

ANA CRISTINA BORDÓN DE CORVALÁN

**SUPLEMENTAÇÃO NUTRICIONAL COM GLUTAMINA  
NA VIGÊNCIA DE COLITE INDUZIDA EM RATOS  
WISTAR**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica do Setor de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do Grau Acadêmico de Doutor.

Orientador: Prof. Dr. João Carlos Domingues Repka

CURITIBA  
1995

**BORDÓN DE CORVALÁN, Ana Cristina**

**SUPLEMENTAÇÃO NUTRICIONAL COM GLUTAMINA NA  
VIGÊNCIA DE COLITE INDUZIDA EM RATOS WISTAR. / Ana  
Cristina Bordón de Corvalán**

**\_\_\_ Curitiba, 1995. 50p. 28 cm**

**(Tese - Doutorado - Universidade Federal do Paraná)**

**Orientador: Prof. Dr. João Carlos Domingues Repka**

**1. Glutamina**

**2. Colite induzida**

**3. Ácido acético**

**4. Ratos**

**5. Azul de Evans**

**6. Permeabilidade vascular**



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
SETOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
DEPARTAMENTO DE CIRURGIA  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CLÍNICA CIRÚRGICA  
NÍVEIS MESTRADO - DOUTORADO

**PARECER CONJUNTO DA COMISSÃO EXAMINADORA DA  
AVALIAÇÃO - TESE DE DOUTORADO**

*Aluna: Ana Cristina Bordon de Corvalan*

*Título da Tese/Dissertação: "Suplementação Nutricional com Glutamina na Vigência de Colite Induzida em Ratos Wistar".*

**CONCEITOS EMITIDOS:**

<i>Prof. Dr. Jurandir Marcondes Ribas Filho</i>	- Conceito emitido <i>A</i>	Equivalência <i>10 (dez)</i>
<i>Prof. Dr. Luiz Fernando Kubrusly</i>	- Conceito emitido <i>A</i>	Equivalência <i>10 (dez)</i>
<i>Prof. Dr. Benito Frutos</i>	- Conceito emitido <i>A</i>	Equivalência <i>10 (dez)</i>
<i>Prof. Dr. David Vanuno</i>	- Conceito emitido <i>A</i>	Equivalência <i>10 (dez)</i>
<i>Prof. Dr. Osvaldo Malafaia</i>	- Conceito emitido <i>A</i>	Equivalência <i>10 (dez)</i>

**Conceito Final de Avaliação:**

*Curitiba, 07 de dezembro de 1995*

*Jurandir Marcondes Ribas Filho*  
\_\_\_\_\_  
*Prof. Dr. Jurandir Marcondes Ribas Filho*

*Luiz Fernando Kubrusly*  
\_\_\_\_\_  
*Prof. Dr. Luiz Fernando Kubrusly*

*Benito Frutos*  
\_\_\_\_\_  
*Prof. Dr. Benito Frutos*

*David Vanuno*  
\_\_\_\_\_  
*Prof. Dr. David Vanuno*

*Osvaldo Malafaia*  
\_\_\_\_\_  
*Prof. Dr. Osvaldo Malafaia*

**Orientador: Prof. Dr. João Carlos Domingues Repka**

*Ao meu pai e à minha mãe,  
por todos os dias da minha vida.*

*Ao meu marido Diego, que com amor transforma  
os momentos de cotidiana realidade, em  
felicidade.*

*Aos meus filhos Silvia Cristina e Diego, por  
constituírem a forma e a cor dos meus sonhos.*

*É bom se sentir no ponto onde as paralelas se encontram*  
***anônimo***

## AGRADECIMENTOS

Ao **Prof. Dr. Osvaldo Malafaia**, que ao final desta longa jornada de trabalho, minhas palavras de agradecimento perderam um tanto a formalidade da hierarquia, para se encher dos sabores da simplicidade e da amizade.

Ao **Prof. Dr. João Carlos Domingues Repka**, pela orientação deste trabalho, e acima de tudo, pela sincera amizade.

Ao **Dr. Paulo César Andriguetto**, pela sua qualidade humana, tornou o trabalho conjunto numa experiência muito leve.

Ao **Prof. Dr. José Bellassai**, por ter colocado mais uma vez a amizade e o interesse científico sobre as dificuldades corriqueiras, e ter-nos ajudado na realização dos estudos histopatológicos.

Ao **Prof. Luiz Gonzaga Caleffe**, coordenador do Laboratório de Estatística da Universidade Federal do Paraná, pela precisa e gentil orientação nas avaliações estatísticas desta tese.

Ao **Dr. Nemer Hajar** e a sua esposa **Laila Hajar**, pela amizade, e presenças constantes em todos os momentos.

À **Dra. Silvânia Klug Pimentel**, pelo apoio concreto na realização da parte experimental deste trabalho.

À **Dra. Cristiane Kist** pela amizade e confiança.

Ao **Dr. Luiz Felipe Paula Soares** pela oportunidade de crescimento profissional e pela confiança em mim depositada.

À **Elizabeth Kotsias** pelo auxílio gentil na tradução de documentos.

À **Thereza Cristina d'Avila Winckler** pela amizade e carinhosa acolhida.

Aos amigos **Dr. Sérgio Ricardo Penteado**, **Pablo Fabián Avilés Cabrera**, **Gustavo Klug Pimentel** e **Mauricio Becher**, pelos auxílios oferecidos nos momentos da realização experimental desta tese.

Aos **Professores Dr. Ulrich Andreas Dietz** e **Dr. Nicolau Czezko** pelo apoio e conselhos oportunos.

Ao **Prof. Dr. Benito Frutos** pela confiança e incentivo constantes.

À **Marlei Benedita Ribeiro**, pela amizade sincera e apoio em todos os momentos.

Aos amigos do Hospital Santa Cruz, especialmente os **Doutores Luiz Fernando Kubrusly**, **Rogério Rehme**, **César Augusto Baggio Pereira**, **Paulo Sérgio Matschinske**, **Antonio Carlos Pimpão**, e **Williams Zanatta**, pela amizade e estímulo constante.

À **TECPAR** (Instituto de Tecnologia do Paraná), pelo fornecimento do animal para experimento.

À **Faculdade Evangélica de Medicina**, por ceder as dependências de seu laboratório de Imunologia e Microbiologia para a realização da parte experimental desta tese.

À **CAPES**, pela concessão da bolsa de estudo que possibilitou a finalização do projeto de pesquisa.

As minhas irmãs e cunhadas pela atenção e carinho dispensados aos meus filhos, em todos os momentos.

## SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS .....	viii
LISTA DE FIGURAS .....	ix
LISTA DE GRÁFICOS.....	x
LISTA DE TABELAS .....	xi
RESUMO .....	xii
ABSTRACT .....	xii
<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
1.1 OBJETIVOS.....	5
<b>2 REVISÃO DA LITERATURA.....</b>	<b>6</b>
<b>3 MATERIAL E MÉTODO .....</b>	<b>20</b>
3.1 AMOSTRA.....	21
3.1.1 Distribuição dos animais - Grupos de experimento .....	21
3.2 SOLUÇÕES E REAGENTES.....	22
3.2.1 Glutamina.....	22
3.2.2 Ácido acético a 10%.....	23
3.2.3 Azul de Evans.....	23
3.2.4 Formamida .....	24
3.2.5 Formalina .....	24
3.3 INDUÇÃO DO PROCESSO INFLAMATÓRIO.....	24
3.3.1 Jejum e lavagem intestinal.....	24
3.3.2 Indução anestésica.....	24
3.3.3 Indução da colite .....	24
3.4 DIETA COM GLUTAMINA .....	24
3.4.1 Inoculação intragástrica .....	24
3.5 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS .....	26
3.5.1 Inoculação do azul de Evans.....	26
3.5.2 Sacrifício .....	27
3.5.3 Processamento dos fragmentos de cólon.....	27
3.6 MÉTODOS DE AFERIÇÃO.....	27
3.6.1 Dosagem do azul de Evans no tecido colônico .....	27



3.6.2 Aferição histológica dos fragmentos de cólon .....	28
3.7 AFERIÇÃO ESTATÍSTICA .....	29
3.7.1 Análise de regressão linear e correlação .....	29
3.7.2 Escala nominal dos achados histológicos.....	30
3.7.3 Análise de variância .....	30
<b>4 RESULTADOS .....</b>	<b>31</b>
4.1 CONCENTRAÇÃO DO AZUL DE EVANS NOS FRAGMENTOS COLÔNICOS .....	32
4.2 AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA DOS FRAGMENTOS COLÔNICOS.....	33
4.3 AFERIÇÃO ESTATÍSTICA DOS VALORES DE AZUL DE EVANS NO TECIDO COLÔNICO .....	37
4.4 AFERIÇÃO ESTATÍSTICA DOS ACHADOS HISTOLÓGICOS .....	37
<b>5 DISCUSSÃO .....</b>	<b>39</b>
<b>6 CONCLUSÕES.....</b>	<b>44</b>
<b>7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>46</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS

$\mu\text{g}$  = micrograma

$\text{mg}$  = miligrama

$\text{g}$  = grama

$\text{kg}$  = kilograma

$\mu\text{l}$  = microlitro

$\text{ml}$  = mililitro

$\text{l}$  = litro

$\text{mm}$  = milímetro

$\text{cm}$  = centímetro

$^{\circ}\text{C}$  = graus Celsius

$\text{pH}$  = potencial de hidrogênio

$\text{nm}$  = nanômetro

' = minuto

" = segundo

$\text{h}$  = hora

$\text{d}$  = dia

$\text{NPT}$  = nutrição parenteral total

$\text{GLN}$  = glutamina

$\text{m/v}$  = massa/volume

$\text{v/v}$  = volume/volume

$\text{mmol}$  = milimoles

$\text{cGy}$  = centigyger

## LISTA DE FIGURAS

1	Fórmula estrutural da glutamina.....	2
2	Preparo da solução de GLN (3g de GLN diluídas em 100 ml de solução fisiológica).....	23
3	A solução de GLN e a seringa com a sonda metálica utilizada para inoculação intragástrica.....	25
4	Rato Wistar submetido à inoculação intragástrica da GLN .....	25
5	Acesso ao estômago de rato Wistar durante a inoculação intragástrica de GLN.....	26
6	Demonstrativo das escalas para transformação dos valores nominais das alterações histológicas, em valores numéricos .....	30
7	Fotomicrografia do tecido colônico no 7º dia pós-indução da colite, correspondente a rato do grupo I.1-Reepitelização da mucosa. 2-Discreto infiltrado leucocitário. Hematoxilina e eosina, aumento de 10 vezes. ....	34
8	Fotomicrografia do tecido colônico no 7º dia pós-indução da colite, correspondente a rato do grupo II. 1-Área de reepitelização da mucosa. 2-Dilatação cística. Hematoxilina e eosina, aumento de 10 vezes. ....	35
9	Fotomicrografia do tecido colônico no 7º dia pós-indução da colite, correspondente a rato do grupo III. 1-Reepitelização da mucosa. 2-Restauração da arquitetura glandular. Hematoxilina e eosina, aumento de 10 vezes.....	35
10	Fotomicrografia do tecido colônico no 7º dia pós-indução da colite, correspondente a rato do grupo IV. 1-Ulceração da mucosa. 2-Infiltrado e hemorragia da submucosa. 3-Necrose coagulativa muscular. Hematoxilina e eosina, aumento de 4 vezes .....	36
11	Fotomicrografia do tecido colônico no 7º dia pós-indução do processo inflamatório correspondente a rato sem tratamento nenhum (gentileza do Dr. Nemer Hajar, 1994).1-Ulceração da mucosa. 2-Necrose da muscular. 3-Infiltrado leucocitário. 4-Hemorragia. Hematoxilina e eosina, aumento de 10 vezes.....	36

## LISTA DE GRÁFICOS

1	Distribuição gráfica das dosagens médias do azul de Evans ( $\mu\text{g/g}$ ) extraído dos fragmentos colônicos e valores de referência (BORDÓN DE CORVALÁN e HAJAR, 1994) .....	33
---	--	----

## LISTA DE TABELAS

1	Demonstrativo dos períodos e grupos de estudo.....	22
2	Graduação histológica. Indução.....	28
3	Graduação histológica. Reparo.....	29
4	Demonstrativo das médias dos resultados das dosagens do azul de Evans ( $\mu\text{g/g}$ ) extraídos dos fragmentos colônicos. Grupos I, II, III e IV, e os valores de referência do cólon normal e do cólon com colite sem tratamento.....	32
5	Graduação histológica. (Indução e reparo) .....	33
6	Demonstrativo da conversão numérica dos valores nominais.....	34
7	Demonstrativo das médias das concentrações de azul de Evans no tecido colônico, submetidos ao teste de Tukey.....	37
8	Demonstrativo das diferenças entre grupos.....	37
9	Demonstrativo das medianas dos valores numéricos da avaliação histológica submetidos ao teste de Mann-Whitney para os pares.....	38
10	Demonstrativo das diferenças entre grupos.....	38

## RESUMO

A glutamina é um aminoácido não essencial, mas componente necessário para a síntese de proteínas e nucleotídeos, sob a condição de substrato energético para células de proliferação rápida como fibroblastos, linfócitos, enterócitos e colonócitos, e ainda ao transporte de nitrogênio e amônia para o fígado e rins. Este estudo investiga o efeito da suplementação com glutamina, sobre o tecido colônico na colite induzida com ácido acético a 10% em ratos Wistar, avaliado através da determinação do azul de Evans tecidual e histologia. Hipotetizamos que a suplementação acelera o reparo da mucosa colônica neste modelo experimental de processo inflamatório. Para tanto, estudaram-se 34 ratos, machos da linhagem Wistar-Tecpar com pesos compreendidos entre 239,4 g e 330,2 g, divididos em quatro grupos. Grupo I: (n=6) os ratos receberam 30 mg de glutamina intragástrica desde 7 dias antes da indução até o dia do sacrifício. Grupo II: (n=8) a glutamina foi administrada durante 7 dias antes da indução e posteriormente suspensa. Grupo III: (n=10) os animais receberam a suplementação com glutamina a partir do dia da indução da colite até o sacrifício. Grupo IV: (n=10) considerado o grupo controle recebeu solução salina a 0,9 % antes e após indução até o sacrifício. Todos os ratos foram anestesiados diariamente com éter sulfúrico para inoculação intragástrica, tanto da solução de glutamina como a fisiológica. No 7º dia pós-indução e 8 h antes do sacrifício, os animais foram inoculados com azul de Evans a 2,5 %, na dose de 20 mg/kg. Após o sacrifício com inalação letal de éter sulfúrico, foram obtidos fragmentos colônicos para a determinação do azul de Evans tecidual, e avaliação histológica. Os valores médios das dosagens do azul de Evans dos fragmentos colônicos, obtidos por espectrofotometria, foram: grupo I 44,45 µg/g; grupo II 48,31 µg/g; grupo III 33,76 µg/g e grupo IV 65,14 µg/g. Os resultados das medianas da avaliação histológica foram: grupo I 5; grupo II 15; grupo III 0 e grupo IV 20. Houve diferença significativa entre as médias das concentrações do azul de Evans dos grupos I, II e III comparados com o controle, e quando comparados os valores dos grupos I e II com o III. A melhora histológica dos grupos I e II não foi significativa quando comparada com o controle. Observou-se melhora estatisticamente significativa quando comparado o grupo III com o IV, e III com o II. Estes resultados permitiram concluir que a suplementação com glutamina acelerou o reparo da mucosa colônica, verificado através da melhora estatisticamente significativa dos parâmetros estudados, quando a suplementação com glutamina iniciou-se após a indução do processo inflamatório. Este estudo evidencia a importância da GLN como componente essencial após injúria colônica, acelerando o processo de restauração da mucosa.

## ABSTRACT

Glutamine is classified as a non essential aminoacid, which mislead and underestimated its importance as an indispensable nutrient in times of critical illness. Glutamine has multiple functions, one of the most important of which is as a vehicle for the transfer of nitrogen between tissues. In addition glutamine is a regulator of protein synthesis, the most important substrate for renal ammoniagenesis, and an essential precursor for nucleic acid biosynthesis in all cells. It is a key fuel for the intestinal mucosa and other rapidly dividing cells such as fibroblasts, vascular endothelial cells and lymphocytes. The aim of this study is to evaluate the effects of glutamine on Evans blue concentration and histology of colonic tissue, after acetic acid induced colitis. Thirty four male, adults, Wistar-Tecpar rats weighing between 239,4 g and 330,2 g, were used for experiments. There were randomized to four groups of ten animals each. Glutamine was administered intra-gastrically in a daily dose of 30 mg. Group I: (n=6) glutamine was administered seven days before colitis induction and after, until sacrifice. Group II: (n=8) animals of this group received glutamine seven days before induction and after that, glutamine free diet. Group III: (n=10) received glutamine since the moment of colitis induction until sacrifice. Group IV: (n=10) known as control group, received saline solution throughout all experiment period of time. Rats were also allowed *ad libitum* intake of standard rat chow and water. Animals were under light anesthesia for intra-gastrically feeding. At the 7th post-induction day, and 8h before sacrifice, rats were inoculated intravenously with 20 mg/kg of Evans blue dye. Overdose of inhalatory ether was used to kill animals. A midline incision was made and 3 cm of distal colon removed for Evans blue espectrofotometric determination and histological evaluation. The mean values of Evans blue in colonic tissue were for group I: 44,34  $\mu\text{g/g}$ ; group II: 48,31  $\mu\text{g/g}$ ; group III: 33,76  $\mu\text{g/g}$  and for group IV: 46,89  $\mu\text{g/g}$ . The median values of histological numerical score were for group I: 5; group II: 15; group III: 0 and for group IV: 20. There was a statistically significant difference between the mean values of Evans blue colonic concentration of groups I, II and III when compared to control, and also significant when compared group I and II to III. A statistically significant improvement was found at the histological patterns of group III when compared to control, and also significant differences when compared group II to group III. The most significant benefits of glutamine supplementation were demonstrated when administered after induction of colitis. The current study demonstrates that glutamine may be an essential dietary component after colonic damage when repair is necessary, accelerating mucosal healing.

# **1 INTRODUÇÃO**



## 1 INTRODUÇÃO

O aminoácido glutamina foi considerado uma molécula biologicamente importante há mais de 100 anos, quando foram sugeridas em 1873 por HLASIWETZ e HABERMANN, evidências indiretas de que seria um dos componentes estruturais das proteínas. SCHULZE e BOSSHARD, em 1883, demonstraram que a glutamina livre ocorria em certas plantas mas relativamente pouco se conhecia sobre seu metabolismo, até que DAMODARAN, JAABACK e CHIBAAL, em 1932, identificaram-na diretamente como componente de proteínas, e ainda HANS KREBS em 1932, descreveu, a capacidade dos tecidos de mamíferos, em hidrolisar e sintetizar a glutamina (apud SMITH, 1990).

Os primeiros estudos estabeleceram que a glutamina, como nutriente, não era requerida por animais e humanos, sendo desta forma classificada como aminoácido não essencial. Os detalhes específicos destes experimentos não foram relatados claramente, encontrando-se dificuldades para estabelecer bases bioquímicas consolidadas para confirmar que a glutamina nutricionalmente, não é essencial.

É um aminoácido neutro com peso molecular de 147.1 e um dos três aminoácidos que contêm o grupo amida como parte da cadeia lateral.

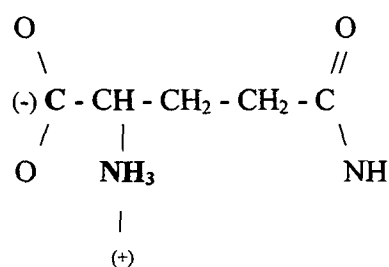


Figura 1 - Fórmula estrutural da glutamina

O nitrogênio desta amida é requerimento absoluto para a biossíntese de ácidos nucleicos em todas as células. Virtualmente todos os tecidos apresentam um elenco enzimático necessário para sintetizar glutamina (glutamino-sintetase), além de que alguns órgãos necessitam extração de grandes quantidades de glutamina para suportar o metabolismo e função celular (células epiteliais intestinais). A síntese de glutamina ocorre principalmente no músculo esquelético e no cérebro (SOUBA, SMITH, WILMORE, 1985)(1).

É o aminoácido livre mais abundante do organismo e o de maior concentração em sangue total, representando mais de 60% do conteúdo intracelular de aminoácidos livres. A maioria desta glutamina livre é sintetizada e armazenada no músculo esquelético, onde a concentração é 30 vezes maior que na circulação (ROTH, KARNER, OLLENSCHLAGER, 1990).

O conceito de que a glutamina poderia ter uma propriedade metabólica importante, emerge das observações de HARRY EAGLE, nos anos cinquenta (apud SMITH, 1990), quando foram estabelecidas suas propriedades como nutriente essencial das células multiplicadas em culturas. A observação de que as células cultivadas *in vitro* requerem glutamina, levou à formulação de grande número de estudos durante os últimos trinta e cinco anos, nos quais têm sido remarcadas a relação próxima entre o grau de proliferação celular e o consumo de glutamina, nos diferentes tipos celulares.

A maior parte das pesquisas *in vivo* sobre a glutamina, têm sido desenvolvidas em animais. Estudos experimentais nas últimas duas décadas têm demonstrado que o trato gastrointestinal é o principal órgão de utilização da glutamina (SOUBA, SMITH e WILMORE, 1985)(2). Este fato é particularmente importante no sentido metabólico, porque a utilização da glutamina pelas células epiteliais do intestino, fornece a maior fonte energética para a mucosa e processa o nitrogênio e carbono da dieta e de outros tecidos em precursores para a ureagênese e gliconeogênese hepática.

Esta habilidade intestinal é muito mais importante em estados catabólicos, quando a depleção da glutamina pode ser severa e a nutrição oral estar interrompida pela severidade da doença. Inúmeros estudos têm demonstrado que durante estresse, a glutamina pode ser componente dietético importante para a manutenção das funções, metabolismo e estrutura da mucosa intestinal. Estes requerimentos poderiam ser devidos ao fato da glutamina ser essencial para a biossíntese dos ácidos nucleicos (SOUBA, HERSKOWITZ, SALLOUM, CHEN e AUSTGEN, 1990).

Estudos animais de terapias nutricionais com dietas enriquecidas com glutamina demonstraram que a glutamina tem efeito protetor sobre a mucosa do estômago contra as ulcerações produzidas pela aspirina (OKABE, HONDA e TAKEUCHI, 1975, apud SMITH,1990) e utilidade no tratamento de úlceras pépticas (SHIVE, SNIDER e DEBILLER, 1957, apud SMITH,1990).

Estudos da década de oitenta, refletem a reavaliação das funções nutricionais e empregos clínicos potenciais da glutamina. A nutrição parenteral prolongada atrofia a mucosa intestinal, mas quando adicionada glutamina às soluções de NPT, são mantidas as características histológicas das mucosas do estômago, jejuno e cólon (GRANT e SNYDER, 1988). A NPT pode promover translocação bacteriana no intestino de ratos (ALVERDY, AYOS e MOSS, 1988), no entanto a adição de glutamina a estas soluções de NPT reduz os níveis de translocação bacteriana significativamente (BURKE, ALVERDY, AOYS e MOSS, 1989). Esta redução foi associada à normalização dos níveis de Ig A secretória e à diminuição da aderência bacteriana aos enterócitos, sugerindo que a glutamina estimula o sistema imune do intestino (ALVERDY, 1990; CALDER, 1994).

Outros estudos demonstraram que o suporte nutricional com glutamina poderia resultar numa terapia adjuvante importante em pacientes com injúria intestinal secundária à quimioterapia e radioterapia. A adição de glutamina à dieta elementar enteral, resulta na redução significativa da severidade da enterocolite induzida pelo metotrexate, observando-se melhoras dos parâmetros morfométricos do jejuno e do cólon (FOX, KRIPKE, DEPAULA, BERMAN. SETTLE e ROMBEAU, 1988). A suplementação da dieta com glutamina a 3%, reduz o índice de translocação bacteriana observada em ratos, após enterite induzida por irradiação do abdome. A histologia do jejuno demonstra incremento na altura e número das vilosidades, e quase duas vezes o número de mitose por cripta (SOUBA, KLIMBERG, HAUTAMAKI, MENDENHALL, BOVA, HOWARD, BLAND e COPELAND III, 1990). No entanto, outros autores não conseguiram obter resultados similares, quando a suplementação alimentar com glutamina não determinou a restauração dos parâmetros histológicos (SCOTT e MOELLMAN, 1992).

Muitas e importantes conclusões foram publicadas em 1993, entre estas, a demonstração do efeito estimulante da glutamina sobre a síntese protéica de células epiteliais isoladas do intestino, sendo então, relacionado à provisão de energia (HIGASHIGUCHI, HASSELGREN, WAGNER e FISCHER, 1993). Estes achados foram interpretados como o

mecanismo pelo qual a glutamina exerce sua ação protetora sobre a mucosa intestinal durante estados críticos.

Devido à sua instabilidade química, a glutamina é um aminoácido não incluído em soluções usuais de nutrição parenteral, pois quando em solução, sofre hidrólise num período curto de tempo, mas este processo pode ser influenciado ajustando o pH e a temperatura da solução (SOUBA, HERKOWITZ, AUSTGEN, CHEN e SALLOUM, 1990). Em alguns estudos tentaram evitar esta dificuldade, utilizando soluções contendo os dipeptídeos da glutamina (glycyl-L-glutamina, alanil-L-glutamina) os quais mais estáveis, podem ser utilizados por via parenteral, (BABST, HÖRIG, STEHLE, BRAND, FILGUEIRA, MARTI, FISCHER, OBERHOLZER, GUDAT, FÜRST e HEBERER, 1993).

Durante a vigência da doença inflamatória intestinal, a provisão de glutamina exógena resulta em melhor suporte metabólico perante os requerimentos do intestino possivelmente diminuindo o catabolismo protéico, evitando a depleção plasmática e muscular da glutamina (SOUBA, SMITH e WILMORE, 1985)(2), preservando a integridade da mucosa colônica (YOSHIMURA, MOCHIZUKI, YOSHIKUMI, YAMAMOTO, e TAMAKUMA, 1993), intensificando o processo de reparo da mucosa (WEIR, ANDERSON, MCCAIGUE, HALLIDAY e ROWLANDS, 1993) e mantendo o conteúdo de nitrogênio e altura das células epiteliais (GRANT e SNYDER, 1988).

Baseados nestes estudos, hipotetizamos que a suplementação oral com glutamina em ratos submetidos a colite induzida com ácido acético a 10% exerceria uma ação trófica positiva para aceleração da recuperação da mucosa.

### 1.1 OBJETIVOS

1- Estudar o efeito da suplementação nutricional com glutamina sobre a colite induzida experimentalmente pelo ácido acético a 10%, através da avaliação das alterações histológicas e da permeabilidade vascular.

2- Determinar qual o melhor período para a administração da glutamina, em relação ao momento da indução.

## **2 REVISÃO DA LITERATURA**

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

O trato gastrintestinal tem sido considerado como órgão de absorção e digestão de nutrientes provenientes da luz intestinal, dispensando estes para a circulação. Recentes estudos têm demonstrado que as células do aparelho digestivo metabolizam ativamente os substratos da nutrição. Esta revisão enfocará o metabolismo intestinal da GLN, e a sua importância em diversos estados fisiopatológicos. O conhecimento das propriedades deste aminoácido em estado normal e catabólico, possibilitará seu uso em terapias de suporte mais efetivas.

As células do trato gastrintestinal, como os enterócitos e colonócitos, renovam-se rapidamente requerendo energia para a maturação celular e metabolização de substratos absorvidos. Em 1982, ROEDIGER, estudou a utilização por células isoladas de cólon de ratos, dos substratos circulantes como a GLN, glicose e corpos cetônicos, em conjugação com os mais importantes substratos intraluminais, o acetato, propionato e n-butirato (ácidos graxos de cadeia curta, provenientes do metabolismo de fibras da dieta pelas bactérias da luz colônica). As células colônicas isoladas foram expostas aos diferentes substratos, e calculado o consumo de oxigênio. Os resultados demonstraram que as células colônicas utilizaram os substratos respiratórios no seguinte ordem de preferência: n-butirato, acetato, glutamina e glicose.

Em 1985, SOUBA SMITH e WILMORE verificaram os efeitos dos corticóides sobre o metabolismo da glutamina em diferentes órgãos. Utilizaram 25 cães, cateterizados para infusão de 0,44 mg/kg de dexametasona por dia durante 2 e 9 dias. A captação de glutamina pelo intestino foi o dobro sob a ação do corticóide. A alanina foi produzida pelo intestino, e sua liberação foi duas vezes maior. Após o tratamento com dexametasona as concentrações circulantes de glutamato e glutamina caíram, no entanto os níveis de alanina e glicose aumentaram. O balanço hepático da glutamina permaneceu inalterado, por outro lado, a captação e liberação renal de glutamina e de glicose aumentaram significativamente após dexametasona. O corticóide influenciou no metabolismo dos aminoácidos e da glicose no trato gastrintestinal, fígado e rins. Os marcados aumentos na captação de glutamina e produção de alanina pelo intestino após a ação da dexametasona, sugere a alteração do metabolismo gastrintestinal de aminoácidos que ocorre durante estados catabólicos, devido a ação dos hormônios do estresse, diminuindo os níveis de glutamina e acelerando a gliconeogênese.

FOX, KRIPKE, BERMAN, MCGINTEY, SETTLE e ROMBEAU, em 1988 realizaram estudo para determinar a atividade específica da glutaminase no jejuno e no cólon de ratos machos Sprague-Dawley. Com base em que os corticóides exógenos aumentam a captação e a utilização da glutamina pelo intestino, estes autores propuseram-se a investigar as influências dos mesmos sobre a atividade específica da glutaminase e da glutamino-sintetase intestinais. Os ratos receberam dieta elementar durante 7 dias. No quinto dia, foram divididos em 4 grupos que receberam solução salina, e três diferentes doses de dexametasona intramuscular 0,1 mg/kg, 0,3 mg/kg e 0,6 mg/kg. Após 48 h, segmentos colônicos e jejunais foram separados para ensaios de atividade específica da glutaminase e da glutamino-sintetase. Na dose de 0,6 mg/kg de dexametasona demonstrou-se um incremento significativo da atividade da glutaminase no cólon e no jejuno. Com esses resultados, concluíram que os mecanismos pelos quais os corticóides aumentam o consumo da glutamina pelo intestino estaria determinado pelo aumento da atividade específica da glutaminase intestinal.

GRANT e SNYDER, em 1988 avaliaram o efeito da adição de L-glutamina à solução de nutrição parenteral sobre o conteúdo de nitrogênio, histologia e atividade da enzima dissacaridase no estômago, intestino delgado e no cólon. Utilizaram 5 grupos de 6 ratos da linhagem Fisher que receberam: ração padrão para espécie, dextrose a 5% com vitaminas e eletrólitos, solução de nutrição parenteral total intravenosa e a mesma solução adicionando L-glutamina a 1 e 2%. Após 6 dias foram retiradas amostras para dosagem de nitrogênio total, atividade da sacarose, lactase e maltase. A altura da mucosa e infiltração lipídica foram avaliadas histologicamente. A adição de glutamina a 1 e 2% não demonstrou efeitos tóxicos, e preservou o conteúdo de nitrogênio do estômago e do cólon comparado com a solução padrão de NPT, e o conteúdo de nitrogênio do intestino delgado estava superior em relação aos animais que receberam ração normal. A glutamina manteve a altura das vilosidades do estômago e do cólon, mas não foi melhor que a solução parenteral para manter a altura da mucosa do intestino delgado. A atividade da maltase aumentou com a glutamina a 1% e com a NPT diminuiu, quando comparada com a ração. A adição de glutamina a 1 e 2% protegeu o fígado de infiltração lipídica vista com NPT convencional. Estes estudos sugeriram que a adição de glutamina a NPT poderia ser benéfica para manter as características histológicas do trato gastrointestinal e seu conteúdo de nitrogênio.

Com o propósito de avaliar o efeito da hiperalimentação suplementada com glutamina sobre a função imunológica do intestino, BURKE, ALVERDY, AOYS e MOSS, em 1989, utilizaram 36 ratos machos da linhagem Fisher, divididos em três grupos segundo o tipo de alimentação a receber. O grupo 1 recebeu ração normal para rato e água *ad libitum*; grupo 2 recebeu hiperalimentação com NPT convencional, e o grupo 3 recebeu alimentação convencional enriquecida com glutamina a 2%. Os animais foram mantidos sob as respectivas dietas por duas semanas, e então sacrificados. Os linfonodos mesentéricos foram colhidos para cultura bacteriana, a bile para ensaios de imunoglobulina secretória A, e o intestino foi retirado para determinar aderência bacteriana. Os resultados demonstraram 0% de translocação bacteriana no grupo 1, 58% no grupo 2, e 8% no grupo 3. As análises dos níveis de IgA demonstraram diminuição significativa no grupo que recebeu NPT convencional. O incremento da secreção de IgA durante a alimentação com GLN foi significativo quando comparado com a NPT convencional, não existindo diferenças entre os grupos 1 e 3. Com referência a aderência bacteriana, não se observou diferença significativa entre os grupos. Os resultados indicaram que a NPT suplementada com glutamina protege contra a translocação bacteriana, e que este efeito poderia estar mediado pelo sistema imune através do aumento na produção de Ig A secretória.

KLIMBERG, SOUBA, DOLSON, SALLOUM, HAUTAMAKI, PLUMLEY MENDENHALL, BOVA, KHAN, HACKETT, BLAND e COPELAND III, em 1990, estudaram o efeito da dieta elementar enriquecida com glutamina, administrada antes da irradiação total do abdome, sobre o metabolismo intestinal, morfometria da mucosa e translocação bacteriana. Os ratos foram randomizados para receber dieta elementar completa enriquecida ou não com glutamina, por quatro dias. Foram submetidos a dose única de 1000 cGy de radiação abdominal. Depois da irradiação, todos os animais receberam alimentação livre de glutamina. Quatro dias depois, foram laparotomizados e tomaram-se amostras de sangue arterial e portal, linfonodos mesentéricos e removido o intestino delgado para exame microscópico. Não houve diferença entre os dois grupos em quanto a glutamina arterial ou extração de glutamina pelo intestino; a perda de peso corporal foi significativamente menor nos ratos alimentados com glutamina. Os animais que receberam a dieta enriquecida antes da radiação, apresentaram um significativo aumento no número e altura das vilosidades, e número de mitose em metáfase por cripta. Na microscopia eletrônica corroborou-se a estrutura intacta



do epitélio dos oito ratos submetidos à radiação e alimentados com glutamina, e de um dos oito ratos alimentados com dieta livre. Três ratos de oito alimentados com glutamina, apresentaram cultura positiva nos linfonodos comparados com cinco dos sete que receberam dieta livre. Os autores concluíram que a glutamina exerce uma ação protetora sobre a mucosa do intestino delgado sustentando a proliferação celular das criptas, o qual acelera a reparação do intestino irradiado.

Inúmeros e recentes estudos, têm demonstrado que o intestino serve como reservatório de organismos patogênicos que atravessam através da barreira mucosa quando esta está alterada, resultando em culturas positivas de linfonodos mesentéricos e em bacteremia. A radiação abdominal causa lesão da mucosa intestinal resultando em translocação bacteriana. SOUBA, KLIMBERG, HAUTAMAKI, MENDENHALL, BOVA, HOWARD, BLAND e COPELAND III, em 1990 estudaram a incidência de translocação bacteriana em ratos que receberam irradiação abdominal e alimentação com dieta suplementada com glutamina. Utilizaram ratos machos Sprague-Dawley, que receberam dose única abdominal de 1000 cGy. Depois da irradiação, os ratos foram randomizados a dois grupos que receberam dieta suplementada com glutamina a 3% e dieta suplementada com glicina, respectivamente. As dietas foram isocalóricas e isovolumétricas. Após quatro dias os animais foram anestesiados e laparotomizados para obtenção de linfonodos para cultura. A incidência de cultura positiva em linfonodos de ratos que receberam dieta livre de glutamina foi de 89 %, e de 20%, naqueles do grupo alimentados com dieta enriquecida com glutamina. Os resultados confirmam a hipótese de que a glutamina ajuda a manter a barreira mucosa, diminuindo a incidência de translocação bacteriana após irradiação abdominal.

FLEMING, FITCH, DEVRIES, LIU e KIGHT, em 1991, estudaram a utilização de nutrientes de substrato exógeno marcado com  $^{14}\text{C}$  pelas células isoladas do jejuno, cecum e cólon de ratos machos Sprague-Dawley, mensurando a produção de  $\text{CO}_2$ . As células tomadas do cólon oxidaram os substratos no seguinte ordem: butirato > acetato > propionato, glicose e glutamina. As células tomadas do cecum, oxidaram o butirato mais do que os outros substratos. As células tomadas do jejuno produziram  $\text{CO}_2$  de substratos exógenos em ordem decrescente como segue: glutamina > glicose >> acetato, propionato e butirato. A comparação entre a oxidação da glutamina entre os três segmentos estudados não demonstrou diferenças. A oxidação da glicose foi maior nas células tomadas do cólon que as

tomadas do cecum e jejuno, onde foram similares. O butirato e o acetato foram oxidados mais pelas células tomadas do cecum e cólon que as do jejuno. Estes estudos demonstraram que os níveis de oxidação de substratos diferem ao longo do trato intestinal dos ratos.

Todos os estudos sugerem que a glutamina desempenha papel muito importante e que se constitui em componente condicionalmente essencial em certos estados de doença crítica. MC ANENA, MOORE, MOORE, JONES e PARSONS, em 1991, estudaram pela primeira vez a captação de glutamina em humanos, a qual até então não tinha sido confirmada. Sete pacientes apresentando trauma múltiplo foram submetidos a cateterização da veia porta durante a laparotomia. Amostras sanguíneas da circulação portal e sistêmica foram tomadas durante um período de cinco dias do pós-operatório. Foram determinados os níveis de aminoácidos, às 48 h e 5 dias. Às 48 horas os níveis de glutamina na circulação portal, eram significativamente menores que da sistêmica, assim permanecendo até o 5º dia. A captação de glutamina foi de 16 % às 48 h e de 13 % no 5º dia. Os níveis plasmáticos de citrulina, o maior produto do metabolismo da glutamina, encontrou-se elevado na circulação portal às 48 h e no 5º dia. Não foram demonstradas diferenças significativas entre os outros aminoácidos estudados. Os autores concluíram que pela primeira vez era confirmado num estudo clínico, a captação seletiva da glutamina pelo intestino

Em 1992, SCOTT e MOELLMAN, estudaram a ação da glutamina intravenosa sobre a morfologia intestinal, em modelo de injúria intestinal por irradiação abdominal. Ratos machos Sprague Dawley alojados individualmente em caixas metabólicas e cateterizados pela veia jugular, receberam NPT enriquecida com glutamina, com o objetivo de avaliar a influência do aminoácido sobre a recuperação da morfologia do intestino delgado após a irradiação abdominal. Após três dias da inserção do catéter, um grupo de ratos recebeu 1000 cGy de irradiação no abdome, e outro grupo nenhuma irradiação. A partir do dia da irradiação e durante 5, dias receberam nutrição isocalórica e isonitrogênica, contendo 0% ou 2% de glutamina. Tomadas as amostras intestinais foram estudados para determinar o conteúdo de ácidos nucléicos e altura das vilosidades. A irradiação causou a diminuição num 40% desses parâmetros, os quais não foram recuperados após alimentação suplementada com glutamina. Conseqüentemente a suplementação alimentar com glutamina não acelerou a recuperação da morfologia da mucosa intestinal neste modelo de injúria por irradiação, como demonstrado em outros estudos.

FINNIE, TAYLOR e RHODES, em 1993 estudaram a utilização dos nutrientes butirato e glutamina pelo cólon e íleo, de pacientes portadores de colite ulcerativa idiopática e de controles, com o objetivo de avaliar o metabolismo epitelial durante a fase de não atividade da doença. Foi desenvolvido um método que permitiu a mensuração do metabolismo do butirato e da glutamina nos espécimes tomados por biopsia através de exames endoscópicos em pacientes com retocolite ulcerativa não ativa e em controles. Nos controles, o metabolismo da glutamina foi maior no cólon ascendente que no descendente, mas o metabolismo do butirato foi similar nos dois segmentos. Consequentemente a relação entre o metabolismo butirato/glutamina foi maior no cólon descendente que no ascendente. Na colite ulcerativa a relação entre o metabolismo do butirato no cólon ascendente foi similar ao descendente, e os resultados não diferem significativamente dos controles. O metabolismo da glutamina foi similar nos dois segmentos estudados, mas o metabolismo no cólon descendente foi significativamente maior que nos controles. Estes resultados demonstraram a existência de variação regional na utilização de nutrientes ao longo do cólon, mas que não suportam a hipótese de que a colite ulcerativa é causada por uma deficiência no metabolismo do butirato.

Em 1993, HIGASHIGUCHI, HASSELGREN, WAGNER e FISHER, testaram a influência da glutamina sobre a síntese protéica em enterócitos de raros. Isolou-se enterócitos de diferentes níveis das vilosidades do jejuno, e incubados na presença de diferentes concentrações de glutamina, até 3,4 mmol/l. A síntese protéica foi determinada mensurando a incorporação de <sup>3</sup>H-fenilalanina pelas proteínas precipitadas em ácido tricloroacético. A glutamina, e nenhum outro aminoácido, estimulou a síntese de proteína nos enterócitos de todos os níveis. O efeito máximo foi encontrado quando a concentração de glutamina foi de 0,67 mmol/l, a qual é a concentração plasmática normal. O efeito estimulante da glutamina sobre a síntese protéica foi bloqueada por um inibidor da glutaminase, e duplicado por acetoacetato e 3-hidroxybutirato, sugerindo que a ação estimulante sobre os enterócitos está relacionada com a provisão de energia.

Também em 1993, PLATELL, MCCAULEY, MCCULLOCH e HALL, avaliaram a hipótese de que, a provisão de glutamina e de aminoácidos ramificados (aqueles que metabolizados no músculo esquelético, produzem os  $\alpha$ -ceto análogos: alanina e glutamina), reverteriam a atrofia intestinal que acompanha a nutrição parenteral. Os aminoácidos ramificados, estáveis à temperatura ambiente, constituíram-se numa alternativa

prática às soluções enriquecidas com glutamina, determinando uma fonte endógena de glutamina para o intestino. Um número de 375 ratos foram randomizados em 15 grupos para receber NPT convencional, ração normal para ratos, NPT enriquecida com glutamina (0,8 a 2%), ou NPT enriquecida com glutamina mais aminoácidos ramificados (0,5%/0,4% a 1,25%/1%). Quando comparados com os efeitos da NPT convencional, a infusão enriquecida com glutamina ou aminoácidos ramificados, revertia parcialmente a atrofia do intestino de maneira dose dependente. Não houve efeito sobre o intestino grosso. Os autores concluíram com esses resultados que a infusão de NPT enriquecida tanto com glutamina como com aminoácidos ramificados revertiam a atrofia associada com a infusão de NPT convencional.

INOUE, GRANT e SNYDER (1) em 1993, investigaram o efeito da adição de glutamina a 1,5% à solução NPT, sobre a restauração da atrofia do intestino delgado induzida após jejum intestinal de 7 dias. Comparados com o grupo controle, os animais em jejum perderam 30,5% do peso original, 34,5% do peso úmido da mucosa, 68,3% do conteúdo de nitrogênio da mucosa, 36,7% da espessura da mucosa e 38,6% da altura da mucosa, e perdas variáveis da atividade da dissacaridase epitelial. Estabeleceram-se três grupos de ratos com diferentes dietas, ração padrão para ratos; NPT convencional, e NPT enriquecida com glutamina a 1,5%. Após os 7 dias de realimentação os animais foram sacrificados para avaliar a recuperação da morfologia intestinal. Os animais realimentados com NPT não mostraram recuperação significativa dos parâmetros estudados. Os animais que receberam NPT suplementada com glutamina mostraram recuperação significativa em todos os parâmetros estudados, mas não, retorno ao normal, como encontrados nos ratos realimentados com ração padrão para espécie. A adição de glutamina na solução NPT significativamente melhorou a recuperação da mucosa intestinal da atrofia conseqüente ao jejum prolongado.

Num outro reporte, os mesmos autores (2), estudaram os efeitos da nutrição intravenosa enriquecida com glutamina na sobrevida de ratos da linhagem Fischer após da indução de peritonite por *E.coli*. Na fase inicial do experimento determinou-se o grau de estresse, avaliando a sobrevida após a indução da peritonite pela injeção intraperitoneal de *E. coli*. A colônia de *E. coli* utilizada foi obtida a partir de culturas de sangue humano. Crescentes doses foram injetadas intraperitonealmente em 344 ratos, e as respostas, avaliadas por contagem de células brancas, insulina plasmática, glucagon, níveis de glucorticóides e a excreção urinária de ácido vanil-mandélico. Demonstrou-se estresse significativo pelo menos

durante os três primeiros dias. A sobrevida dependeu da dose de bactéria injetada, com 60% de mortalidade após a injeção de  $5 \times 10^5$  unidades formadoras de colônia de *E. coli*/200 g de peso corporal. Para determinar se a suplementação com glutamina alteraria a sobrevida neste modelo de peritonite, outros 344 ratos foram randomizados para receber NPT contendo 4,25% de aminoácidos, ou a mesma solução com 1,5 % do conteúdo de aminoácido substituído por glutamina. Após 7 dias de nutrição foi induzida a peritonite, e a sobrevida monitorizada durante 3 dias. O grupo suplementado com glutamina significativamente melhorou a sobrevida (92,1%), comparado com o outro grupo (44,7%). Os resultados demonstraram que suplementando a solução NPT com glutamina melhorou a tolerância para a peritonite induzida pela injeção de *E. coli*, sendo discutidos como possíveis mecanismos o efeito da glutamina sobre a preservação da estrutura intestinal e diminuição da translocação bacteriana, ou a ação sobre as células imunocompetentes como função principal melhorando a capacidade de destruir as bactérias translocadas.

BARK, SVENBERG, THEODORSSON, URIBE e WENNERBERG, em 1994 determinaram os efeitos da solução NPT balanceada, incluindo lipídeos, e glutamina, sobre a cinética de crescimento das células epiteliais usando autoradiografia. Utilizaram ratos machos Sprague Dawley divididos em 3 grupos. O grupo 1 recebeu ração padrão e infusão de solução salina; o grupo 2 NPT incluindo lipídeos e o grupo 3, igual mistura, mas substituiu-se uma quantidade de aminoácidos por outra similar isonitrogênica de glutamina. Os animais foram alimentados durante 7 dias. Amostras intestinais de jejuno, e sangue foram colhidos uma hora após a injeção de timidina tritiada. Os espécimes teciduais na microscopia, revelaram redução significativa do número de células nas criptas e vilosidades em ambos os grupos que receberam NPT, quando comparados com o grupo alimentado com ração padrão. O número de células epiteliais não foram significativamente diferentes entre os grupos 2 e 3. Similarmente, o índice de marcação (relação entre células marcadas e células das criptas), não foi afetada pela administração de glutamina. Os autores observaram que a glutamina não influenciou sobre a atrofia da mucosa ou proliferação celular, concluindo que a influência da glutamina sobre a atrofia da mucosa e renovação no jejuno, poderia depender da composição da mistura da solução de NPT administrada durante a alimentação

Os efeitos da NPT suplementada com glutamina sobre o metabolismo da mucosa, morfologia e função de barreira do intestino delgado foram avaliados em estudo

desenvolvido em 1994, por CHEN, OKUMA, OKAMURA, TORIGOE e MIYAUCHI, na vigência de endotoxemia produzida pela infusão intravenosa contínua de endotoxina durante o período de 4 dias de estudo. Utilizaram 46 ratos Wistar, randomizados em dois grupos para receber NPT suplementada com glicina ou com glutamina a 2%. O grupo da glutamina apresentou menor balanço nitrogenado que o grupo da glicina, e também menor excreção urinária de 3-metilhistidina. A atividade da glutaminase da mucosa e a concentração de glutamina no sangue portal, foi significativamente superior no grupo da glutamina que no grupo da glicina. A mucosa jejunal do grupo da glutamina apresentava maior peso, maior altura das vilosidades, profundidade das criptas e largura da parede. No grupo da glutamina a diferença arteriovenosa de endotoxina foi menos negativa, sugerindo que a absorção da endotoxina foi parcialmente revertida. Os autores concluíram que a suplementação com glutamina melhora o metabolismo intestinal, diminuindo a atrofia da mucosa, por tanto auxiliando a manutenção da função de barreira epitelial, durante endotexemia.

Num estudo realizado por LI, LANGKAMP-HENKEN, SUZUKI e STAHLGREN, em 1994, avaliou-se a permeabilidade do jejuno à lactulose e manitol, em ratos durante a infusão de NPT suplementada com glutamina, e as alterações histológicas mensurando dimensões da mucosa. Após a inserção de catéter venoso central, 18 ratos Wistar, machos foram randomizados em três grupos segundo a dieta, recebendo infusão salina mais dieta normal para ratos *ad libitum*, NPT convencional, e NPT suplementada com glutamina a 2%. Após 7 dias de infusão, foi realizada laparotomia, e a latulose e o manitol instilados dentro da luz de 25 cm de jejuno ligados. A urina foi coletada por 5h para ensaios de lactulose, manitol e creatinina. As amostras de jejuno foram tomadas e o peso úmido, altura das vilosidades, largura da mucosa e das vilosidades foram mensuradas. A permeabilidade intestinal para lactulose e manitol aumentou significativamente após NPT comparados com os grupos que receberam alimentação padrão, e estes efeitos foram prevenidos com a adição de glutamina à NPT. A altura das vilosidades e largura da mucosa diminuiu significativamente após a infusão de NPT, mas não houve diferença nesses parâmetros quando comparados os grupos de NPT suplementada com glutamina e alimentação padrão. Esses resultados sugerem que durante a alimentação com NPT associa-se um aumento na permeabilidade intestinal, e que a glutamina adicionada à NPT previne esse efeito, diminuído também a atrofia do jejuno.

Em 1994, CAMPOS, MUCERINO, WAITZBERG, LOGULO, EL IBRAHIM, NADALIM e HABR-GAMA propuseram a avaliação do efeito protetor de dietas poliméricas e elementares enriquecidas com glutamina na prevenção da enterite actínica aguda experimental. Foram estudados 65 ratos Wistar, machos, adultos, divididos em três grupos: 1- dieta polimérica com caseína enriquecida com glutamina a 2%; 2- dieta polimérica com caseína e 3- dieta elementar enriquecida com glutamina a 2%. O experimento constou de períodos de adaptação alimentar (7 dias), de irradiação abdominal fracionada de 300 cGy (5 dias) e de recuperação (3 dias). No quarto dia os ratos foram operados para ressecar o intestino e o cólon para estudo histopatológico. Os grupos 1 e 3 apresentaram número significativamente maior de ratos com aumento da celularidade, do número da mitose, e médias superiores de altura das vilosidades em comparação com o grupo 2 no intestino delgado. O grupo 3 apresentou, ainda maior número de ratos com relação das alturas vilosidade-cripta normal do que os grupos 1 e 2 que não apresentaram diferença estatística entre si. No intestino grosso os três grupos não apresentaram diferenças significantes em relação à celularidade epitelial e ao número de mitoses nas criptas. Os autores concluíram que nas condições do estudo, a suplementação alimentar com glutamina antes, durante e após a irradiação abdominal em ratos, em dieta polimérica ou elementar, determinou efeitos protetores sobre o intestino irradiado, preservando-se arquitetura histológica e a capacidade de recuperação, sobretudo no intestino delgado.

SCHEPPACH, LOGES, BARTRAM, CHRISTL, RICHTER, DUSEL, STEHLE, FUERST e KASPER, em 1994, testaram a hipótese de que o dipeptídeo alanil-L-glutamina estimulava, tanto quanto a glutamina, a proliferação de células do íleo e também do cólon proximal e distal, contribuindo à função da barreira intestinal. Eles utilizaram biópsias de íleo, cólon proximal e distal de pacientes normais. As amostras foram incubadas por 4 h com glutamina (2 mmol/l), alanil-L-glutamina (2 mmol/l) e solução salina. As células em fase S foram marcadas com bromodeoxiuridina. Em secções longitudinais das criptas, foram contadas as células marcadas e em fase quiescente. Os resultados demonstraram que a glutamina tanto quanto a alanil-L-glutamina estimularam a proliferação das células das criptas no íleo, cólon proximal e distal. Nas células do íleo a marcação foi maior na cripta inteira, entanto que nos cólons o efeito trófico ficou confinado aos compartimentos basais das criptas. Os autores concluíram que a glutamina e o dipeptídeo alanil-L-glutamina tem efeitos tróficos não só no

íleo mas também no cólon proximal e distal, sendo isto da maior importância durante a nutrição parenteral, quando a mucosa se atrofia debilitando a barreira intestinal.

O'RIORDAIN, FEARON, ROSS, ROGERS, FALCONER, BARTOLO, GARDEN e CARTER, em 1994 estudaram o efeito da suplementação com glutamina na NPT, sobre a resposta das células T em sangue periférico, e a produção de citocinas pró-inflamatórias, em pacientes submetidos a ressecção coloretal. Numerosos tecidos vitais, incluindo o sistema imune, são muito dependentes da glutamina. Todavia, quando reconhecidas essas características de condicionalmente essencial em condições de estresse, este aminoácido não é encontrado nas soluções de NPT convencional. Os autores estudaram 20 pacientes que foram divididos para receber NPT convencional ou regime de dieta isonitrogênica e isocalórica com 0,18 g de glutamina/kg/dia desde os dias 1 ao 6 do pós-operatório. A produção de DNA pelas células T, interleucina-2, interleucina-6 pelas células mononucleares no sangue periférico e fator de necrose tumoral foram mensurados *in vitro* pre-operatoriamente e nos dias 1 e 6 no pós-operatório. Os resultados demonstraram o incremento na síntese de DNA pelas células T no grupo que recebeu a solução de NPT suplementada com glutamina quando comparado com os valores pre-operatórios. Tal incremento não foi observado com a NPT convencional. A produção de interleucina-2 e interleucina-6 ou de fator de necrose tumoral não foram influenciados pelos diferentes regimes de nutrição.

Em 1995, RÖHRIG estudou os efeitos da glutamina no sistema monomorfonuclear de fagócitos, na icterícia obstrutiva. Para tanto utilizou 48 ratos Wistar, divididos em dois grupos de acordo a dieta: ração elementar e ração mais glutamina. Cada grupo foi sub-dividido em 4 subgrupos: controle, 7 dias, 14 dias e 21 de colestase. No dia dos testes injetaram-se bactérias marcadas com  $I^{131}$  em veia periférica, e depois obtidas amostras sanguíneas destinadas à determinação das contagem por minuto, numa unidade de captação nuclear. Demonstrou-se pela análise desses índices, que houve deficiência funcional progressiva dos fagócitos a medida em que progrediu a colestase. No grupo tratado com glutamina isto não ocorreu, pois os índices de fagocitose permaneceram idênticos aos dos controles. Houve captação decrescente no conjunto de órgãos estudados, relacionados com o tempo de icterícia. O órgão que mais captou bactérias foi o fígado, com 70 % nos controles e 44% após a terceira semana de icterícia. Nos animais tratados com glutamina a captação continuou em 70% após o mesmo tempo de evolução da icterícia. No grupo da glutamina as



alterações da mucosa intestinal foram significativamente menores. Neste grupo a captação de bactérias pelo linfonodos mesentéricos foi significativamente menor. Interpretaram-se esses resultados como indicativos de que a glutamina protegeu a mucosa intestinal diminuindo desta forma a ativação dos linfócitos dos linfonodos.

SCHEPPACH, DUSEL, LOGES, KUHN, BARTRAM, RICHTER, CHRISTL KARCH e KASPER, em 1995, estudaram o efeito da glutamina sobre a cicatrização do cólon distal de ratos após injúria com ácido clorídrico. Foram estudados a diferença de potencial, condutância e permeabilidade de manitol e lactulose, e translocação de cepas enteropatógenas de *E.coli*. A bromodesoxiuridina, foi utilizada para avaliar a proliferação da mucosa. Os resultados de condutância elétrica, permeabilidade e translocação bacteriana diminuída, sugerem que a glutamina estimula os mecanismos de reparo da mucosa após a injúria com ácido. Este efeito poderia ser devido ao estímulo para a proliferação das células das criptas. Concluem que a adição de glutamina às soluções de nutrição parenteral poderia resultar em efeito benéfico para aqueles pacientes sob cuidados intensivos, nos quais a barreira intestinal debilita-se no curso de trauma e sepse.

## **3 MATERIAL E MÉTODO**

### 3 MATERIAL E MÉTODO

Este estudo foi desenvolvido no laboratório de Imunologia e Microbiologia da Faculdade Evangélica de Medicina do Paraná.

Investigou-se o efeito da glutamina sobre o processo inflamatório, num modelo experimental de colite difusa, induzido pela instilação retal de ácido acético a 10% em ratos Wistar. O efeito da suplementação nutricional, avaliou-se pelo estudo da permeabilidade vascular utilizando-se o corante azul de Evans extravasado para o tecido colônico inflamado e pelo estudo das alterações histológicas.

Aplicaram-se as Normas para Apresentação de Trabalhos da Universidade Federal do Paraná (1992), a Nômina Anatômica Veterinária (1983) e os Princípios Éticos na Experimentação Animal do *International Council for Laboratory Animal Science* (1990).

#### 3.1 AMOSTRA

Foram utilizados 34 ratos albinos, machos (*Rattus norvegicus*, *Rodentia mammalia* - linhagem Wistar - TECPAR).

##### 3.1.1 Distribuição dos animais - Grupos de experimento

Foram estabelecidos diferentes períodos para a suplementação da glutamina, para tanto os animais foram distribuídos em quatro grupos.

Grupo I: 6 ratos que receberam dieta Nuvital®, padronizada para espécie e água *ad libitum* mais 30 mg/d de glutamina desde os 7 dias anteriores à indução da colite e até o dia do sacrifício.

Grupo II : 8 ratos que receberam dieta padronizada para espécie, mais 30 mg/d de glutamina durante os 7 dias prévios à indução da colite.

Grupo III: 10 ratos que receberam dieta padronizada para espécie suplementada com 30 mg/d de glutamina, a partir da indução da colite.

Grupo IV: 10 ratos que receberam dieta padronizada para espécie, mais solução fisiológica, constituindo-se este último no grupo controle.

GRUPOS DE ANIMAIS	SUPLEMENTAÇÃO COM GLUTAMINA (30 mg/dia)													
	dia 0					dia 7				dia 14				
	início					indução				sacrifício				
GRUPO I	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
GRUPO II	X	X	X	X	X	X	X							
GRUPO III										X	X	X	X	X
GRUPO IV	controle													

Tabela 1 - Demonstrativo dos períodos de suplementação e grupos do estudo

## 3.2 SOLUÇÕES E REAGENTES

### 3.2.1 Glutamina

Empregou-se glutamina obtida comercialmente em forma de pó, diluída em solução fisiológica na proporção de 3% (m/v) regularizando o pH com ácido clorídrico, a 7,0, para ser inoculada pela via intragástrica, imediatamente após o seu preparo.



**Figura 2** - Preparo da solução de GLN (3 g de GLN diluídas em 100 ml de solução fisiológica)

### 3.2.2 Ácido acético a 10%

Elaborada a 10% (v/v), com ácido acético REAGEN®, em solução fisiológica.

### 3.2.3 Azul de Evans

Foi preparada a solução do azul de Evans, MERCK®, artigo 3169, a 2,5 % (m/v) em solução fisiológica. A solução continha 25 mg do azul de Evans por mililitro, sendo a seguir esterilizada por filtração em membranas de 0,22 micra MILLIPORE®, conservada posteriormente entre 4 a 8°C. Desta solução, foram preparados os inóculos para os ratos e os padrões para micro leituras espectrofotométricas.

### 3.2.4 Formamida

Utilizou-se Formamida MERCK®, artigo 9684.1000, para a extração do corante das amostras teciduais.

### 3.2.5 Formalina

Preparada a 10% (v/v), a partir de Formaldeído, RIEDEL®, em água destilada.

## 3.3 INDUÇÃO DO PROCESSO INFLAMATÓRIO

Os animais foram dispostos em caixas devidamente identificadas, permanecendo durante todo o experimento albergados em temperatura ambiente.

### 3.3.1 Jejum e lavagem intestinal

Vinte e quatro horas antes da indução da colite, os ratos foram deixados em jejum de ração e então, submetidos ao preparo intestinal, pela instilação retal de 20 ml de solução fisiológica. Utilizou-se catéter número 6 de polietileno medindo 9 cm de comprimento com múltiplos orifícios, a cada 3 mm, numa extensão de 5 cm da extremidade distal fechada, sendo sua extremidade proximal conectada a uma seringa de 20 ml.

### 3.3.2 Indução anestésica

Os animais foram anestesiados por via inalatória com éter sulfúrico comercial, tanto para a indução da colite como diariamente, para a instilação intragástrica da glutamina.

### 3.3.3 Indução da colite

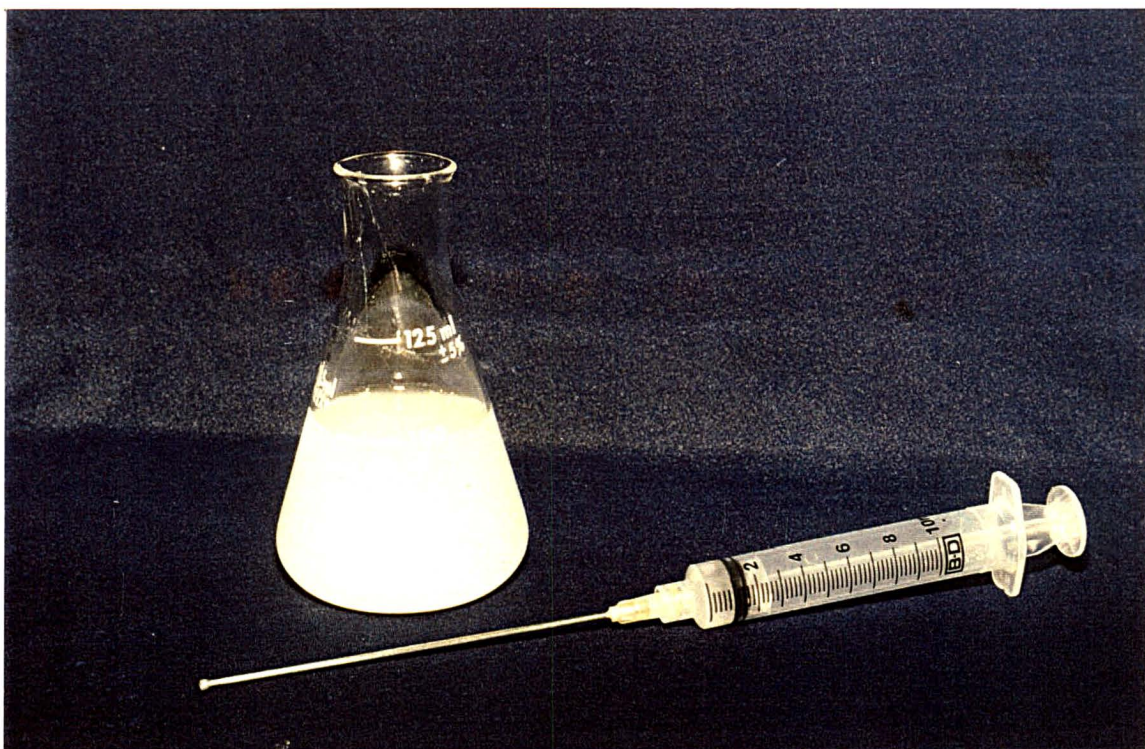
Com o animal anestesiado em decúbito ventral supino, foi procedida a instilação por via retal de 0,5 ml de ácido acético a 10%, através do mesmo catéter anteriormente utilizado para o preparo intestinal, conforme descrito por HAJAR (1994).

## 3.4 DIETA COM GLUTAMINA

### 3.4.1 Inoculação intragástrica

Os ratos receberam a solução de glutamina por instilação intragástrica através de sonda rígida metálica de 10 cm de comprimento por 0,2 cm de largura, com protetor de extremidade.

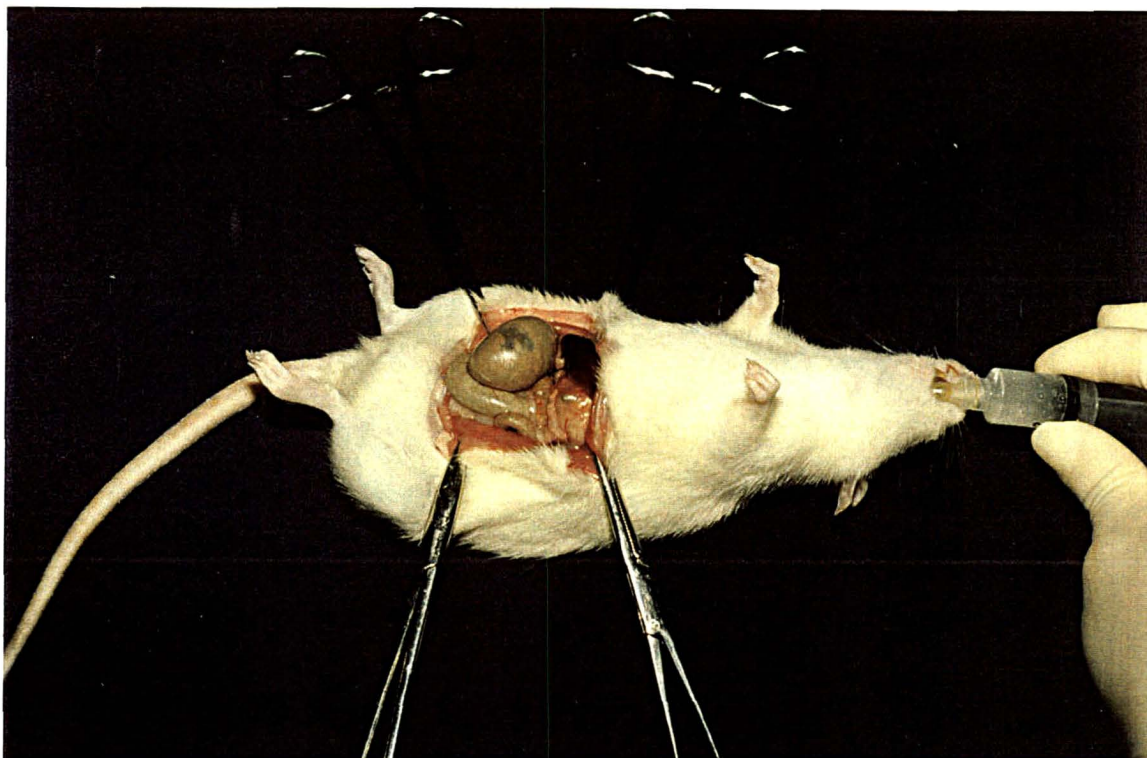




**Figura 3** - A solução de GLN e a seringa com a sonda metálica utilizada para inoculação intragástrica



**Figura 4** - Rato Wistar submetido à inoculação intragástrica de GLN



**Figura 5** - Demonstração do acesso ao estômago durante a inoculação intragástrica da GLN.

### 3.5 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS

#### 3.5.1 Inoculação do azul de Evans

A partir dos pesos dos animais foram calculados os inóculos da solução do azul de Evans a serem administrados na proporção de 20 mg/kg de peso corpóreo em cada animal. Oito horas antes do sacrifício, o rato anestesiado foi colocado em decúbito dorsal. Tracionou-se o pênis e desta forma a veia peniana foi puncionada, procedendo-se à inoculação do corante como descrito por BORDÓN DE CORVALÁN e HAJAR, (1994).



### 3.5.2 Sacrifício

Os ratos foram sacrificados através da inalação letal de éter sulfúrico comercial.

### 3.5.3 Processamento dos fragmentos de cólon

Para a obtenção das amostras colônicas, realizou-se abertura da cavidade abdominal dos animais, através de incisão mediana xifopúbica, e abertura da sínfise púbica, incidindo sobre o reto no nível da sua união com o ânus. Retirou-se segmento de 3 cm de cólon distal, que foram lavados e retirados resíduos de fezes e sangue. A abertura dos segmentos realizou-se ao longo de seu eixo maior, pela borda anti mesentérica. As peças novamente foram seccionadas longitudinalmente. Um dos segmentos foi pesado em balança de precisão e colocado em tubo de ensaio, acrescentando-se a este formamida na proporção de 4 ml/g. Os tubos foram deixados em estufa durante 24 h à temperatura de 22° C. Após este período, foram agitados mecanicamente por 15 segundos em agitador PHOENIX®, modelo AT 56. O corante extraído pela formamida foi conservado à temperatura de - 20° C, para posterior leitura espectrofotométrica. O outro segmento foi estirado sobre superfície de papel cartão e a seguir submerso em formalina. Após decorridas 48 h, os fragmentos foram submetidos à técnica histológica de rotina e coloração com hematoxilina e eosina.

## 3.6 MÉTODOS DE AFERIÇÃO

### 3.6.1 Dosagem do azul de Evans no tecido colônico

Com pipeta automática GILSON®, aspirou-se 150 µl de cada extrato, e transferiu-se em orifícios da placa de Terazaki, e a seguir submetidos à leitura em leitor para microplacas de ELISA, BIO-TEK® BT-100, frente a um branco de formamida a 620 nm de comprimento de onda. As leituras obtidas foram extrapoladas em curva de standardização da solução padrão do azul de Evans, por regressão linear. Calculou-se as concentrações do corante, e estas foram expressadas em microgramas por grama de tecido colônico.

### 3.6.2 Aferição histológica dos fragmentos de cólon

As lâminas com os cortes de tecido foram interpretadas seguindo os critérios de graduação histológica da indução e do reparo da lesão, utilizado por HAJAR em 1994.

Tabela 2 - Graduação histológica - Indução

GRAU	ASPECTOS HISTOLÓGICOS
I	espeçamento mucoso por edema; criptas alongadas de base dilatada; degeneração celular epitelial focal; exsudado polimorfonuclear, edema, hemorragia e dilatação linfática no córion; muscular da mucosa dissociada por edema; edema, dilatação, congestão vascular, marginação leucocitaria na submucosa.
II	mucosa adelgada; criptas encurtadas de base dilatada; degeneração celular epitelial; realces das fibras colágenas na submucosa (por edema e tumefação das fibras).
III	mucosa com extenso desaparecimento de criptas; criptas remanescentes isoladas; presença de pseudomembranas fibrino-leucocitárias em áreas de erosão do epitélio de superfície sem depressão; exsudado polimorfonuclear, hemorragia recente.
IV	mucosa com ulceração superficial (profundidade túnica mucosa); aspecto hialino homogêneo da mucosa (áreas de desaparecimento de criptas); exsudado polimorfonuclear e hemorragias acentuados na submucosa.
V	ulceração profunda (atinge túnica submucosa); restos celulares necróticos desprendendo-se para a luz; ilhas de mucosa inflamada; exsudado polimorfonuclear acentuado na submucosa desaparecimento da muscular da mucosa; edema e exsudado polimorfonuclear na camada muscular própria; tecido conjuntivo proliferado na submucosa com início de organização (proliferação de vasos capilares, fibroblastos e infiltrado monomorfonuclear).
VI	ulceração profunda (atinge túnica muscular própria); fragmentos de tecido necrótico e exsudado fibrino-leucocitário descamados para a luz; tecido de granulação na submucosa.

Tabela 3 - Graduação histológica - Reparo

GRAU	ASPECTOS HISTOLÓGICOS
e	ulceração profunda (atinge túnica muscular própria); fragmentos de tecido necrótico e exsudado fibrino-leucocitário descamados para a luz; tecido de granulação na submucosa.
d	redução da profundidade das úlceras (nível submucoso); criptas regenerativas adjacentes; submucosa rica em vasos capilares neoformados; infiltrado inflamatório misto, polimorfo e monomorfonuclear; hemosiderina.
c	maior redução da profundidade do leito ulceroso e reepitelização na periferia; criptas adjacentes tortuosas, epitélio pseudo-estratificado, muco reduzido e mitoses na base das criptas; submucosa rica em vasos neoformados; infiltrado inflamatório monomorfonuclear predominante.
b	reepitelização da superfície mucosa com incorporação de áreas hialinas; infiltrado inflamatório submucoso monomorfonuclear, discreto;
a	reepitelização da superfície mucosa; criptas colônicas refeitas; submucosa com focos de fibrose residual (seqüela); ausência de infiltrado inflamatório; vasos ectasiados na submucosa (seqüela).

### 3.7 AVALIAÇÃO ESTATÍSTICA

#### 3.7.1 Análise de regressão linear e correlação

Para a validação dos resultados espectrofotométricos das amostras colônicas frente à respectiva curva padrão de calibração, empregou-se regressão linear e obtenção dos coeficientes de correlação-r (BOX, HUNTER e HUNTER, 1978), em calculadora CASIO® 750 PX.

### 3.7.2 Escala nominal dos achados histológicos

Transformou-se a escala nominal dos achados histológicos, em escala numérica pela atribuição dos fatores de correção como demonstrado na figura (BOX, HUNTER e HUNTER, 1978).

	(0)	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)
	I	II	III	IV	V	VI
<b>ESCALA 1</b>	<hr/>					
	a	b	c	d	e	
	(0)	(1)	(2)	(3)	(4)	
	(0)	(4)	(8)	(12)	(16)	(20)
	I	II	III	IV	V	VI
<b>ESCALA 2</b>	<hr/>					
	a	b	c	d	e	
	(0)	(5)	(10)	(15)	(20)	

**Figura 6** - Demonstrativo das escalas para transformação dos valores nominais das alterações histológicas, em valores numéricos.

### 3.7.3 Análise de variância

Calculou-se a média dos resultados das concentrações do azul de Evans extraído dos fragmentos colônicos dos animais tratados com glutamina. A análise da variância foi aplicada para verificar se houve diferença estatisticamente significativa entre as médias. Para a análise dos contrastes foi utilizado o método de Tukey.

Após a conversão numérica dos achados histológicos, a comparação entre grupos foi realizada mediante a utilização do teste não paramétrico de Kruskal-Wallis. O emprego do teste não paramétrico deveu-se a natureza da variável (mensuração ordinal). Tendo sido observada diferença significativa entre os grupos, utilizou-se o teste de Mann-Whitney para comparação dos grupos com o controle.

Os resultados foram considerados como estatisticamente significativos quando o valor de p era menor do que 0,05.

## **4 RESULTADOS**

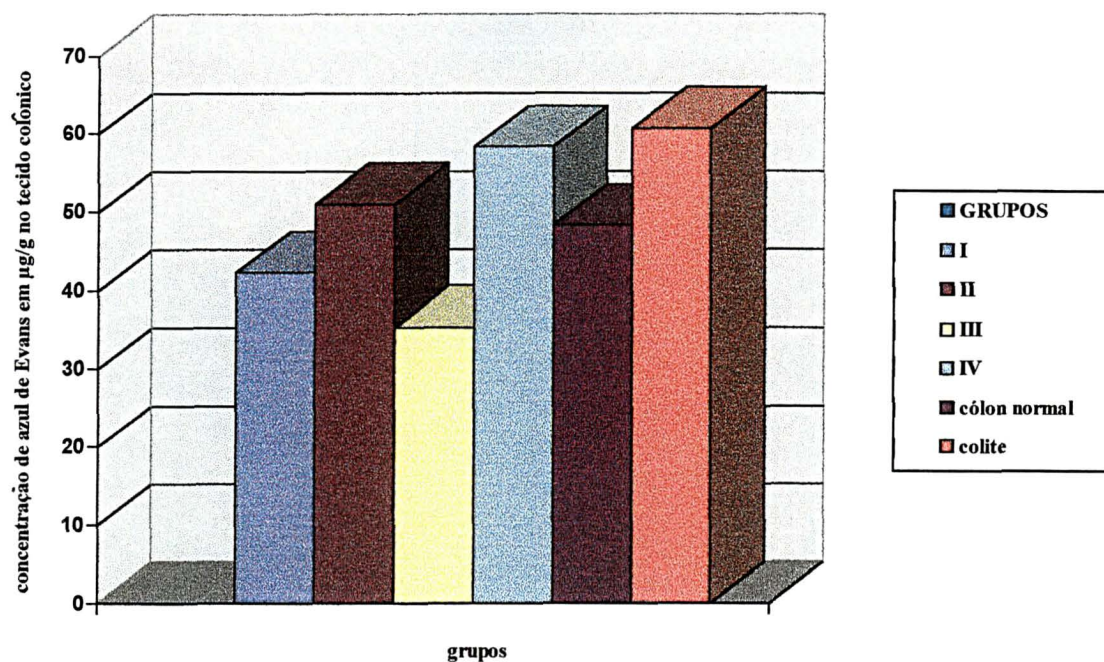
## 4 RESULTADOS

### 4.1 CONCENTRAÇÃO DO AZUL DE EVANS NOS FRAGMENTOS COLÔNICOS

Os valores das aferições espectrofotométricas em leitor de ELISA, obtidos das amostras colônicas, são apresentadas na tabela 4, em  $\mu\text{g/g}$ . Encontram-se referidos também os valores de referência estabelecidos nos trabalhos de BORDÓN DE CORVALÁN, 1994 (valor de azul de Evans no tecido colônico normal) e de HAJAR, 1994 (valor de azul de Evans no tecido colônico na colite induzida sem tratamento).

**Tabela 4** - Demonstrativo dos resultados das dosagens de azul de Evans ( $\mu\text{g/g}$ ) extraídos dos fragmentos colônicos. Grupos, I, II, III e IV, e os valores de referência do cólon normal e do cólon com colite sem tratamento

GRUPOS	Limites de variações $\mu\text{g/g}$		
	Superior	médio	inferior
I	50,15	44,34	38,54
II	43,28	48,31	53,34
III	38,26	33,76	29,27
IV	71,50	65,14	58,78
tecido colônico normal	51,92	46,89	41,86
tecido colônico com colite induzida	61,85	60,80	59,74



**Gráfico 1** - Distribuição gráfica das dosagens médias do azul de Evans ( $\mu\text{g/g}$ ) extraído dos fragmentos colônicos em estudo e valores de referência (BORDÓN DE CORVALAN e HAJAR, 1994)

#### 4.2 AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA DOS FRAGMENTOS COLÔNICOS

Os fragmentos colônicos obtidos foram processados para avaliação histológica, obtendo-se os resultados apresentados na tabela 5 e 6.

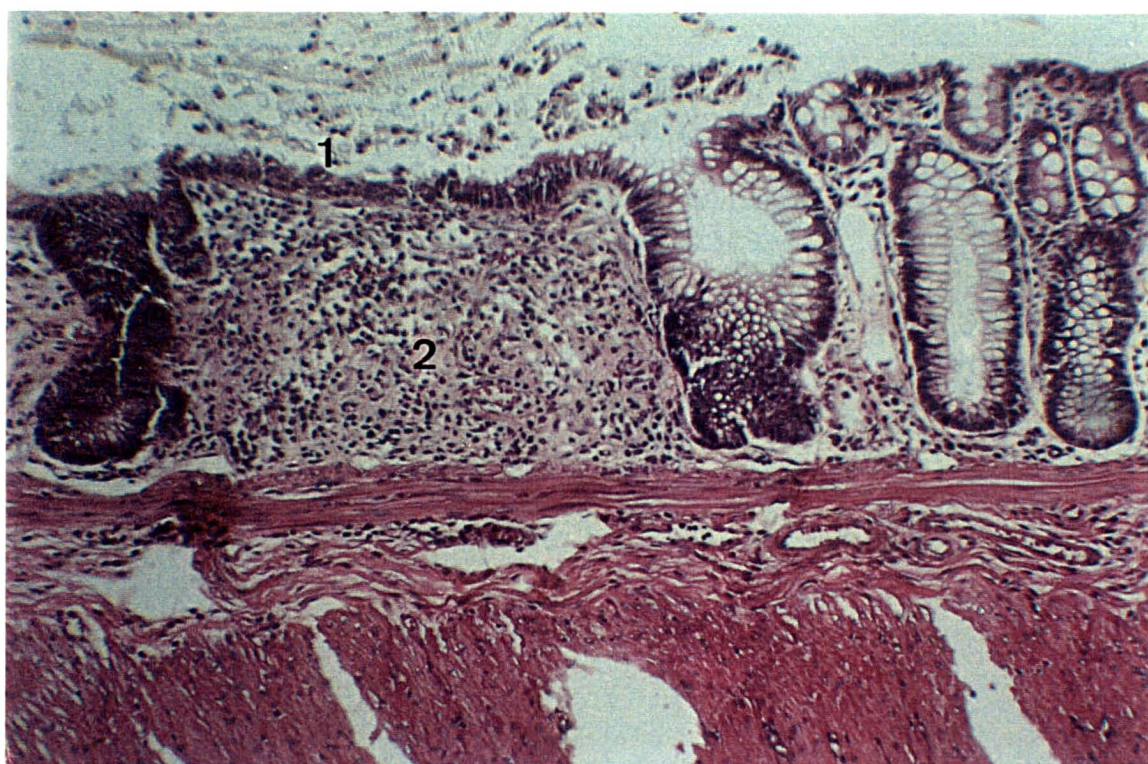
**Tabela 5** - Graduação histológica (indução e reparo).

GRUPO I n=6	GRUPO II n=8	GRUPO III n=10	GRUPO IV n=10
b	d	a	I
b	VI	VI	II
b	d	d	VI
b	a	b	VI
b	c	b	IV
VI	c	a	VI
	d	a	VI
	VI	a	VI
		a	VI
		a	VI



**Tabela 6** - Demonstrativo da conversão numérica dos valores nominais.

GRUPO I n=6	GRUPO II n=8	GRUPO III n=10	GRUPO IV n=10
5	15	0	0
5	20	20	4
5	15	15	20
5	0	5	20
5	10	5	12
20	10	0	20
	15	0	20
	20	0	20
		0	20
		0	20

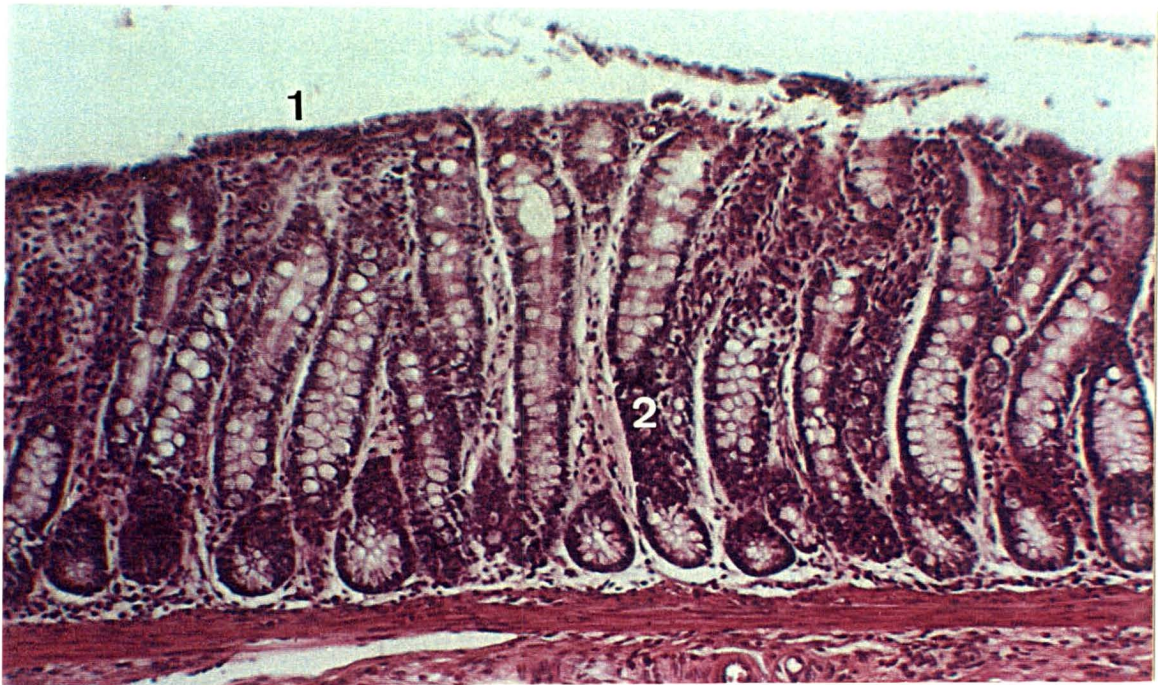


**Figura 7** - Fotomicrografia do tecido colônico no 7º dia pos-indução da colite correspondente a rato do grupo I. 1-Reepitelização da mucosa. 2-Discreto infiltrado leucocitário. Hematoxilina e eosina, aumento de 10 vezes.



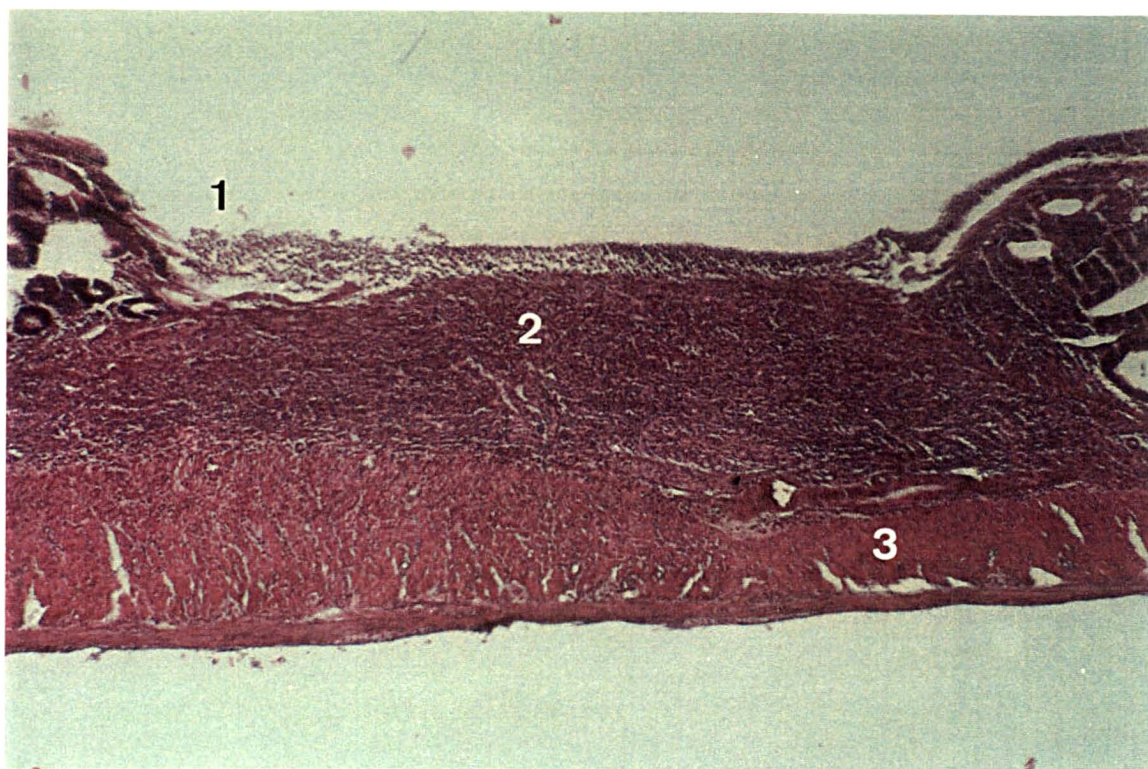


**Figura 8** - Fotomicrografia do tecido colônico no 7º dia pos-indução da colite, correspondente a rato do grupo II. 1-Area de reepitelização da mucosa. 2-Dilatação cística. Hematoxilina e eosina, aumento de 10 vezes

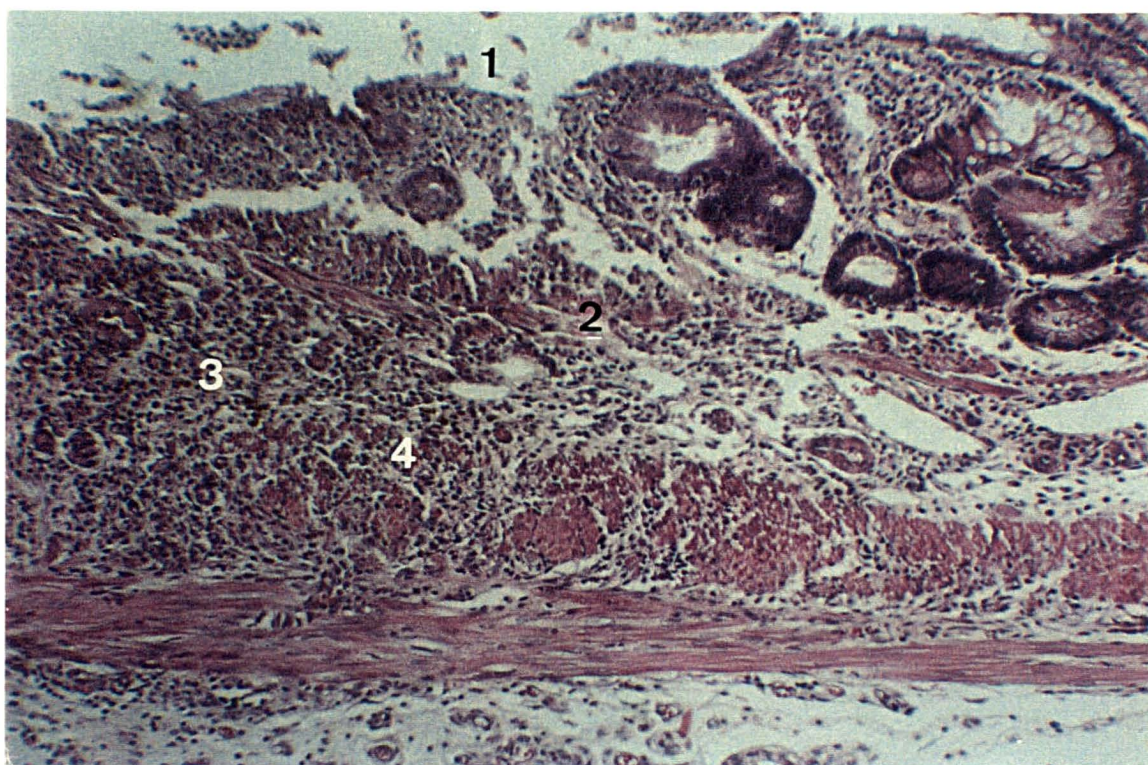


**Figura 9** - Fotomicrografia do tecido colônico no 7º dia pos-indução da colite correspondente a rato do grupo III. 1-Reepitelização da mucosa. 2-Restauração da arquitetura glandular. Hematoxilina e eosina, aumento de 4 vezes.





**Figura 10** - Fotomicrografia do tecido colônico no 7º dia pos-indução da colite, correspondente a rato do grupo IV. 1-Ulceração da mucosa. 2-Infiltrado polimorfonuclear e hemorragia da submucosa. 3- Necrose coagulativa muscular. Hematoxilina e eosina, aumento de 4 vezes.



**Figura 11** - Fotomicrografia do tecido colônico no 7º dia pos-indução do processo inflamatório correspondente a rato sem tratamento. 1-Ulceração da mucosa. 2-Necrose da muscular. 3-Infiltrado leucocitário. 4-Hemorragia. Hematoxilina e eosina, aumento de 10 vezes (Gentileza do Dr. Nemer Hajar, 1994).

### 4.3 AFERIÇÃO ESTATÍSTICA DOS VALORES DE AZUL DE EVANS NO TECIDO COLÔNICO

Os valores da determinação do azul de Evans no tecido colônico foram submetidos ao teste de Tukey, com nível de significância de 5%. Os resultados estão demonstrados na tabela 7.

**Tabela 7** - Demonstrativo das médias das concentrações de azul de Evans no tecido colônico, submetidos ao teste de Tukey.

variável	n	média (µg/g)	homogeneidade da amostra
grupo I	6	44,34	x
grupo II	8	48,31	x
grupo III	10	33,76	x
grupo IV	10	65,14	x

Houve diferença significativa quando comparados os grupos I, II e III com o controle e quando comparados os grupos I e II com o III, como demonstrado na tabela 8.

**Tabela 8** - Demonstrativo das diferenças entre os grupos

Grupos	p
I - II	ns*
I - III	<0,05
I - IV	<0,05
II - III	<0,05
II - IV	<0,05
III - IV	<0,05

\*não significativo

#### 4.4 AFERIÇÃO ESTATÍSTICA DOS ACHADOS HISTOLÓGICOS

O teste de Kruskal-Wallis aplicado aos resultados histológicos, indicou diferença significativa entre os grupos ( $H=10,24$ ;  $p<0,05$ ). O teste de Mann-Whitney aplicado estabeleceu os resultados demonstrados nas tabelas 9 e 10.

**Tabela 9** - Demonstrativo das medianas dos valores numéricos da avaliação histológica submetidos ao teste de Mann-Whitney para os pares.

Variável	n	Mediana	Homogeneidade da amostra
Grupo I	6	5	x
Grupo II	8	15	x x
Grupo III	10	0	x x
Grupo IV	10	20	x x

**Tabela 10**- Demonstrativo das diferenças entre os grupos.

Grupos	p
I - II	ns*
I - III	ns*
I - IV	ns*
II - III	<0,05
II - IV	ns*
III - IV	<0,05

\*não significativo

Não houve diferença significativa quando comparados os grupos I e II com o IV. No entanto observou-se diferença estatisticamente significativa quando comparados os grupos III com o II, e III com o IV.

## **5 DISCUSSÃO**



## 5 DISCUSSÃO

O modelo de colite experimental descrito por MACPHEARSON e PFEIFFER (1978), e empregado por MORAES (1987) e HAJAR (1994), foi utilizado para estudar o efeito da suplementação nutricional com GLN, sobre as alterações da arquitetura tecidual colônica e da permeabilidade vascular, conseqüentes ao processo inflamatório induzido pela ação do ácido acético.

Este modelo não reproduz exatamente a situação da doença humana, no entanto permite reproduzir as alterações histológicas características da retocolite ulcerativa (úlceras, infiltração polimorfonuclear, abscessos crípticos, depleção das células mucinosas), possibilitando a experimentação das mais diversas modalidades terapêuticas.

Inúmeros estudos em ratos, demonstraram que o trato gastrintestinal metaboliza ativamente substratos circulantes e os provenientes da luz intestinal, sendo a captação e utilização da GLN a mais importante entre todos os aminoácidos. O metabolismo da GLN pelo enterócito é um aspecto integral da função do intestino como regulador do balanço nitrogenado em estado normal e catabólico (SOUBA, SMITH e WILMORE, 1985)(1). Tanto as células do intestino delgado como do grosso, utilizam a GLN como fonte de energia, constituindo-se o aminoácido, o maior substrato metabólico para ambos, enterócitos e colonócitos (KIGHT e FLEMING, 1993; PLATELL, MCCAULEY, MCCULLOCH, HALL, 1993). A mucosa intestinal está capacitada para utilizar a GLN como fonte de energia, já que contém a maior atividade de glutaminase dentre todos os tecidos (ROEDIGER, 1982; GRANT e SNYDER, 1988).

Um número cada vez maior de estudos clínicos e experimentais documentam a eficácia da nutrição enriquecida com GLN. No momento, a maior parte dos dados provêm de estudos animais que mostraram efeitos benéficos sob diversas circunstâncias patológicas. Neste trabalho foi utilizado o rato como animal de estudo porque as referências no sentido do metabolismo da glutamina e a reprodutibilidade do modelo inflamatório, estão amplamente documentadas.

O mecanismo de ação da GLN em nutrição é ainda pouco claro. É muito provável que a suplementação exerça um número de efeitos, ainda não completamente identificado, todos interrelacionados. Assim a combinação do aumento da síntese de proteínas e redução das respostas catabólicas protéicas, melhoraria a retenção de nitrogênio. A

importante substrato metabólico para as células intestinais; sua ação sobre as células do sistema imune e sua função como precursor de antioxidantes teciduais, seriam características determinantes para a manutenção da mucosa intestinal (ZIEGLER, SMITH, BYRNE e WILMORE 1993). Baseados nestes, outros estudos tanto clínicos como experimentais nos casos de queimaduras, traumas, cirurgia, infecções, doença inflamatória intestinal, dano da mucosa por quimio e radioterapia, foram desenvolvidos no sentido de avaliar os efeitos potencialmente benéficos do enriquecimento da dieta com glutamina (SOUBA, SMITH, WILMORE, 1985(1); GRANT e SNYDER, 1988; KLIMBERG, SOUBA, DOLSON, SALLOUM, HAUTAMAKI, PLUMLEY, MENDENHALL, BOVA, KHAN, HACKETT, BLAND, COPELAND III, 1990; FOX, KRIPKE, BERMAN, MCGINTEY, SETTLE e ROMBEAU 1988; YOSHIMURA, MOCHIZUKI, YOSHIZUMI, YAMAMOTO, e TAMAKUMA, 1993; ZIEGLER, SMITH, BYRNE e WILMORE 1993; FUJITA, MATSUMOTO ODAKA, SAKURAI, 1994; SCHEPPACH, DUSEL, LOGES, KUHN, BARTRAM, RICHTER, CHRISTL, KARCH e KASPER, 1995).

Os parâmetros utilizados neste estudo para avaliar o efeito da GLN sobre a mucosa colônica foram a histologia, avaliando as modificações da citoarquitetura, e o azul de Evans, corante vital utilizado para avaliar o edema conseqüente ao extravasamento protéico devido as alterações na permeabilidade capilar observadas no processo inflamatório, e presentes neste modelo de colite experimental (HAJAR, 1994).

Neste estudo de colite induzida, observou-se melhora significativa em todos os grupos comparados com o controle, quando avaliada pela concentração do azul de Evans, não acontecendo o mesmo quanto ao reparo histológico. Somente o grupo III, que recebeu glutamina pós indução da lesão, apresentou melhora significativa dos parâmetros histológicos. Este fato se deve a que o azul de Evans extravasado, reflete as mínimas alterações vasculares, sendo estas as primeiras a serem reparadas no processo de restauração, antecedendo à reestruturação da arquitetura tecidual, após injúria.

A glutamina é precursor essencial do glutation, o qual em condições de estresse atua como antioxidante, protegendo os tecidos da ação dos radicais livres. A diminuição da permeabilidade vascular, evidenciada pela diminuição do azul de Evans tecidual, estaria perfeitamente explicada pela proteção das células endoteliais à injúria causada pelos radicais livres, mantendo a integridade das junções celulares (HELTON, 1994). Outros têm explicado a

ação protetora da GLN, sobre as células endoteliais, por se constituir em fonte de energia através da geração de ATP (SCHELTINGA, YOUNG BENFELL, BYE, ZIEGLER, SANTOS, ANTIN, SCHLOERB, WILMORE, 1991). Assim visto, a GLN diminuiria o extravasamento de fluidos através das células endoteliais.

No complexo mecanismo de alteração da permeabilidade durante a inflamação, os polimorfonucleares desempenham função importante, através da produção de radicais livres, citocinas, produtos quimiotáticos como os produtos do metabolismo do ácido araquidônico (leukotrieno B<sub>4</sub>). A GLN poderia influenciar indiretamente sobre os mediadores intracelulares como o AMPc (adenosina-monofosfato-cíclico) e o cálcio, aumentando a resistência das junções celulares (LI, LANGKAMP-HENKEN, SUZUKI, STAHLGREN, 1994). A GLN poderia manter a função de barreira da mucosa limitando os eventos inflamatórios que resultam da produção de citocinas e infiltração neutrofílica. A transmigração de neutrófilos através de gradientes quimiotáticos, diminuem a resistência das junções celulares. A infiltração de neutrófilos observada neste modelo de colite, ver-se-ia beneficiada pela suplementação de GLN, através da sua ação antioxidante evitando a lesões das células endoteliais pelos radicais livres, e também aumentando a resistência das junções intercelulares, o qual por sua vez, evitaria a migração de neutrófilos resultando em menor produção de citocinas e produtos quimiotáticos.

Tem sido demonstrado que a administração oral da glutamina estimula a sua captação através do incremento da atividade da enzima glutaminase. O metabolismo acelerado da glutamina na mucosa intestinal no momento da injúria poderia ser benéfico, melhorando a função intestinal durante seu reparo (KLIMBERG, SOUBA, DOLSON, SALLOUM, HAUTAMAKI, PLUMLEY, MENDENHALL, BOVA, KHAN, HACKETT, BLAND e COPELAND III, 1990). Neste estudo de colite induzida pela ação do ácido acético, em um dos grupos estudou-se o efeito da administração de GLN antes de induzida a lesão, não sendo observado o virtual efeito protetor, referido por outros.

O efeito trófico sobre o epitélio colônico evidenciou-se no nosso trabalho, pela aceleração no processo de reparo. A mucosa, lesada pela ação do ácido, apresentou no 7º dia após a indução, as características de maior severidade como previamente demonstrado (HAJAR, 1994). O estudo histopatológico realizado com amostras colônicas dos ratos alimentados com GLN, demonstram melhora significativa dos parâmetros estudados no grupo que recebeu a suplementação depois do início do experimento. Este efeito trófico foi



demonstrado por outros que encontraram aumento da espessura da mucosa, com aumento da celularidade e número de mitose nas criptas, em animais alimentados com dieta enriquecida com GLN (CAMPOS, MUCERINO WAITZBERG, LOGULO, EL IBRAHIM, NADALIN, e HABR-GAMA 1994; SCHEPPACH, LOGES, BARTRAM, CHRISTL, RICHTER, DUSEL, STEHLE, FUERST, e KASPER, 1994). As dietas suplementadas com GLN podem modificar as respostas do cólon agredido, favorecendo a renovação das criptas e acelerando o processo de reparo.

Somados todos esses efeitos à ação sobre a síntese de ácidos nucléicos e de proteínas, e a sua capacidade de oxidação constituindo-se em substrato energético, revelariam a GLN como fator determinante para aceleração do processo de reparo observado, no presente estudo.

## **6 CONCLUSÕES**

## 6 CONCLUSÕES

Analisando os resultados do presente estudo conclui-se que:

1 - A suplementação nutricional com glutamina acelerou o processo de reparo da arquitetura histológica colônica e induziu a diminuição da permeabilidade vascular.

2 - Os melhores resultados foram observados no grupo que recebeu a glutamina no período pós-indução da colite.

## **7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVERDI, J. C. *Effects of glutamine-supplemented diets on immunology of the gut. Journal of Parenteral and Enteral Nutrition*, Silver Spring, v. 14, supplement, p. 109S - 113S, 1990.
- ALVERDY, J.; AOYS, E.; MOSS, G. *Total parenteral nutrition promotes bacterial translocation from the gut. Surgery*, Saint Louis, v. 104, p.185 - 189, 1988.
- BABST, R.; HÖRIG, H, STEHLE, P.; BRAND, O.; FILGUEIRA, L.; MARTI, W.; FISCHER, M.; OBERHOLZER, M.; GUDAT, F.; FÜRST, P.; HEBERER, M. *Glutamine peptide-supplemented long term total parenteral nutrition: effects on intracellular and extracellular amino acid patterns, nitrogen economy, and tissue morphology in growing rats. Journal of Parenteral and Enteral Nutrition*, Silver Spring, v. 17, p. 566 - 574, 1993.
- BARK, T.; SVENBERG, T.; THEODORSSON, E.; URIBE, A.; WENNBERG, A. *Glutamine supplementation does not prevent small bowel mucosal atrophy after total parenteral nutrition in the rat. Clinical Nutrition*, Bethesda, v. 13, p. 79 - 84, 1994.
- BORDÓN DE CORVALÁN, A. C., *Aplicação do micrométodo espectrofotométrico para a determinação de azul de Evans em plasma e tecido colônico de ratos Wistar*. Tese de Mestrado em Clínica Cirúrgica. Setor de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 1994.
- BOX, G.; HUNTER, W.; HUNTER, J. *Statistics for experimenter - an introduction to design data analysis and model building*. 1 ed., New York, John Wiley & Sons, 1978.
- BURKE, A. J.; ALVERDY, J. C.; AOYS, E.; MOSS, G. S. *Glutamine-supplemented total parenteral nutrition improves gut immune function. Archives of Surgery*, Chicago, v. 124, p. 1396 - 1399, 1989.
- CALDER, P. C. *Glutamine and the immune system. Clinical Nutrition*, Bethesda, v. 13, p. 2 - 8, 1994.
- CAMPOS, F. G.; MUCERINO, D. R.; WAITZBERG, LOGULO, A. F.; EL IBRAHIM, R.; NADALIN, W.; HABR-GAMA, A. *Efeitos protetores da glutamina e dieta elementar na enterocolite actínica aguda: avaliação histológica. Revista da Associação Médica Brasileira*, São Paulo, v. 40, p. 143 - 149, 1994.
- CHEN, K.; OKUMA, T.; OKAMURA, K., TORIGOE, Y.; MIYAUCHI, Y. *Glutamine supplemented parenteral nutrition improves mucosa integrity and function in endotoxemic rats. Journal of Parenteral and Enteral Nutrition*, Silver Spring, v. 18, p. 167 - 171, 1994.
- FINNIE, I. A.; TAYLOR, B. A.; RHODES, J. M. *Ileal and colonic epithelial metabolism in quiescent ulcerative colitis: increased glutamine metabolism in distal colon but no defect en butyrate metabolism. Gut*, London, v. 34, p. 1552 - 1558, 1993.

- FLEMING, S. E.; FITCH, M. D.; DEVRIES, S.; LIU, M. L.; KIGHT, C. *Nutrient utilization by cells isolated from rat jejunum, cecum and colon.* **Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 121, p. 869 - 878, 1991.
- FOX, A. D.; KRIPKE, S. A.; BERMAN, J. M.; MCGINTEY, R. M.; SETTLE, R. G.; ROMBEAU, J.L. *Dexamethasone administration induces increased glutaminase specific activity in the jejunum and colon.* **Journal of Surgical Research**, New York, v. 44, p. 391 -396, 1988.
- FOX, A. D.; KRIPKE, S. A.; DEPAULA, J. A.; BERMAN, J. M.; SETTLE, R. G.; ROMBEAU, J. L. *Glutamine supplemented diets prolong survival and decrease mortality in experimental enterocolitis.* **Journal of Parenteral and Enteral Nutrition**, Silver Spring, v. 12, supplement, p. 8, 1988.
- FUJITA, T.; MATSUMOTO, M.; ODAKA, M.; SAKURAI, K. *Efficacy of glutamine-enriched enteral nutrition in an experimental model of mucosal ulcerative colitis.* **Journal of Parenteral and Enteral Nutrition**, Silver Spring, v. 18, supplement, p. 28S, 1994.
- GRANT, J. P.; SNYDER, P. J. *Use of l-glutamine in total parenteral nutrition.* **Journal of Surgical Research**, New York, v. 44, p. 506 - 513, 1988.
- HAJAR, N. *O uso do azul de Evans para avaliar a permeabilidade vascular na colite induzida com ácido acético a 10% em ratos Wistar.* Tese de Mestrado em Clínica Cirúrgica. Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 1994.
- HELTON W. S. *The pathophysiologic significance of alterations in intestinal permeability induced by total parenteral nutrition and glutamine.* **Journal of Parenteral and Enteral Nutrition**, Silver Spring, v. 18, p. 289 -290, 1994.
- HIGASHIGUCHI, T.; HASSELGREN, P-O.; WAGNER, K.; FISCHER, J. E. *Effect of glutamine on protein synthesis in isolated intestinal epithelial cells.* **Journal of Parenteral and Enteral Nutrition**, Silver Spring, v. 17, p 307 - 314, 1993.
- INOUE, Y.; GRANT, J. P.; SNYDER, P. J.(1) *Effect of glutamine supplemented total parenteral nutrition on recovery of the small intestine after starvation atrophy.* **Journal of Parenteral and Enteral Nutrition**, Silver Spring, v. 17, p. 165- 170, 1993.
- \_\_\_\_\_(2) *Effect of glutamine supplemented intravenous nutrition and survival after Escherichia-coli induced peritonitis.* **Journal of Parenteral and Enteral Nutrition**, Silver Spring, v. 17, p. 41 - 46, 1993.
- KIGHT, C. E.; FLEMING, S. E. *Nutrient oxidation by rat intestinal epithelial cells is concentration dependent.* **Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 123, p. 876 - 882, 1993.

- 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**, Philadelphia, v. 66, p. 62 - 68, 1990.
- LI, J.; LANGKAMP-HENKEN, B.; SUZUKI, K.; STAHLGREN, L. H. *Glutamine prevents parenteral nutrition induced increases in intestinal permeability*. **Journal of Parenteral and Enteral Nutrition**, Silver Spring, v. 18, p. 303 - 307, 1994.
- MACPHERSON, B. R.; PFEIFFER, C. J. *Experimental production of diffuse colitis in rats*. **Digestion**, Basel, v. 17, p. 135 - 150, 1978.
- MC ANENA, O. J.; MOORE, F. A.; MOORE, E. E.; JONES, T. N.; PARSONS, P. *Selective uptake of glutamine in the gastrointestinal tract: confirmation in a human study*. **British Journal of Surgery**, Guildford, v. 78, p. 480 - 482, 1991.
- MORAES, R. S. *Indução da colite difusa pelo ácido acético via retal*. Tese de Mestrado em Clínica Cirúrgica. Setor de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 1994.
- O'RIORDAIN, M. G.; FEARON, K. C. H.; ROSS, J. A.; ROGERS, P.; FALCONER, J. S.; BARTOLO, D. C. C.; GARDEN, O. J.; CARTER, D. C. *Glutamine supplemented total parenteral nutrition enhances T-lymphocyte response in surgical patients undergoing colorectal cancer resection*. **Annals of Surgery**, Philadelphia, v. 220, p. 212 - 221, 1994.
- PLATELL, C.; MCCAULEY, R.; MCCULLOCH, R.; HALL, J. *The influence of parenteral glutamine and branched-chain amino acid on total parenteral nutrition induced atrophy of the gut*. **Journal of Parenteral and Enteral Nutrition**, Silver Spring, v. 17, p. 348 - 354, 1993.
- ROEDIGER, W. E. W. *Utilization of nutrients by isolated epithelial cells of the rat colon*. **Gastroenterology**, Philadelphia, v. 83, p. 424 - 429, 1982.
- RÖHRIG, C. E.; *Efeitos da glutamina no sistema monomorfonuclear de fagócitos, na icterícia obstrutiva*. Tese de Doutorado. Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 1995.
- ROTH, E.; KARNER, J.; OLLENSCHLAGER, G. *Glutamine: an anabolic effector ?*. **Journal of Parenteral and Enteral Nutrition**, v. 14, supplement, p. 130S - 136S, Silver Spring, 1990.
- SCHELTINGA, M. R.; YOUNG, L. S.; BENFELL, K.; BYE, R. L.; ZIEGLER, T. R.; SANTOS, A. A.; ANTIN, J. H.; SCHLOERB, P. R.; WILMORE, D. W. *Glutamine-enriched intravenous feedings attenuate extracellular fluid expansion after a standard stress*. **Annals of Surgery**, Philadelphia, v. 214, 385 - 395, 1991.

- SCHEPPACH, W.; DUSEL, G.; LOGES, G.; KUHN, T.; BARTRAM, P.; RICHTER, F.; CHRISTL, S.; KARCH, H.; KASPER, H. *Effect of l-glutamine on the barrier function of rat colon. Abstracts of papers presented at the D.D.W, San Diego, n. 3021, 1995.*
- SCHEPPACH, W.; LOGES, C.; BARTRAM, P.; CHRISTL, S. U.; RICHTER, F.; DUSEL, G.; STEHLE, P.; FUERST, P. KASPER, H. *Effect of free glutamine and alanyl-glutamine dipeptide on mucosal proliferation of the human ileum and colon. Gastroenterology, Philadelphia, v. 107, p. 429 -434, 1994.*
- SCOTT, T. E.; MOELLMAN, J. R. *Intravenous glutamine fails to improve gut morphology after radiation injury. Journal of Parenteral and Enteral Nutrition, Silver Spring , v. 16, p. 440 - 444, 1992.*
- SMITH, R. J. *Glutamine metabolism and its physiologic importance. Journal of Parenteral and Enteral Nutrition, Silver Spring, v. 14, supplement, p. 40S - 44S, 1990.*
- SOUBA, W. W.; HERSKOWITZ, K.; AUSTGEN, T. R.; CHEN, M. K.; SALLOUM, R. M. *Glutamine nutrition: theoretical considerations and therapeutic impact. Journal of Parenteral and Enteral Nutrition, Silver Spring, v. 14, supplement, p. 237S - 243 S, 1990.*
- SOUBA, W. W.; HERSKOWITZ, K.; SALLOUM, R. M.; CHEN, M. K.; AUSTGEN, T. R. *Gut glutamine metabolism. Journal of Parenteral and Enteral Nutrition, Silver Spring, v. 14, supplement, p. 45S - 50S, 1990.*
- SOUBA, W. W.; KLIMBERG, V. S.; HAUTAMAKI, R. D.; MENDENHALL, W. H.; BOVA, F. C.; HOWARD, R. J.; BLAND, K I.; COPELAND III, E. M. *Oral glutamine reduces bacterial translocation following abdominal radiation. Journal of Surgical Research, Silver Spring, v. 48, p. 1 - 5, 1990.*
- SOUBA, W. W.; SMITH, R. J.; WILMORE, D. W. (1) *Effects of glucocorticoids on glutamine metabolism in visceral organs. Metabolism, Duluth, v. 34, p. 450 - 456, 1985.*
- \_\_\_\_\_(2) *Glutamine metabolism by the intestinal tract. Journal of Parenteral and Enteral Nutrition, Silver Spring, v. 9, p. 608 - 617, 1985.*
- WEIR, C. D.; ANDERSON, N. G.; MCCAIGUE, M.; HALLIDAY, M. I.; ROWLANDS, B. I. *The effect of glutamine supplemented elemental diet on disease activity in a chronic colitis model. Journal of Parenteral and Enteral Nutrition, Silver Spring, v. 17, supplement, 34S, 1993.*
- YOSHIMURA, K.; MOCHIZUKI, H.; YOSHIZUMI, T.; YAMAMOTO, T.; TAMAKUMA, S. *Effect of enteral glutamine administration on experimental inflammatory bowel disease. Journal of Parenteral and Enteral Nutrition, Silver Spring, v. 17, supplement, p. 23S, 1993.*
- ZIEGLER, T. R.; SMITH, R. J.; BYRNE, T. A.; WILMORE, D. W. *Potential role of glutamine supplementation in nutrition support. Clinical Nutrition, Bethesda, v. 12, supplement, p. S82 - S90, 1993.*