.33, 1997.
-

- BORDER, J. R.; HASSET, J.; LADUCA, J. et al. The gut origin sepsis state in blunt multiple trauma (ISS-40) in the ICU. **Ann Surg.** v.206, p.427, 1987.
- BORDON DE CORVALAN, A. C. **Aplicação do micrométodo espectrofotométrico para determinação de Azul de Evans em plasma e tecido colônico de ratos Wistar.** Curitiba, 1994. Dissertação de Mestrado - Departamento de Clínica Cirúrgica, Universidade Federal do Paraná.
- BOUJOUKOS, A. J.; MARTICH, G. D.; SUPINSKI, E.; SUFFREDINI, A. F. Compartmentalization of the acute cytokine response in humans after intravenous endotoxin administration. **J Appl Physiol.** v.6, n.74, p.3027. 1993.
- BUCHMAN, A. L. Glutamine: is it a conditionally required nutrient for the human gastrointestinal system? **Journal of the American college of Nutrition.**v.15, n.3, p.199-205, 1996.
- BURKE, D. J.; ALVERDY, J. C.; AOYS, E.; MOSS, G. S. Glutamine-supplemented total parenteral nutrition improves gut immune function. **Arch Surg.** v.124, p.1396-1399, 1989.
- CARRICO, C.J; MEAKINS, J. L.; MARSHALL, J. C. The gastrointestinal tract. The "motor" of MOF. **Arch Surg.** v.121, p.197, 1986.
- CLARK, R. M. The time course of changes in mucosal architecture and epithelial cell production and cell shedding in the small intestine of the rat feed after fasting. **J Anat.** v.120, p.321, 1975.
- COLÉGIO BRASILEIRO DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (COBEA) <http://www.meusite.com.br/COBEA>. Acesso em 24 de janeiro de 2002.
- DEHOUX, M. S.; BOUTTEN, A.; OSTINELLI, J.; SETA, N.; DOMBRET, M. C.; CRESTANI, B.; DESCHENES, M.; TROUILLET, J. L.; AUBIER, M. Compartmentalized cytokine production within the human lung in unilateral pneumonia. **Am J Respir Crit Care Med.** v.3, n.150, p.710. 1994.
- DEITCH, E. A. Role of bacterial translocation in necrotizing enterocolitis. **Acta Paediatr.** supl. 369, p.33, 1994.
- DEITCH, E. A. Simple intestinal obstruction causes bacterial translocation in man. **Arch Surg.** v.124, p.699-701, 1989.
- DEITCH, E. A.; BERG, R.; SPECIAN, R. Endotoxin promotes the translocation of bacteria from the gut. **Arch Surg.** v.122, p.185, 1987.
- DEITCH, E. A.; BERG, R. D. Endotoxin but not malnutrition promotes bacterial translocation of the gut flora in burned mice. **J Trauma.** v.27, p.161, 1987.
- DEITCH, E. A.; KEMPER, A. C.; SPECIAN, R. D.; BERG, R. D. A study of the relationships among survival, gut-origin sepsis, and bacterial translocation in a model of systemic inflammation. **The Journal of Trauma.** v.32, n.2, p.141, 1992.
-

-
- DEITCH, E. A.; MA, L.; MA, W. J.; GRISHAM, M. B.; GRANGER, N.; SPECIAN, R. D.; BERG, R. D. Inhibition of endotoxin-induced bacterial translocation in mice. **J Clin Invest.** v.84, p.36, 1989.
- DEITCH, E. A.; MA, W. J.; BERG, R. D.; SPECIAN, R. D. Protein malnutrition predisposes to inflammatory-induced gut-origin septic states. **Ann Surg.** v.211, n.5, p.560, 1990.
- DEITCH, E. A.; MA, W-J.; MA, L.; BERG, R.; SPECIAN, R. D. Endotoxin-induced bacterial translocation: a study of mechanisms. **Surgery.** v.106, n.2, p.292, 1989.
- DEITCH, E. A.; MORRISON, J.; BERG, R. D. Effect of hemorrhagic shock on bacterial translocation, intestinal morphology and intestinal permeability in conventional and antibiotic decontaminated rats. **Crit Care Med.** v.18, p.529, 1990.
- DEITCH, E. A.; WINTERTON, J.; LI, M.; BERG, R. The gut as a portal of entry for bacteremia. **Ann Surg.** v.205, n.6, p.681, 1986.
- DINARELLO, C. A. The multiple biologic activities of IL-1. **N Engl J Méd.** v.311, n.22, p.1413. 1984.
- DINARELLO, C. A. Interlekin-1 and its biologically related cytokines . **Adv.Immunol.** v.44, p.153. 1989
- DUDRICK, P.S.; SALLOUM, R. M.; COPELAND III, E. M.; SOUBA, W. W.; FACS, Sc. D. The early response of the jejunal brush border glutamine transporter to endotoxemia. **Journal of Surgical Research.** v.52, n.4, p.372, 1992.
- ERSIN, S.; TUNCYUREK, P.E. & SASSOLAK, M. The prophylactic and therapeutic effect of glutamine and arginina enriched diets in radiation-induced enteritis rats. **Journal of Surgical Research.** San Diego, v.89, n.2, p.121-125, 2000.
- FADEL, M. V.T. **Uso de corticosteróide na infecção grave de origem peritoneal por bactérias Gram-positivas ou Gram-negativas, experimentalmente induzida em camundongos.** Curitiba, 1996. 63 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Interna), Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná.
- FARQUHAR, I.; MARTIN, C. M.; LAM, C.; POTTER, R.; ELLIS, C. G.; SIBBALD, W. J. Decreased Capillary *in vivo* in bowel mucosa of rats with normotensive sépsis. **Journal of Surgical Research.** v.61. n.1, p.190, 1996.
- FOITZIK, R. L.; KRUSCHEWSKI, M.; KROESEN, A. J. et al. Does glutamine reduce bacterial translocation ? **Int. J. Colorectal Dis.** v.14, n.1, p.143-149, 1999.
- FOX, A. D.; KRIPKE, DE PAULA, J. Effect of a glutamine supplemented enteral diet on methotrexate – induced enterocolitis. **SPEN,** v.12, p.325, 1988.
-

- FOX, A. D.; KRIPKE, S. A.; DE PAULA, J.; BERMAN, J. M.; SETTLE, G.; ROMBEAU, J. L. Effect of a glutamine-supplemented enteral diet on methotrexate-induced enterocolitis. **Journal of Parenteral and Enteral Nutrition**.v.12, n.4, p.325, 1988.
- FOX-DEWHURST,R.; ALBERTS, M. K.; KAJIKAWA, O.; CALDWELL, E.; JOHNSON, M. C. 2ND; SKERRETT, S. J.; GOODMAN, R. B.; RUZINSKI, J. T.; WONG, V.A.; CHI, E. Y.; MARTIN, T. R. Pulmonary and systemic inflammatory responses in rabbits with gram-negative pneumonia. **Am J Respir Crit Care Med**. v.6, n.155, p.2030. 1997.
- FREUDENBERG, M. A.; GALANOS, C. Bacterial lipopolisaccharides: structure, metabolism and mechanisms of action.**Inter. Rev.Immunol**, v.6, p.207, 1990.
- FUJITA, T.; SAKURAI, K. Efficacy of glutamine-enriched enteral nutrition in an experimental model of mucosal ulcerative colitis. **British Journal of Surgery**. v.82, p.749, 1995.
- GANGLOFF, S. C. et al. Lipopolysaccharide structure influences the macrophage response via CD14-independent and CD14-dependent pathways. **Clinical Infectious Diseases**. v.28, p.491, 1999.
- GATEHOUSE, D.; DIMOCK, F.; BURDON, D. W.; ALEXANDER-WILLIAMS, J.; KEIGHLEY, M. R. B. Prediction of wound sepsis following gastric operations. **British Journal of Surgery**. v.65, p.551, 1978.
- GATHIRAM, P.; GAFFIN, S. L.; BROCK-UTNE, J. G. Time course of entoxemia and cardiovascular changes in heat-stressed primates. **Aviat Space Environ Med**. v.58, p.1071, 1987.
- GAUDIO, A. R.; PADELLETTI, M. B.; LEONI, M.; TANI, R.; BARTOLONI SAINT OMER, F.; CALZOLARI, A.; ORSI, A.; FESTIMANNI, F.; NOVELLI, G. P.Induzione della translocazione batterica nel ratto mediante dosi minime di endotossina. **Minerva Anestesiol**. v.59, n.9, p.419, 1993.
- GENARI, R.; ALEXANDER, J. W.; EAVES-PYLES, T. Effect of different combinations of dietary additives on bacterial translocation and survival in gut derived sepsis. **J. Parent. Enteral Nutr**. v.19, n.4, p.319-325, 1995.
- GO, L. L.; HEALEY, P.J.; WATKINS, S. C.; SIMMONS, R. L.; ROWE, M. I. The effect of endotoxina on intestinal mucosal permeability to bacteria in vitro. **Arch Surg**. v.130, p.53, 1995.
- GORIS R. J.; BOCKHOLTZ, W. Y.; VAN BEBBER, I. P.et al. Multiple-organ failure and sepsis without bacteria: an experimental model. **Arch Surg**. v.121, p.897, 1986.
- GORIS, J. A.; VAN BEBBER, I. P.T.; MOLLEN, R. M. H.; KOOPMAN, J. P.Does selective decontamination of the gastrointestinal tract prevent multiple organ failure? **Arch Surg**. v.126, p.561, 1991.
-

- GRANT, J. P.; SNYDER, B. A. Use of L glutamine in total parenteral nutrition. **Journal of Surgical Research**. v.44, p.506, 1988.
- GRAPHPAD SOFTWARE. **InStat guide to choosing and interpreting statistical tests**. San Diego California USA. Copyright 1992 - 1998 Graph Pad Software Inc. "<http://www.graphpad.com>"
- GRIFFITHS, R. D.; JONES, C. & PALMER, T. E. A. Six-month outcome of critically ill patients given glutamine-supplemented parenteral nutrition. **Nutrition**. Syracuse, v.13, n.4, p.295-302, 1997.
- HAJAR, N.; REPKA, J. C. D.; CANAN JUNIOR, L. W. Ação do pneumoperitônio com dióxido de carbono na translocação bacteriana em ratos. **Acta Cir Bras**. v.17, n.3, p.181, 2002.
- HAJAR, N. **O uso do azul de Evans para avaliar a permeabilidade vascular na colite induzida com ácido acético a 10% em ratos Wistar**. Curitiba, 1994. 81f. Dissertação de Mestrado - Departamento de Clínica Cirúrgica, Universidade Federal do Paraná.
- HOUDIJK, A. P.J.; RIDJSBURGER, E. R.; JANSEN, J. et al. Randomised trial of glutamine-enriched enteral nutrition on infections morbidity in patients with multiple trauma. **Lancet**. New York, v.352 n.9130, p.772, 1998.
- INOUE, Y.; PACITTI, A. J.; SOUBA, W. W.; FACS, ScD. Endotoxin increases hepatic glutamine transport activity. **Journal of Surgical Research**. v.54, n.5, p.393, 1993.
- INTERNATIONAL COMITTEE ON VETERINARY GROSS ANATOMICAL NOMENCLATURE. **Nomina anatomica veterinária**. 3ª Ed. New York: Ithaca, 1985.
- ISENBERG, H. D. **Essential procedures for clinical Microbiology**. American Society for Microbiology. Washington. 1998.
- JACOB, S.; WEIDEL, H.; GORDON, E. Bacterial action in development of irreversibility to transfusion in hemorrhagic shock in the dog. **Ann J Physiol**. v.179, p.523, 1954.
- JANSEN, N.J. G. et al. Methylprednisolone prophylaxis protects against endotoxin-induced death in rabbits. **Inflammation**. v.15, n.2, p.91, 1991.
- KELLY, J. L.; O'SULLIVAN, C.; O'RIORDAIN, M.; O'RIORDAIN, D.; LYONS, A.; DOHERTY, J.; MANNICK, J. A.; RODRICK, M. L. Is circulating endotoxina the trigger for the systemic inflammatory response syndrome seen after injury? **Annals of Surgery**. v.225, n.5, p.530, 1997.
- KIRSCHFINK, M. Controlling the complement system in inflammation. **Immunopharmacology**. v.38, n.2, p.51, 1997.
- KLIMBERG, V.S.; SOUBA, W. W.; DOLSON, D. J.; SALLOUM, R. M.; HAUTAMAKI, R. D.; PLUMLEY, D. A.; MENDENHALL, W. M.; BOVA, F. J.; KHAN, S. R.; HACKETT, R. L.; BLAND, K. I.; COPELAND III, E. M. Prophylactic glutamine protects the intestinal mucosa from radiation injury. **Cancer**. v.66, n.1, p.62, 1990.

-
- KNOBEL, E. Choque séptico e mecanismos de agressão tecidual. In: _____. **Condutas no paciente grave**. São Paulo: Atheneu, p.18-23, 1998.
- LEPINE, R.; NEUGEBAUER, E. A. M. Steroid controversy in sepsis and septic shock: a meta-analysis. **Critical Care Medicine**. v.23, p.1294, 1995.
- LILLEHEI, R. C. The intestinal factor in irreversible hemorrhagic shock. **Surgery**. v.42, p.1043, 1957.
- MA, J. W.; WELLS, C. L.; DEITCH, E. A. Genetic susceptibility to mucosal damage leads to bacterial translocation in a murine burn model. **J Trauma**. v.29, p.1245, 1989.
- MacFIE, J.; McNAUGHT, C. Glutamine and gut barrier function. **Nutrition**.v. 18, n.5, 2002.
- MANZURUL, S. M.; CHEN,K.; USUI, N.et al. Effects of endotoxin on intestinal hemodynamics, glutamine metabolism and function. **Surgery Today**. v.27, p.500, 1997.
- McNULTY, W. P.JR; LINARES, R. Hemorrhagic shock of germ free rats. **Am J Physiol**. v.1968, p.141, 1960.
- McCAULEY, R.; KONGS, E.; HALL, J. Glutamine and nucleotide metabolism within enterocytes. **J Parent Enteral Nutr**. v.22, n.2, p.105, 1998.
- MOCHIZUKI, H.; TROCKI, O.; DOMINIONI, L. et al. Mechanism of prevention of postburn hypermetabolism and catabolism by early enteral feeding. **Ann Surg**. v.200, p.297, 1984.
- MONTÓN, C. T. A. Lung inflammatory response in pneumonia. **Monaldi Arch Chest Dis**. v.53. n.1. p.56. 1998.
- MOORE, F. A.; MOORE, E. E. Evolving concepts in the pathogenesis of postinjury multiple organ failure. **Surgical Clinics of North America**. v.75, n.2, p.257, 1995.
- MOORE, F. A.; MOORE, E. E.; JONES, T. N.TEN versus TPN following major abdominal trauma: reduced septic morbidity. **J Trauma**. v.29, p.916, 1989.
- MOREHOUSE, J. L.; SPECIAL, R. D.; STEWART, J. J. Translocation of indigenous bacteria from the gastrointestinal tract of mice after oral ricinoleic acid treatment. **Gastroenterology**. v.91, p.673, 1986.
- NAGLERAL, L.; ZWEIFACH, B. W. Pathogenesis of experimental shock: II Absence of endotoxic activity in blood of rabbits subjected to graded hemorrhage. **J Exp Med**. v.114, p.195, 1961.
- NEWSHOLME, E. A.; PAARRY-BILINGS, M. Properties of glutamine release from muscle and its importance for the immune system. **Journal of Parenteral and Enteral Nutrition**.v.14, p.635, 1990.
- NOLAN, J. P.Endotoxin, reticuloendothelial function and liver injury. **Hepatology**. v.1, n.5, p.458, 1981.
-

- O'BOYLE, C. J.; MACFIE, J.; DAVE, K. et al. Alterations in intestinal barrier function do not predispose to translocation of enteric bacteria in gastroenterologic patients. **Nutrition**. Syracuse, v.14, n.4, p.358, 1998.
- O'DWYER, S. T.; SMITH, R. J.; HWANG, T. L.; WILMORE, D. W. Maintenance of small bowel mucosa with glutamine - enriched parenteral nutrition. **JPEN**. v.13, nº 6, p.579, 1989.
- OFFENBARTL, K.; BENGMARK, S. Intraabdominal infections and gut origin sepsis. **World J Surg**. v.14, p.191, 1990.
- OUCHTERLONY, O. Diffusion-in-gel methods for immunological analysis. **Prog. Allergy**. v.5, p.1, 1958.
- PARILLO, J. E. Pathogenetic mechanisms of septic shock. **The New England Journal of Medicine**. v.328, n.20, p.1471, 1993.
- POWELL-TUCK, J. O.; JAMIESON, C. P. & BETTANY, G. E. A. A double-blind-randomized controlled trial of glutamine supplementation in parenteral nutrition. **Gut**. London, v.45, n.1, p.82, 1999.
- PUREN, A. J.; FELDMAN, C.; SAVAGE, N.; BECKER, P.J.; SMITH, C. Patterns of cytokine expression in community-acquired pneumonia. **Chest**. n.107, v.5, p.1342. 1995.
- ROCHA, S. L. **Recuperação em órgãos e tecidos de *Escherichia coli* ATCC 25922, inoculada no íleo terminal de ratos com obstrução biliar prolongada**. Curitiba, 2000. Tese (Doutorado em Clínica Cirúrgica) – Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná
- RODRIGUEZ, J. A.; TORBATI, D.; WASHINGTON, T.; ESPINOZA, C. G.; HENEGHAN, J. B.; O'LEARY, J. P. Jejunoileal bypass-induced liver dysfunction and bacterial translocation: effect of intraluminal glutamine infusion. **The American Surgeon**. 61, 5: 397, 1995.
- RUSH, B. F. JR.; REDAN, J. A.; FLANAGAN, J. J. JR. Does the bacteremia observed in hemorrhagic shock have clinical significance? **Ann Surg**. v.210, p.342, 1989.
- SAADIA, M.; SCHEIN, M.; MACFARLANE, C.; BOFFARD, K. D. Gut barrier function and the surgeon. **Br. J. Surg**. v.77, p.487, 1990.
- SALVALAGGIO, P.R. O. **Efeito da glutamina sobre a translocação bacteriana em ratos com oclusão intestinal**. Curitiba, 2000. Dissertação (Mestrado em Clínica Cirúrgica) – Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná.
- SCHEPPACH, W.; DUSEL, G.; KUHN, T.; LOGES, C.; KARCH, H.; BARTRAM, H-P.; RICHTER, F.; CHRISTL, S. U.; KASPER, H. Effect of L-glutamine and n-butyrate on the restitution of rat colonic mucosa after acid induced injury. **Gut**. v.38, p.878, 1996.
- SCHIMPL, G.; PESENDORFER, P.; STEINWENDER, G.; FEIERL, G.; M, RATSCHKE, M.; HÖLLWARTH, M. E. Allopurinol and glutamine attenuate bacterial translocation in chronic portal hypertensive and common bile duct ligated growing rats. **Gut**. v.39, p.48, 1996.
-

- SCHLAG, G.; REDL, H.; HALLSTRÖM, S. The cell in shock: the origin of multiple organ failure. **Resuscitation**.v.21, p.137, 1991.
- SCHWEINBURG, F. B.; SELIGMAN, A. M. ; FINE, J. Transmural migration of intestinal bacteria: A study based on the use of radioactiva Escherichia coli. **N Engl J Med**. v.242, p.747, 1950.
- SMITH, R. J.; WILMORE, D. W. Glutamine nutrition and requeriments. **Journal of Parenteral and Enteral Nutrition**.v.14, p.945, 1990.
- SOUBA, W. W.; HAUTAMAKI, D.; MENDENHALL, W. Oral glutamine reduces bacterial translocation following abdominal radiation.**J Surg Res**. v.48, p.1, 1990.
- SOUBA,W. W.; HERSKOWITZ, K.; KLIMBERG,V.S. et al. The effect of sepsis and endotoxemia on gut glutamine metabolism. **Ann.Surg**. v.211, n.5, p.543, 1990.
- SPAETH, G.; GOTTWALD, T. & HAS, W. Glutamine peptide does not improve gut barrier function and mucosal immunity in total parenteral nutrition.**J Parent Enteral Nutr**. Baltimore, v.17, n.4, p.317, 1993.
- SPRONG, R. C.; AARSMAN, C. J. M.; van OIRSCHOT, J. F. L. M.; van ASBECK, B. S. Dimethylthiourea protects rats against Gram-negative sepsis and decreases tumor necrosis factor and nuclear factor kB activity. **J Lab Clin Med**. v.129, nº 4, p.470, 1986.
- STEINBERG, S.; FLYNN, W.; KELLEY, K.; BITZER, L.; SHARMA, P; GUTIERREZ, C.; BAXTER, J.; LALKA, D.; SANDS. A.; VAN LIEW, J.; HASSETT, J.; PRICE, R.; BEAM, T.; FLINT, L. Development of a bacteria-independent model of the multiple organ failure syndrome. **Arch Surg**. v.124, p.1390, 1989.
- SWANK, G. M.; DEITCH, E. A. Role of the gut in multiple organ failure: bacterial translocation and permeability changes. **World J. Surg**. v.20, n.4, p.411, 1996.
- TILNEY, N.L.; BAILEY, G. L.; MORGAN, A. P.Sequential systems failure after rupture of abdominal aortic aneurysms: An unsolved problem in postoperative care. **Ann Surg**. v.178, p.117, 1973.
- TORRES, O. J. M. **Translocação bacteriana efeito da dieta imunoestimuladora em ratos submetidos a oclusão intestinal**. Curitiba: Tese (Doutor em Clínica Cirúrgica) – Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, 1997.
- TRACEY, K. J.; BEUTLER, B.; LOWRY, S. F. et al. Shock and tissue injury induced by recombinant human cachetin.**Science**. v.234, p.470, 1986.
- TRAYA, G. **Efeito do tempo de obstrução biliar extra-hepática sobre a translocação bacteriana, endotoxemia e fator de necrose tumoral alfa: estudo experimental em ratos**. Curitiba, 1998. Dissertação (Mestrado em Clínica Cirúrgica) – Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná.
-

- UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ. **Normas para apresentação de documentos científicos**. Biblioteca Central. Curitiba: Editora da UFPR, v.10, 2000.
- Van ACKER, B. A. C.; Von MEYENFELDT, M. F.; TIEBOSCH, A. et al. Glutamine : the pivot of our nitrogen economy ? **J Parent Enteral Nutr.** v.23, n.5, p.448, 1999.
- VIANA, J. X. **Plaquetopênia e fenômeno de Sanarelli-Schwartzman**. Curitiba, 1948. 301f. Tese (Concurso para professor catedrático). Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná.
- WELLS, C. L.; MADDAUS, M. A.; SIMMONS, R. L. Proposed mechanisms for the translocation of intestinal bacteria. **Rev Infect Dis.** v.10, n.5, p.958, 1988.
- WEST, M. A.; KELLER, G. A.; HYLAND, B. J. Hepatocyte function in sepsis: Kupffer cells mediate a biphasic protein synthesis response in hepatocytes after exposure to endotoxin or killed *Escherichia coli*. **Surgery.** v.98, p.388, 1985.
- WILMORE, D. W.; SHABERT, J. K. Role of glutamine in immunologic responses. **Nutrition.** v.14, 7-8, p.618, 1998.
- WILMORE, D. W.; SMITH, R. J.; O'DWYER, S. T. The gut - a central organ following surgical stress. **Surgery,** v.104, p.917, 1988.
- WITTMANN, D. H.; SYRRAKOS, B.; WITTMANN, M. M. Advances in the diagnosis and treatment of intraabdominal infection. In: *Problems in general surgery*. Philadelphia: **JB Lippincot.** v.10, p.604, 1993.
- WONG, T. C. A study on the generalized Schwartzman reaction in pregnant rats induced by bacterial endotoxin. **Am J Obst & Gynec.** Quebec, v.84, n.6, p.786, 1962.
- XU, D.; QI, L.; THIRSTRUP, C. et al. Elemental diet-induced bacterial translocation and immunosuppression is not reversed by glutamine. **J. Trauma.** Baltimore, v.3, n.6, p.821, 1993.
- ZAPATA-SIRVENT, R. L.; HANSBROUGH, J. F.; OHARA, M. M. et al. Bacterial translocation in burned mice after administration of various diets including fiber and glutamine enriched- enteral formulas. **Crit. Care. Med.** v.22, n.4, p.690. 1994.
- ZENI NETO, C.; CAMPOS, A. C. L.; COELHO, J. C. U. et al. Translocação bacteriana em ratos com oclusão intestinal. Efeito do nível da oclusão e da isquemia. **Rev.Col. Bras. Cir.** Rio de Janeiro, n.24, v.2, p.111, 1997.
-