



Universidade do Estado do Rio de Janeiro
Centro Biomédico
Faculdade de Ciências Médicas

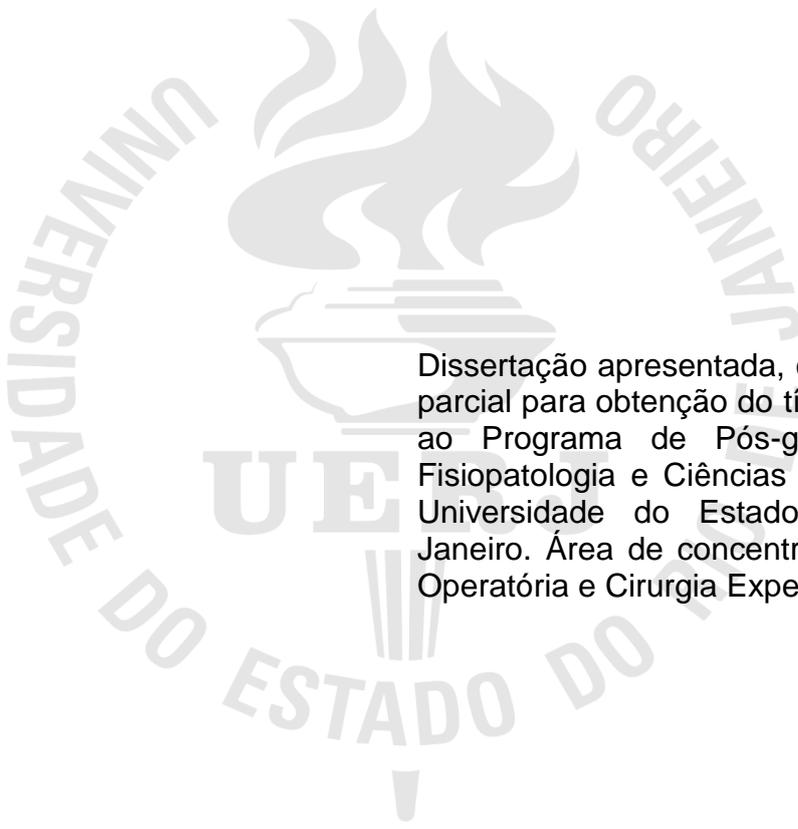
Erica Silva Lima

Efeito da suplementação dietética com L-glutamina na sepse abdominal induzida em rato

Rio de Janeiro
2012

Erica Silva Lima

**Efeito da suplementação dietética com L-glutamina na sepse abdominal
induzida em rato**



Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre ao Programa de Pós-graduação em Fisiopatologia e Ciências Cirúrgicas, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: Técnica Operatória e Cirurgia Experimental.

Orientador: Prof. Dr. Ruy Garcia Marques

Rio de Janeiro

2012

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

L732 Lima, Erica Silva.
Efeito da suplementação dietética com L-glutamina na sepse abdominal induzida em rato / Erica Silva Lima. – 2012.
50 f.

Orientador: Ruy Garcia Marques.
Dissertação (Mestrado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Faculdade de Ciências Médicas. Pós-graduação em Fisiopatologia e Ciências Cirúrgicas.

1. Glutamina – Teses. 2. Resposta imune - Teses. 3. Citocinas - Teses. 4. Interleucina - 10. 5. Suplementos dietéticos – Teses. 6. Sepse – Teses. I. Marques, Ruy Garcia. II. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

CDU 547.466.64:616.94

Autorizo apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação, desde que citada a fonte.

Assinatura

Data

Erica Silva Lima

**Efeito da suplementação dietética com L-glutamina na sepse abdominal
induzida em rato**

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre ao Programa de Pós-graduação em Fisiopatologia e Ciências Cirúrgicas, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: Técnica Operatória e Cirurgia Experimental.

Aprovada em 04 de julho de 2012.

Orientador:

Prof. Dr. Ruy Garcia Marques
Faculdade de Ciências Médicas– UERJ

Banca Examinadora:

Prof.^a Dra. Cristina Fajardo Diestel
Faculdade de Ciências Médicas – UERJ

Prof. Dr. Marcelo Abidu Figueiredo
Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro – UFRJ

Prof.^a Dra. Nara Limeira Horst
Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ

Rio de Janeiro

2012

DEDICATÓRIA

À minha mãe e ao meu pai,
que sempre caminharam ao meu lado,
em todos os passos da minha vida.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a algumas pessoas que participaram, direta ou indiretamente, desta importante fase da minha vida.

Primeiramente ao Dr. Carlos Eduardo Rodrigues Caetano, veterinário e amigo, que me trouxe para a UERJ e com quem dividi cada momento de toda esta jornada. Agradeço pelas mãos habilidosas, indispensáveis nos procedimentos cirúrgicos e pelas palavras de apoio de sempre. Sem ele nada disso teria sido possível.

Ao meu orientador, Dr. Ruy Garcia Marques, pela paciência, pelo incentivo em todos os momentos e, principalmente, pela sabedoria. Meu orgulho total e irrestrito, e admiração eterna!

À Luciane Pires, nutricionista, pelos primordiais ensinamentos iniciais, pelas angústias divididas, pelos dias inteiros de procedimentos e tardes de conversas.

À Cristina Fajardo Diestel, nutricionista, pela enorme boa vontade em partilhar seu (pouco) tempo comigo, pela ajuda imprescindível.

Aos bioteristas do Laboratório de Cirurgia Experimental, Alessandra Demétrio do Nascimento e Domingos Henrique de Souza Peçanha, pelo auxílio com os animais e apoio nos trabalhos de laboratório.

Ao Professor Arnaldo Feitosa Braga de Andrade e ao Denilson Batista, microbiologista, do Departamento de Microbiologia da Universidade do Estado do Rio de Janeiro, por todo o carinho, trabalho e disposição prestados.

A algumas pessoas que fizeram parte desta jornada, com seus generosos corações, Monica Ferreira Bispo Sampaio e Maria Goretti Torres Bezerra, Carla Gallo, por toda sua paciência, Rosalina Alves Pinto e Eglaise de Miranda Esposto, pelo carinho e e-mails prontamente respondidos.

Aos meus amigos, por todas as corridas que não fiz, por todos os almoços que não pude comparecer e por todas as viagens que deixamos de fazer.

À minha querida e indispensável mãe, Neuza da Silva Lima, por toda paciência e apoio incondicionais, meu eterno agradecimento.

Ao meu querido pai, Mâncio Lima Sobrinho que, de onde estiver, tenho certeza, estará orgulhoso e vibrando com minha vitória.

E às demais pessoas que contribuíram, de alguma maneira, para que este trabalho pudesse ser realizado.

RESUMO

LIMA, Erica Silva. *Efeito da suplementação dietética com L-glutamina na sepse abdominal induzida em rato*. 2012. 50 f. Dissertação (Mestrado em Ciências - Fisiopatologia e Ciências Cirúrgicas) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2012.

Após o estímulo deflagrador de um trauma ou infecção, a liberação de citocinas na circulação sanguínea desempenha um importante papel efetor e também modulador da resposta imune sistêmica. Essas citocinas podem ser pró-inflamatórias, que estimulam a liberação de diversos tipos celulares e de outras citocinas, como fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α), interleucina 1 (IL-1), IL-2, IL-6, IL-8, IL-12 e interferon-gama (INF- γ); ou citocinas com efeitos antiinflamatórios, que inibem o processo inflamatório, em parte pela redução da produção de diversas citocinas que regulam positivamente a resposta, minimizando o comprometimento orgânico resultante, como IL-4, IL-10, IL-13. A L-glutamina é o aminoácido mais abundante no organismo, com importante papel no metabolismo protéico. Sua ação trófica sobre a mucosa do intestino delgado é bastante conhecida, o que a torna componente essencial para a manutenção estrutural e funcional do intestino. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da suplementação dietética com L-glutamina na modulação da resposta inflamatória em animais submetidos a sepse abdominal induzida por ligadura e perfuração cecal. Foram utilizados 24 ratos *Wistar* machos adultos, com peso inicial entre 200 e 230 g, distribuídos em três grupos, cada um com oito animais, da seguinte forma: grupo I (controle) – submetidos a operação simulada (laparotomia e manipulação de alças intestinais); grupo II – submetidos a laparotomia, com indução de sepse abdominal; e grupo III – receberam suplementação dietética com L-glutamina por sete dias e, após, foram submetidos a indução de sepse abdominal. Foram coletadas amostras sanguíneas de todos os animais antes (tempo 0) e duas e quatro horas (tempos 1 e 2) após a indução da sepse abdominal. Foram verificados o número de leucócitos, a dosagem da concentração plasmática de citocinas pró- e antiinflamatórias (INF- γ , IL-6 e IL-10) e análise microbiológica de líquido peritoneal. A glicemia apresentou aumento significativo em todos os grupos, comparando-os ao início e ao final do experimento ($p < 0,05$). No que concerne à IL-10, observou-se aumento significativo nos animais do grupo III entre os tempos 0 e 2, e entre os tempos 1 e 2 ($p = 0,0331$ e $p = 0,0155$, respectivamente). Não se observou qualquer outra diferença ao serem analisadas as demais citocinas (INF- γ e IL-6), em todos os grupos e em todos os momentos analisados. Nossos achados sugerem que a suplementação dietética com L-glutamina em animais submetidos à indução de sepse abdominal com modelo CLP parece potencializar a resposta antiinflamatória, aumentando a concentração plasmática de IL-10, enquanto as concentrações de INF- γ e IL-6 não apresentaram variação significativa.

Palavras-chave: Sepse. CLP. Citocinas. L-glutamina.

ABSTRACT

After the triggering stimulus of trauma or infection, the release of cytokines into the bloodstream plays an important effector and modulator role on the systemic immune response. These cytokines may be pro-inflammatory, stimulating the release of several cell types and other cytokines, such as tumor necrosis factor-alpha (TNF- α), interleukin 1 (IL-1), IL-2, IL-6, IL-8, IL-12 and interferon-gamma (IFN- γ); or cytokines with anti-inflammatory effects that inhibit the inflammatory process, in part by reducing the production of several cytokines that positively regulate the response, minimizing the resulting organic damages, such as IL-4, IL-10, IL-13. L-Glutamine is the most abundant amino acid in the body, with an important role in protein metabolism, acting as a vehicle for nitrogen transport. Its trophic action on the small intestinal mucosa is well known, which makes it an essential component in the maintenance of the bowel structure and function. This study aimed at evaluating the effect of the dietary supplementation with L-glutamine in modulating the inflammatory response in animals submitted to the induction of abdominal sepsis by cecal ligation and puncture (CLP). We used 24 adult male Wistar rats, initially weighing between 200 and 230 g, divided into three groups, each with eight animals as follows: group I (control) – sham operation (laparotomy and manipulation of the bowel); group II – laparotomy with induction of abdominal sepsis; and group III – dietary supplementation with L-glutamine for seven days and after submitted to the induction of abdominal sepsis. Blood samples were collected from all animals before (time 0) and two and four hours (times 1 and 2) after the induction of abdominal sepsis. We verified white blood cell (WBC) count, the plasmatic concentration of pro- and anti-inflammatory cytokines (INF- γ , IL-6 and IL-10), and the microbiological analysis of peritoneal fluid. Blood glucose increased significantly in all groups, comparing them in the beginning and in the end of the experiment ($p < 0.05$). Concerning to IL-10, we observed a significant increase in the animals of group III between times 0 and 2, and times 1 and 2 ($p = 0.0331$ and $p = 0.0155$, respectively). We did not observe any difference in the analysis of the other cytokines (INF- γ and IL-6) in all groups and at all times. Our findings suggest that dietary supplementation with L-glutamine in animals submitted to the induction of abdominal sepsis with CLP model seems to enhance the anti-inflammatory response, increasing the plasmatic concentration of IL-10, while the concentration of INF- γ and IL-6 did not present significant change.

Keywords: Sepsis. CLP. Cytokines. L-glutamine.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Indução de sepse abdominal em ratos pelo método CLP: A – Ligadura do ceco; B – Perfuração nas faces cranial e caudal do ceco com agulha 19G; C – Compressão digital do ceco para extravasamento de seu conteúdo.....	20
Figura 2 –	Evolução da concentração plasmática de IL-10 (pg/ml) nos três momentos do experimento, em cada grupo de animais.....	26
Figura 3 –	Evolução da concentração plasmática de INF- γ (pg/ml) nos três momentos do experimento, em cada grupo de animais.....	26
Figura 4 –	Evolução da concentração plasmática de IL-6 (pg/ml) nos três momentos do experimento, em cada grupo de animais.....	27

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Análise descritiva do leucograma (células/mm ³) nos diversos grupos de animais, nos tempos 0, 1 e 2.....	24
Tabela 2 –	Análise descritiva da glicemia (mg/dL) nos diversos grupos de animais, nos tempos 0, 1 e 2.....	25
Tabela 3 –	Identificação dos microorganismos no líquido peritoneal dos animais dos grupos II e III.....	28

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

% –	percentual
μg –	micrograma
μl –	microlitro
< –	menor do que
> –	maior do que
CASP –	<i>Colon ascendens stent peritonitis</i>
CLP –	<i>Cecal ligation and puncture</i>
cm –	centímetro
dL –	decilitro
G –	Gauge
g –	grama
GLUT –	L-glutamina
IL –	interleucina
INF-γ –	interferon-gama
kg –	quilograma
LPs –	lipopolissacarídeo
mg –	miligrama
ml –	mililitro
mm ³ –	milímetro cúbico
ng –	nanograma
°C –	graus Celsius
pg –	picograma
TNF-α –	Fator de necrose tumoral-alfa
vs. –	versus

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO.....	11
1	OBJETIVO.....	16
2	MÉTODO.....	17
2.1	Aspectos éticos nos cuidados com os animais.....	17
2.2	Animais e grupos.....	17
2.3	Composição da ração comercial.....	18
2.4	Suplementação dietética com L-glutamina.....	18
2.5	Procedimentos cirúrgicos.....	19
2.6	Controle pós-operatório.....	19
2.7	Análises laboratoriais.....	20
2.7.1	<u>Dosagens séricas.....</u>	20
2.7.2	<u>Análises de citocinas plasmáticas.....</u>	21
2.7.3	<u>Análise microbiológica.....</u>	22
2.8	Análise estatística.....	23
2.9	Financiamento.....	23
3	RESULTADOS.....	24
3.1	Evolução dos animais.....	24
3.2	Análises sanguíneas.....	24
3.2.1	<u>Leucometria.....</u>	24
3.2.2	<u>Glicemia.....</u>	25
3.2.3	<u>Análise de citocinas plasmáticas.....</u>	25
3.3	Análise microbiológica do líquido peritoneal.....	27
4	DISCUSSÃO.....	29
5	CONCLUSÃO.....	37
	REFERÊNCIAS.....	38
	APÊNDICE – Análises sanguíneas.....	47
	ANEXO – Aprovação da Comissão de Ética para o cuidado e uso de animais experimentais.....	50

INTRODUÇÃO

Apesar do avanço da Medicina, diversos fatores ainda contribuem para o aumento da incidência de sérias infecções cirúrgicas, como procedimentos cirúrgicos longos, doenças sistêmicas debilitantes associadas, implantes de materiais estranhos ao organismo, transplantes de órgãos com uso de agentes imunossupressores e diversas modalidades invasivas de diagnóstico e tratamento que predispõem à maior exposição bacteriana ou diminuição da defesa normal do hospedeiro [1]. Ainda assim, apesar do uso de antibióticos de amplo espectro, e de importantes avanços no monitoramento dos pacientes, a sepse continua sendo a principal causa de morte nas unidades cirúrgicas de tratamento intensivo [2]. Com isso, muitos estudos vêm sendo realizados, visando à melhor compreensão da complexa fisiopatologia da sepse bacteriana.

A integridade estrutural e funcional da mucosa intestinal constitui um fator protetor importante contra o fenômeno da translocação bacteriana, definida como a passagem das bactérias do lúmen entérico através da barreira intestinal para os tecidos previamente estéreis, tais como linfonodos, fígado, baço e sangue [3,4].

Existem evidências de uma associação entre translocação bacteriana e sepse em pacientes cirúrgicos [5]. Estudos mostram que o aumento na permeabilidade da parede intestinal em pacientes críticos está associado a uma elevação da incidência de translocação bacteriana e suas toxinas do lúmen intestinal para a circulação sistêmica [6,7]. Este fenômeno parece ser de grande relevância para a eclosão da sepse, do choque, da síndrome da resposta inflamatória sistêmica e, conseqüentemente, da síndrome da disfunção múltipla dos órgãos [8]. A translocação bacteriana não envolve apenas a migração de bactérias intestinais através do intestino, mas também as suas conseqüências, como infecção de tecidos extra-intestinais, com resposta inflamatória sistêmica subsequente [9].

A resposta sistêmica ao trauma ou infecção é uma tentativa do organismo em neutralizar a agressão e manter ou recuperar a homeostasia [10]. Existem duas vertentes principais desta ação: a resposta inflamatória, importante no controle do agente agressor, remoção de restos celulares e cicatrização; e a resposta antiinflamatória, que controla a extensão dos danos e promove o reparo das lesões causadas pela resposta inflamatória [11]. A interação destes padrões de resposta envolve a liberação e ativação de diversos mediadores endógenos, como p.ex.

citocinas, mediadores lipídicos, proteínas de fase aguda e componentes das cascatas de complemento e da coagulação [12].

As citocinas agem como mediadores da resposta imunológica [13] e exercem papel primordial na resposta do hospedeiro. Liberadas primeiramente pelas células residentes e, posteriormente, pelas células recrutadas para o foco infeccioso, como p.ex. os leucócitos, que, sendo ativados, aumentarão a atividade microbicida, o que é fundamental para o controle da infecção [14].

Após o estímulo deflagrador, a liberação de citocinas na circulação sanguínea desempenha um importante papel efetor e também modulador da resposta sistêmica [15,16]. Essas citocinas podem ser, em geral, agrupadas em função de seu efeito preponderante, como pró- ou antiinflamatórias. As citocinas tipicamente pró-inflamatórias, que estimulam a liberação de diversos tipos celulares e de outras citocinas, são: fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α), interleucinas 1, 2, 6, 8 e 12 (IL-1, IL-2, IL-6, IL-8 e IL-12, respectivamente) e interferon-gama (INF- γ); as citocinas com efeitos antiinflamatórios, que inibem o processo inflamatório, em parte pela redução da produção de diversas citocinas que regulam positivamente a resposta, minimizando o comprometimento orgânico resultante, são: interleucinas 4, 10 e 13 (IL-4, IL-10 e IL-13, respectivamente) [11,17,18].

A diversidade das doenças, microrganismos causadores e outras variáveis nos pacientes sépticos dificultam a realização de estudos clínicos controlados. Assim, estudos com modelos experimentais em animais que mimetizam situações clínicas têm sido cada vez mais utilizados [19].

Diversos modelos animais de sepse vêm sendo desenvolvidos e, na maioria deles, um foco de infecção intra-abdominal é gerado para iniciar a inflamação sistêmica. Duas estratégias diferentes podem ser levadas a efeito para instalação desse foco infeccioso: inoculação de bactérias ou extravasamento de fezes na cavidade peritoneal. Eles mimetizariam as mudanças fisiopatológicas típicas encontradas em pacientes sépticos [20].

A administração endovenosa de lipopolissacarídeos (LPS) ou de bactérias, como a *Escherichia coli*, é largamente utilizada para o estudo da sepse, por mimetizar vários efeitos observados em pacientes com sepse e choque séptico [19,21]. No modelo LPS, uma endotoxina é inoculada por via endovenosa ou diretamente na cavidade peritoneal, porém este método produz baixo nível de endotoxemia [19,21].

A administração intraperitoneal da bactéria viva ou de componentes microbianos é um modelo também muito utilizado para o estudo da sepse, pois reproduz os sinais observados na doença, como observado no modelo de endotoxemia. Além disso, a administração de LPS ou bactérias na cavidade peritoneal aproxima-se mais de um quadro de sepse observado na clínica, pois o processo se inicia a partir do foco infeccioso ou da disseminação de LPS administrados na cavidade peritoneal, e não diretamente na circulação [21].

Na *Colon ascendens stent peritonitis* (CASP), um *stent* com diâmetro variável é cirurgicamente inserido no cólon ascendente. A sobrevida após este procedimento está diretamente correlacionada ao calibre do *stent* [22].

No modelo *Cecal ligation and puncture* (CLP), descrito inicialmente por Wichtermann *et al.*, em 1980, após a perfuração da parede intestinal, ocorre a liberação gradativa do conteúdo para a cavidade peritoneal, induzindo peritonite, que pode evoluir para um quadro de sepse e choque séptico [19,23]. Este modelo de lesão com liberação da microbiota bacteriana natural é o que mais se assemelha do quadro de sepse em humanos, decorrente de trauma com perfuração de alças intestinais ou peritonite pós-operatória [23], justificando a escolha do método utilizado neste estudo.

Somando-se às terapias antimicrobianas, com o objetivo de eliminar bactérias intestinais patogênicas em pacientes com risco de desenvolver sepse, estratégias para estabilizar a função da barreira intestinal alterada têm sido empregadas.

Novas abordagens terapêuticas levam em conta a utilização de nutrientes específicos em manipulações dietéticas, como p.ex. os aminoácidos, que agem como possíveis estimuladores do trofismo intestinal, minimizando o risco da ocorrência de translocação bacteriana [24-27].

L-glutamina (GLUT) é o aminoácido mais abundante no sangue, correspondendo a um terço do nitrogênio circulante sob a forma de aminoácidos. Sua concentração varia de 600 a 800 mM e funciona como veículo para o transporte de nitrogênio, que dará suporte à síntese de uréia no fígado e de amônia no rim [28]. Mediante a captação de amônia, compostos como nucleotídeos, mucopolisacarídeos e aminoácidos serão sintetizados [29,30].

Em 1938, Rose referiu-se à GLUT como um aminoácido não-essencial, haja vista que ela podia ser sintetizada em vários tecidos. Contudo, em algumas condições, como em traumas e na sepse, a demanda por GLUT excede a

capacidade do corpo de sintetizá-la. Isso a levou a ser reclassificada como nutriente condicionalmente essencial [25,31].

Linfócitos e macrófagos estão envolvidos na resposta não-específica de defesa do hospedeiro e assumem importante papel na fisiopatologia e/ou proteção da sepse [32,33]. Essas células são ávidas consumidoras de GLUT, de modo a garantirem a sua proliferação e ótima função [24,34]. Estudo anterior mostra que durante a inflamação, no período de sepse e injúria tecidual, o consumo de GLUT na circulação e pelas células imunes aumenta [35]. Portanto, a depleção de GLN, o que normalmente ocorre após trauma, exerce um efeito imunossupressor [36] e diminui a atividade bactericida dos macrófagos [37].

GLUT serve como importante fonte de energia para a proliferação rápida de células, especialmente enterócitos e células imunes [38-41], sendo por isso considerada como o combustível principal do sistema gastrointestinal [31,42]. Sua ação trófica sobre a mucosa do intestino delgado é bastante conhecida, o que a torna componente essencial para a manutenção estrutural e funcional do intestino, em condições normais [43]. Sua administração melhora o prognóstico de pacientes críticos, presumivelmente pela manutenção da barreira intestinal fisiológica, reduzindo a frequência de infecções [44,45].

A captação de GLUT pelas células epiteliais se dá a partir da luz intestinal e dos capilares, através da membrana basal. O transporte através da membrana, a partir do lúmen intestinal, se dá por meio de uma via sódio-dependente e, em menor escala, por uma via sódio-independente [46,47]. O metabolismo intracelular da GLUT é regulado por duas enzimas principais: a *glutaminase*, que catalisa a hidrólise da GLUT em glutamato, e a *glutamino-sintetase*, que catalisa a síntese de GLUT a partir de glutamato e amônia [48,49]. As células epiteliais da mucosa intestinal apresentam alta concentração de glutaminase, compatível com as altas taxas de captação e consumo de GLUT [50,51]. A glutatona, um produto do metabolismo da GLUT, protege os tecidos normais contra o dano oxidativo [52]. O intestino se constitui no principal órgão na síntese de glutatona, mas, na presença de estresse oxidativo, a diminuição da concentração de GLUT se constitui em um fator limitante para a sua síntese. Esse efeito pode ser minimizado com o fornecimento de suplementação adicional desse aminoácido. [53].

A concentração de GLUT no sangue cai significativamente em doenças graves, levando a um estado de depleção acentuada desse aminoácido [24, 54]. Em

pacientes sépticos, pode ser observada uma redução de até 75% na concentração intracelular de GLUT no músculo estriado, estando essa redução relacionada ao aumento da mortalidade [55].

A administração de GLUT mantém a barreira intestinal, diminui a translocação bacteriana para linfonodos mesentéricos e a disseminação de bactérias para o fígado, baço e pulmões, reduzindo, por conseguinte, a taxa de mortalidade. [56].

Inúmeros estudos vêm sendo realizados em busca de suporte para o tratamento da sepse abdominal. Ainda que o uso de antibióticos seja indispensável, isoladamente eles podem não se constituir na melhor opção terapêutica, especialmente em pacientes já imunocomprometidos [57]. Em combinação à sua utilização, terapias nutricionais, portanto, têm sido intensamente discutidas, e dentre os imunonutrientes utilizados, a GLUT vem sendo bastante estudada, em pacientes em que se deseja modificar ou implementar a resposta inflamatória e imune [94].

1 OBJETIVO

Determinar se a suplementação de L-glutamina à dieta altera a resposta inflamatória à sepse abdominal induzida em ratos.

2 MÉTODO

A experimentação foi realizada no Laboratório de Cirurgia Experimental da Faculdade de Ciências Médicas, com a colaboração de docentes do Departamento de Anatomia Humana do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes e das Disciplinas de Patologia Geral e de Anatomia Patológica, Laboratório de Lípidos (LabLip) da Faculdade de Ciências Médicas e do Laboratório de Imunofarmacologia da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz).

2.1 Aspectos éticos no cuidado com os animais

O projeto desta pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes da Universidade do Estado do Rio de Janeiro, sob o protocolo número CEUA/031/2011. Todos os procedimentos seguiram, rigorosamente, a regulamentação existente sobre experimentação com animais [58].

2.2 Animais e grupos

Foram utilizados 24 ratos *Wistar* machos adultos, com peso inicial entre 200 e 230 g, aleatoriamente distribuídos em três grupos, cada um com oito animais:

I – Controle – operação simulada; submetidos a manipulação cirúrgica de órgãos intra-abdominais, sem suplementação de L-glutamina (GLUT);

II – submetidos a laparotomia, com indução de sepse abdominal, sem suplementação de GLUT;

III – submetidos a laparotomia, com indução de sepse abdominal e suplementação dietética de GLUT por sete dias antes do procedimento cirúrgico.

Todos os animais foram provenientes do Biotério do Laboratório de Cirurgia Experimental da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade do Estado do Rio

de Janeiro e receberam ração adequada para ratos (Focus 1722 Roedores[®] – Agroceres) e água *ad libitum*, até obterem o peso ideal para o início do experimento.

Os animais foram alocados em gaiolas apropriadas, em ambiente climatizado, com foto-períodos diários (claro-escuro) de 12 horas.

2.3 Composição da ração comercial

A ração padrão (comercial) utilizada (Focus 1722 Roedores[®] – Agroceres[®]) continha: fósforo (mínimo) – 0,8%; proteína bruta (mínimo) – 22%; extrato etéreo (mínimo) – 4%; matéria fibrosa (máximo) – 8%; matéria mineral (máximo) – 9%; cálcio (máximo) – 1,4%; e umidade (máximo) – 13%.

A ração era enriquecida com vitamina A, vitamina E, vitamina K₃, vitamina B₁, vitamina B₂, vitamina B₆, vitamina B₁₂, niacina, ácido pantotênico, ácido fólico, biotina, colina, L-metionina, lisina, aditivo antioxidante, ferro, zinco, cobre, iodo, manganês, selênio e cobalto.

2.4 Suplementação dietética com L-glutamina

Os animais do grupo III receberam suplementação de GLUT (Glutamin[®] – Support), uma vez ao dia, durante os sete dias que antecederam a realização do procedimento cirúrgico, na dose de 1g/kg peso/dia. A dose diária foi preparada em solução aquosa, perfazendo volume final de 3 ml e administrada via orogástrica, em *bolus*, com a utilização de agulha metálica de gavagem para ratos (modelo IC810 – Insight Equipamentos Ltda.), sempre no mesmo horário.

Os animais dos grupos I e II receberam 3 ml de água filtrada, por via orogástrica, durante o período supracitado, que foi administrada de forma similar à descrita anteriormente, sempre no mesmo horário.

2.5 Procedimentos cirúrgicos

No 8.º dia de experimento, após jejum de 6 horas, os animais de todos os grupos foram submetidos a anestesia com cloridrato de ketamina 10% (Ketamina[®], Agener), na dose de 50 mg/kg, associado a cloridrato de xilazina 2% (Xilazina[®] – Agener), na dose de 5 mg/kg, por via intramuscular. Após, foi realizada a tricotomia da parede abdominal, seguida da antissepsia com polivinilpirrolidona-iodo com 1% de iodo ativo (Povidine Alcoólico[®] – VIC Pharma Ind. e Com. Ltda.) e o posicionamento de campos cirúrgicos estéreis.

O instrumental cirúrgico utilizado foi autoclavado em *kits*-padrão individuais, compostos por porta-agulhas de Hegar, cabo de bisturi número 3, pinça anatômica de dissecação, pinça anatômica dente de rato, tesoura de Metzembbaum, pinças hemostáticas curvas tipo Hartmann-Halstead e compressas cirúrgicas.

Os animais do grupo I foram submetidos a laparotomia mediana supra-umbilical com cerca de 3 cm de extensão, com lâmina de bisturi número 15. Foi realizada, então, manipulação das alças intestinais, seguida do fechamento da parede abdominal em dois planos (peritônio-aponeurótico e pele), com sutura contínua com fio de poliglecaprona 2-0 (Monocryl[®]).

Nos animais dos grupos II e III, foi realizada a indução de sepse abdominal, por meio de perfuração e ligadura cecal (CLP), de acordo com o método de Wichterman *et al*, 1980. Os ratos foram submetidos a laparotomia mediana de cerca de 3 cm de extensão, exteriorização do ceco, seguido por ligadura de sua base, logo abaixo da válvula ileocecal, com fio de catgut simples 2-0 (Brasuture[®]); em seguida, o ceco foi transfixado com agulha 19G, e, a seguir, foi exercida leve pressão digital para extravasamento de fezes na cavidade abdominal. O ceco foi, então, recolocado na cavidade abdominal, sendo realizado fechamento da parede em dois planos (peritônio-aponeurótico e pele), com sutura contínua com fio de polipropileno 2-0 (Propilene[®] – Cirumedica). (Fig. 1)

2.6 Controle pós-operatório

Os animais permaneceram anestesiados, sob monitoramento, durante as quatro horas do experimento.

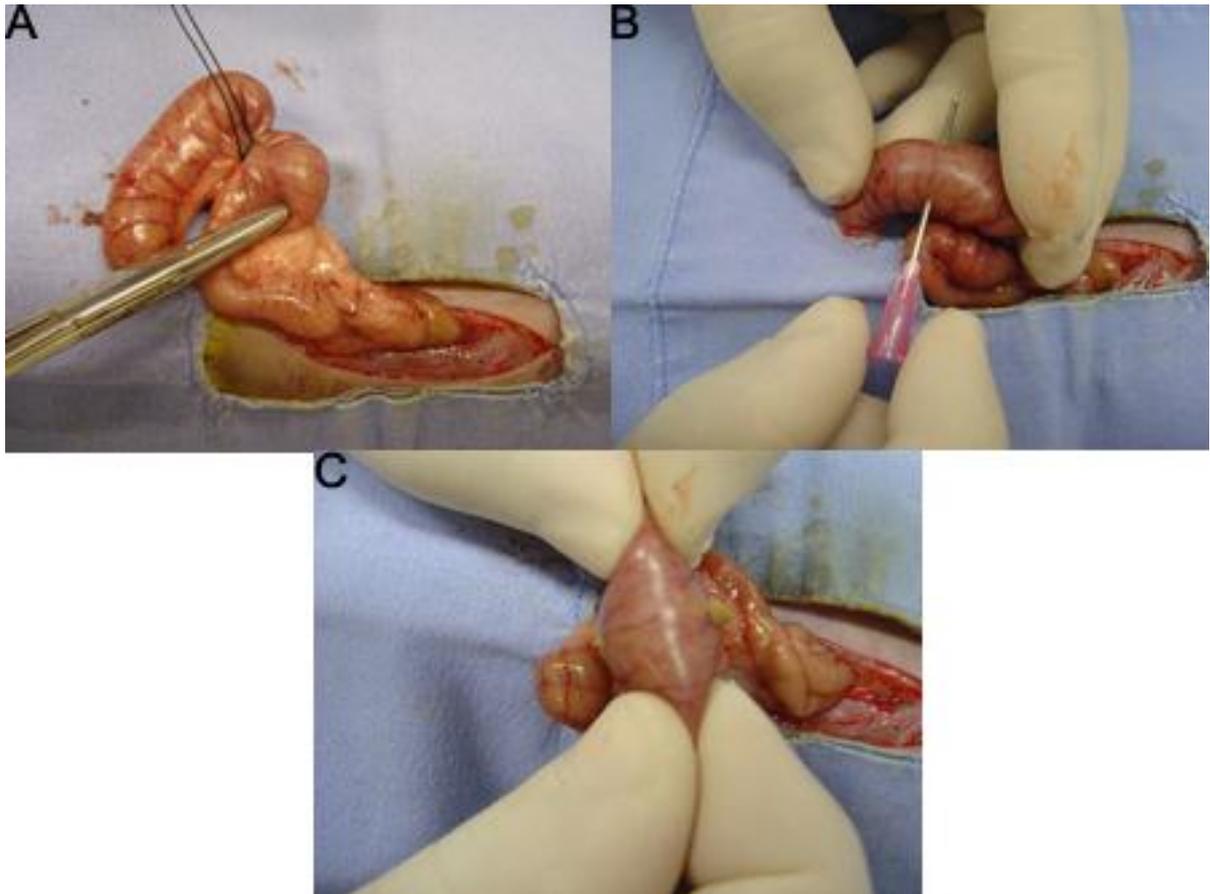


Figura 1 – Indução de sepse abdominal em ratos pelo método CLP: A – ligadura do ceco; B – perfuração nas faces cranial e caudal do ceco com agulha 19G; C – compressão digital do ceco para extravasamento de seu conteúdo.

2.7 Análises laboratoriais

2.7.1 Dosagens séricas

Imediatamente antes do procedimento cirúrgico (T0) e após duas (T1) e quatro horas (T2), foram coletadas amostras de sangue dos animais de todos os grupos para dosagem sérica de citocinas pró-inflamatórias (INF- γ e IL-6) e antiinflamatórias (IL-10), bem como análise da contagem leucocitária e da glicemia.

Sob anestesia, imediatamente antes de serem submetidos a laparotomia para a manipulação das alças intestinais (grupo I) e indução de sepse (grupos II e III), os animais foram submetidos a canulação da artéria carótida esquerda.

Realizou-se a inserção de tubo de polietileno (diâmetro interno 0,58 mm e diâmetro externo 0,96 mm Intramedic[®]) na artéria carótida, que foi fixado com fio de algodão 3-0 (Linatrix 3.0[®] – Laboratórios Bruneau S.A.) e posicionado na pele, no dorso do animal, por onde foi conectada seringa para retirada de sangue nos momentos estabelecidos.

As amostras colhidas em tubo com EDTA-K foram encaminhadas ao Laboratório de Lípidos (LabLip) da Faculdade de Ciências Médicas – Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ), onde foi realizada a contagem leucocitária, no Contador Hematológico Automatizado KX-21N Sysmex, utilizando-se o *kit* Cellpack[®] (Sysmex) e Stromatolyzer WH[®] (Sysmex), e, como controle, Eightcheck-3WP X-TRA.

A glicemia foi aferida com a utilização do aparelho medidor de glicose Breeze™ 2 (Bayer), com a utilização de uma gota de sangue em fita reagente.

2.7.2 Análise de citocinas plasmáticas

Foi reservado 1 ml de sangue, acondicionado em *ependorf*, armazenados a -70° C, para dosagem de citocinas (INF- γ , IL-6 e IL-10) pelo método Luminex (Luminex[®] xMap[®] technology – Millipore). O método fundamenta-se nos princípios da citometria de fluxo, utilizando microesferas de poliestireno com códigos de cor internos produzidos pela combinação de corantes fluorescentes. Mediante concentrações precisas destes corantes, um conjunto de *beads* pode ser criado e revestido por um anticorpo específico.

Após a colocação dos padrões para a confecção da curva na placa de Elisa específica para este método, foram acrescentados nos demais poços as amostras e as *beads* marcadas com citocinas a serem avaliadas; posteriormente aos períodos de incubação exigidos pelo método, foram acrescentados o anticorpo de detecção e a *streptavidin-PE*, substrato que completa a reação na superfície da microesfera.

Após o período de reação, as microesferas passam rapidamente por um primeiro feixe de laser, que excita os corantes internos e marca as micicroesferas, e posteriormente por um segundo feixe de laser, que excita a *streptavidin-PE*, o que identificará a proteína analisada. Finalmente, um processador de sinal digital de alta velocidade identifica cada microesfera individualmente e quantifica o resultado do

ensaio, com base em sinais fluorescentes. Esses sinais são interpolados à curva, pelo próprio equipamento, convertendo-os em concentrações de ng/ml.

2.7.3 Análise microbiológica

Imediatamente após a última coleta sanguínea, todos os animais foram mortos por sobredose anestésica e submetidos novamente a laparotomia para retirada de líquido peritoneal, de acordo com as normas de coleta no controle microbiológico da Sociedade Brasileira de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial (2009), para estudo microbiológico.

Foi coletado 1,0 ml de líquido peritoneal, de forma asséptica, e colocado em tubos *Eppendorf* estéreis, transportadas em caixas isotérmicas até o Laboratório de Bacteriologia do Departamento de Microbiologia da Universidade do Estado do Rio de Janeiro, onde foram imediatamente resfriadas a temperatura de 4° C, sendo analisadas em intervalo de uma hora.

Para análise física, a integridade do material, forma da coleta e as normas implícitas no controle microbiológico foram cumpridas rigorosamente.

Alíquotas de 20 µL das amostras foram transferidas para tubos contendo caldo infusão cérebro-coração (BHI), preparado segundo fabricante, incubado a uma temperatura de 36° C, durante 24 horas. Dos tubos onde ocorreu crescimento bacteriano, foram retiradas alíquotas de 0,01 ml, com a utilização de alça bacteriológica calibrada, e transferidas para novo tubo contendo caldo BHI, sendo incubadas sob as mesmas condições. As amostras crescidas foram semeadas por esgotamento em placas contendo o meio Agar-sangue e incubadas por 24 horas a 36° C. A partir do crescimento bacteriano evidenciado nas placas, as colônias foram identificadas quanto ao seu padrão fenotípico de hemolisinas, ou não, sendo submetidas à coloração de Gram para diferenciá-las quanto às suas características morfotintoriais.

Para as amostras Gram-positivas, foram aplicados os testes da catalase e coagulase. As amostras Gram-negativas foram submetidas a triagem bioquímica, empregando-se os meios duplo açúcar-uréia (D.A.U.), segundo *Suassuna & Suassuna 1978*, prova de fermentação-oxidação (OF), segundo *Hug & Leifson 1953*,

fermentação de carboidratos e correlatos, e provas da descarboxilação do citrato e do aminoácido arginina [59,60].

2.8 Análise estatística

Todos os dados foram expressos na forma de média \pm desvio padrão.

A comparação das variáveis entre os grupos de animais foi realizada por análise de variância (ANOVA) – teste paramétrico – e pelo pós-teste de Tukey (usado para comparação dos grupos, dois a dois).

A comparação das variáveis entre os diferentes tempos (T0, T1 e T2) nos animais foi realizada pelo teste t de *Student* pareado.

A análise estatística foi realizada com a utilização do programa *GraphPad Prism 5*[®]. Em todas as análises, um valor de $p \leq 0,05$ foi estabelecido para a rejeição da hipótese nula de similaridade entre os grupos.

2.9 Financiamento

Os recursos financeiros para o desenvolvimento desta pesquisa foram fornecidos pela Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro – FAPERJ.

3 RESULTADOS

3.1 Evolução dos animais

Os animais apresentaram boa evolução, não apresentando complicações no período pós-operatório.

3.2 Análises sanguíneas

3.2.1 Leucometria

Ao serem comparados os números de leucócitos dos animais de todos os grupos (I, II e III), em cada um dos tempos do experimento (0, 1 e 2), não se observou diferença. (Tabela 1)

Tabela 1 – Análise descritiva do leucograma (células/mm³) nos diversos grupos de animais, nos tempos 0, 1 e 2 (n=8, em todos os grupos).

Grupos / tempos		Média	DP
I	0	9,78	1,30
	1	9,92	1,67
	2	8,79	3,70
II	0	8,50	2,41
	1	8,77	1,38
	2	9,36	1,85
III	0	8,90	2,41
	1	6,15	1,54
	2	8,19	2,31

T0 – imediatamente antes do procedimento cirúrgico; T1 – duas horas após o procedimento cirúrgico. T2 – quatro horas após o procedimento cirúrgico; DP – desvio padrão.

3.2.2 Glicemia

Os dados referentes à glicemia podem ser observados na tabela 2.

Ao serem comparadas as glicemias dos animais de todos os grupos, não se observou diferença em nenhum dos tempos do experimento ($p > 0,05$ para todos).

Quando os grupos de animais foram analisados isoladamente, comparando-os do início ao final do experimento (T0, T1 e T2), observou-se aumento significativo da glicemia nos animais de todos os grupos ($p < 0,05$).

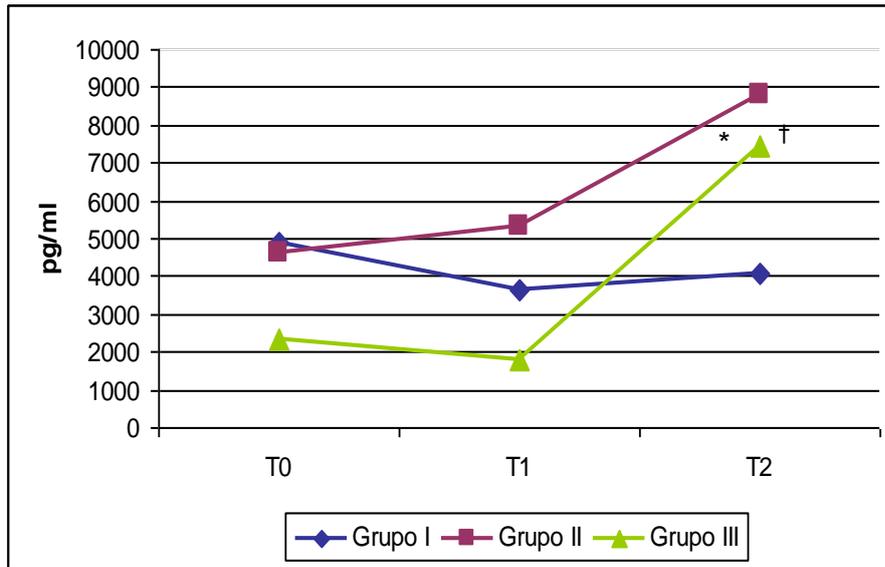
Tabela 2 – Análise descritiva da glicemia (mg/dL) nos diversos grupos de animais, nos tempos 0, 1 e 2 (n=8, em todos os grupos).

Grupos / tempos		Média	DP
I	0	267,50	50,78
	1	405,25	102,4
	2	564,62	49,73
II	0	241,25	75,35
	1	498,37	69,07
	2	599,87	0,35
III	0	285,62	45,11
	1	406,87	69,09
	2	560,87	65,15

T0 – imediatamente antes do procedimento cirúrgico; T1 – duas horas após o procedimento cirúrgico. T2 – quatro horas após o procedimento cirúrgico; DP – desvio padrão.

2.3 Análise de citocinas plasmáticas

Ao serem comparadas as citocinas (IFN- γ , IL-6 e IL-10) dos animais em cada um dos grupos (I, II e III), isoladamente, nos três tempos do experimento (0, 1 e 2), observou-se aumento significativo de IL-10 entre 0 e 4 horas (tempo 0 vs. tempo 2) e entre 2 e 4 horas (tempo 1 vs. tempo 2) nos animais do grupo III ($p=0,0331$ e $p=0,0155$, respectivamente), que receberam suplementação prévia de GLUT. (Fig. 2) Não se observou qualquer outra diferença ao serem analisadas as demais citocinas (IFN- γ e IL-6) em todos os grupos. (Figs. 3 e 4)



* p=0,0331 (T0 vs. T2) e †p=0,0155 (T1 vs, T2)

Figura 2 – Evolução de IL-10 (pg/ml) nos três momentos do experimento, em cada grupo de animais.

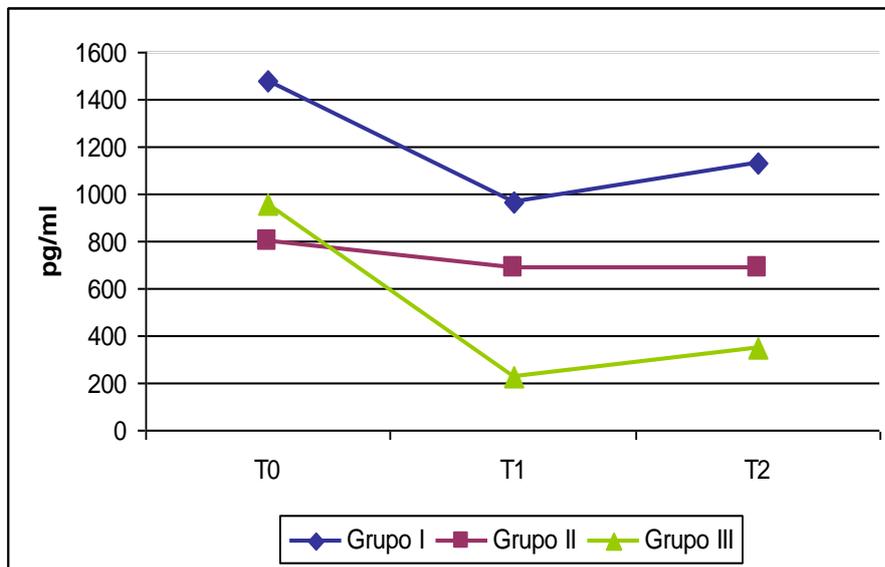


Figura 3 – Evolução de IFN-γ (pg/ml) nos três momentos do experimento, em cada grupo de animais.

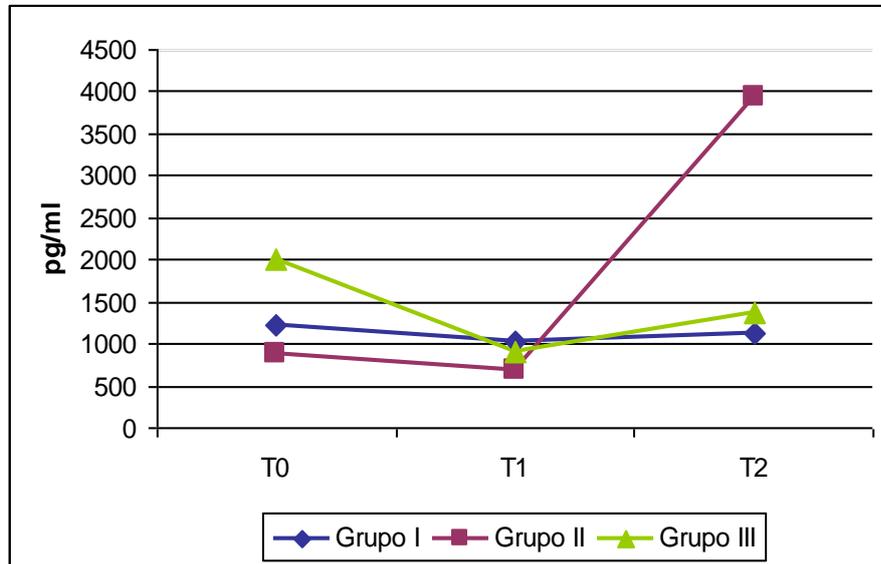


Figura 4 – Evolução de IL-6 (pg/ml) nos três momentos do experimento, em cada grupo de animais.

3.3 Análise microbiológica do líquido peritoneal

Na tabela 3, observa-se o resultado das análises microbiológicas do líquido peritoneal dos animais dos grupos II e III (ambos submetidos à indução de sepse abdominal). Todos os ratos apresentaram resultado positivo em meio específico para *Proteus mirabilis* e/ou *Enterococcus* e/ou *Pseudomonas* e/ou *Escherichia coli* e/ou *Klebsiella*. (Tab. 3)

Tabela 3 – Identificação dos microorganismos no líquido peritoneal dos animais dos grupos II e III (submetidos à indução de sepse).

Grupo / Animal	GRAM	Identificação do microorganismo
Grupo II		
1	-	<i>E. coli</i>
2	-	<i>Proteus</i>
3	-	<i>Proteus</i>
4	-	<i>Pseudomonas</i>
5	+	<i>Enterococcus</i>
6	-	<i>Pseudomonas</i>
7	-	<i>E. coli</i>
8	-	<i>Klebsiella</i>
Grupo III		
1	-	<i>E. coli</i>
2	-	<i>E. coli</i>
3	+	<i>Enterococcus</i>
4	-	<i>E. coli</i>
5	-	<i>Proteus</i>
6	-	<i>E. coli</i>
7	-	<i>E. coli</i>
8	-	<i>Pseudomonas</i>

4 DISCUSSÃO

A sepse é uma síndrome clínica de resposta inflamatória sistêmica secundária a um processo infeccioso que se caracteriza pela excessiva produção de mediadores inflamatórios e ativação de células inflamatórias, levando a um descontrole metabólico que, muitas vezes, o próprio organismo não consegue controlar. Esse processo inflamatório, se não controlado, pode evoluir para um quadro de choque séptico e síndrome da disfunção de múltiplos órgãos [16,61].

De acordo com Jafari & McCracken (1992), suspeita-se de sepse quando estão presentes ao menos dois dos seguintes critérios: hipotermia (temperatura < 36° C) ou hipertermia (temperatura > 38° C), taquipnéia (≥ 20 movimentos respiratórios por minuto) e taquicardia (≥ 90 batimentos cardíacos por minuto). Neste estudo, o diagnóstico de sepse foi confirmado pela presença de critérios clínicos associados à cultura microbiológica de líquido peritoneal positiva para microrganismos [62].

Identificou-se a presença de bactérias no líquido peritoneal dos animais, como *Pseudomonas* e/ou *Escherichia coli* e/ou *Proteus mirabilis* e/ou *Enterococcus* SP e/ou *Klebsiella*. Essas bactérias são naturais da microbiota intestinal e reproduzem a bacteremia da sepse humana. Conforme definido em estudo prévio, a infecção bacteriana iniciada em região peritoneal por rompimento de vísceras libera patógenos intestinais em cavidade peritoneal, podendo evoluir para infecções severas e ou septicemia [18]. Estudos já demonstraram que bactérias isoladas de pacientes com infecções sistêmicas são normalmente as mesmas bactérias predominantemente presentes na flora intestinal [37,63].

Apesar de todos os avanços no diagnóstico e tratamento da sepse abdominal, o índice de mortalidade continua elevado. Como a diversidade das doenças, microrganismos causadores e outras variáveis nos pacientes sépticos dificultam a realização de estudos clínicos controlados, pesquisas com modelos experimentais em animais que mimetizam situações clínicas têm sido cada vez mais utilizadas [19].

Os modelos experimentais utilizados para o estudo da sepse contribuem para melhor entendimento da evolução da doença, na tentativa de se compreender os mecanismos pelos quais os mediadores inflamatórios envolvidos no processo desempenham seus papéis e para que, no futuro, ocorra redução da alta mortalidade decorrente dessa importante entidade clínica [64].

A administração endovenosa de LPS ou de bactérias produz alterações hemodinâmicas e cardiovasculares, e a liberação de grandes quantidades de citocinas na circulação, mimetizando situações mais próximas da sepse humana. Entretanto, em humanos não é usual a incidência de sepse e choque séptico devido à entrada de grande quantidade de LPS ou de bactérias na circulação, questionando-se, assim, se este modelo realmente se assemelharia à evolução da sepse clínica [19,21].

A inoculação intraperitoneal da bactéria viva ou de compostos microbianos constitui um modelo que apresenta boa reprodutibilidade da sepse humana, porém, ainda assim, o início do processo ocorre de forma muito rápida, e não gradativa, como habitualmente ocorre em humanos [19,65].

A colocação de um *stent* no cólon ascendente (CASP) assemelha-se mais ao curso clínico da peritonite, com a precoce instalação da infecção sistêmica e inflamatória, contrapondo-se à CLP (*Cecal ligation and puncture*), que revela um modelo de formação de abscesso intra-abdominal, com sinais de inflamação sistêmica menos intensos, porém mais sustentados [22].

Neste estudo, utilizou-se um modelo experimental de CLP para a indução da peritonite, pelo fato de que contaminação abdominal ocorre com as bactérias da luz intestinal do próprio animal, assemelhando-se com a ocorrência de uma peritonite secundária em humanos. Assim, a CLP tem sido amplamente empregada na indução da peritonite, fundamentando a escolha do método utilizado [23].

O epitélio intacto do intestino, associado a uma flora adequada, representa uma barreira à invasão de microorganismos patogênicos, de antígenos e de outros componentes nocivos que possam estar presentes no lúmen intestinal [66]. Em indivíduos saudáveis, essa barreira é estável, exercendo sua função normal e assegurando resistência imunológica ao hospedeiro [67]. A composição da flora intestinal sofre influência de inúmeros fatores, como p.ex. as condições fisiológicas do hospedeiro (idade e estresse), a composição da dieta, circunstâncias ambientais (contaminação por patógenos, uso de medicamentos) e processos digestórios (pH, tempo de trânsito intestinal, disponibilidade de substratos) [68, 69]. As alterações dessa flora podem resultar em disbiose, caracterizada pelo declínio de bactérias benéficas e pelo aumento de bactérias potencialmente patogênicas [70].

Primariamente, a barreira intestinal possui o mecanismo mecânico imposto pelas células e junções intercelulares; posteriormente, encontra-se o mecanismo

imunológico, produzido pelas proteínas e componentes de membrana, que favorecem a produção de citocinas e de outras substâncias advindas da flora microbiana [9,71].

Modificações na estrutura da parede intestinal, como atrofia da mucosa ou das vilosidades, e perda da integridade e continuidade celular favorecem a má absorção de nutrientes, comprometem a resposta imunológica intestinal e aumentam a permeabilidade intestinal, favorecendo a ocorrência da translocação bacteriana [6,9].

Na sepse, estando a motilidade intestinal prejudicada pelas condições gerais do paciente, ocorrerá um decréscimo do peristaltismo, levando ao supercrescimento bacteriano no intestino delgado e à translocação bacteriana [72-74]. Essa disfunção intestinal modula a intensidade da resposta inflamatória, favorecendo a translocação bacteriana e podendo também servir como fonte adicional de citocinas pró- e antiinflamatórias produzidas em função dos produtos bacterianos absorvidos [73,75,76].

A resposta do organismo a um processo infeccioso é iniciada com a ação de neutrófilos, como primeira linha de defesa das células sanguíneas, que realizam a fagocitose dos antígenos [77,78]. Em seguida, ocorre a ativação e proliferação de linfócitos T, que estimulam a atividade dos macrófagos e linfócitos B, que levam à produção de imunoglobulinas [79].

Essas propriedades fagocitárias e bactericidas são essenciais para a defesa normal do hospedeiro, mas quando a ativação dos macrófagos torna-se descontrolada, estas células contribuem para o desenvolvimento de reação inflamatória generalizada [61]. Logo após, então, as imunoglobulinas e as células imunocompetentes iniciam uma resposta imune específica. Inicialmente, é desencadeada uma cascata inflamatória, com a liberação de inúmeros fatores que estimulam intensa resposta celular, com liberação de mediadores secundários, quimiotaxia e ativação de granulócitos. Os mediadores secundários são responsáveis pela reativação das células fagocitárias e da cascata inflamatória, formando um ciclo vicioso inflamatório [80]. Esses mediadores parecem tanto contrabalançar as ações dos mediadores pró-inflamatórios, pela redução da síntese e da liberação desses mediadores, quanto antagonizar seus efeitos [81].

Apesar de grandes avanços terem ocorrido para a compreensão dos mediadores endógenos e seus papéis na resposta inflamatória à sepse, ainda falta muito para que sejam entendidos os seus complexos mecanismos fisiopatológicos.

Diversos estudos verificaram que alguns mediadores pró-inflamatórios, como TNF- α , IL-1, IL-6 e IL-8 apresentam papéis fundamentais na sepse e que os mediadores antiinflamatórios também estão presentes, concomitantemente, modulando os efeitos e a liberação dos mediadores inflamatórios [82,83]. Paralelamente à liberação das citocinas pró-inflamatórias, o organismo responde a agentes infecciosos, liberando citocinas antiinflamatórias, como IL-4, IL-10 e IL-13 [84].

Fundamentado em estudos anteriores, pode-se sugerir que a exacerbação da liberação de citocinas pró- ou antiinflamatórias está fortemente relacionada com a severidade e mortalidade na sepse, sendo primordial o equilíbrio desses mediadores para a sua resolução [16,18,85]. Contudo, a produção e liberação excessiva de mediadores antiinflamatórios pode se tornar prejudicial à resposta do organismo contra o agente invasor, pois inibe a liberação dos mediadores fundamentais para o recrutamento e ativação das células das respostas inflamatória e imune [86]. Inversamente, a deficiência de produção das citocinas antiinflamatórias é capaz de alterar a cinética de produção das citocinas pró-inflamatórias no modelo CLP [87], como a IL-6 [88], e INF- γ [89]. Assim, a relação entre esses mediadores é fundamental para a instalação do processo inflamatório, mas o fator determinante para a evolução ou resolução do processo ainda não está claro na atualidade.

Avaliando-se os animais de cada grupo, observou-se aumento significativo da glicemia nos três tempos analisados, embora não tenha ocorrido diferença entre os três grupos. Esta hiperglicemia transitória, possivelmente como resultado do estresse cirúrgico, é provavelmente devida, ao menos em parte, à resistência à insulina decorrente do aumento de hormônios contra-regulatórios, como epinefrina, norepinefrina, glucagon, hormônio do crescimento e cortisol. O efeito do metabolismo destes hormônios resulta no aumento da resistência à insulina, causando aumento da produção hepática de glicose e diminuição de sua utilização periférica [90,91]. A resistência à insulina nos tecidos periféricos reduz a utilização da glicose, aumentando, assim, seus níveis séricos [92]. Corroborando os resultados encontrados, Jacob *et al* (2008) também observaram aumento transitório da glicemia em ratos *Sprague-Dawley*, duas horas após indução de sepse pelo método CLP [93].

A suplementação dietética com nutrientes específicos, como a GLUT, muitas vezes denominada imunonutrição, por seu potencial de modulação da atividade do sistema imune [94], parece encontrar justificativa em pacientes em que se deseja

modificar ou implementar a resposta inflamatória. Entretanto, a imunonutrição tem sido mais frequentemente utilizada em períodos pré e/ou pós-operatórios, com o objetivo de diminuir o risco de complicações infecciosas em pacientes cirúrgicos [95].

GLUT é utilizada em altas taxas por células isoladas do sistema imune, tendo importante papel na proliferação de linfócitos, na produção de citocinas e na atividade fagocitária de macrófagos e neutrófilos [79]. O exato mecanismo pelo qual a GLUT parece atuar na melhoria do funcionamento intestinal permanece obscuro, mas provavelmente se dá pelo aumento do aporte energético necessário para a divisão e replicação celulares [96].

Por diferença de concentração arteriovenosa, Elwyn *et al* (1968) demonstraram que uma quantidade significativa de GLUT é absorvida pelas vísceras drenadas pelo sistema porta [97], sendo a mucosa do intestino delgado a principal responsável por essa absorção [28]. O intestino delgado do rato absorve cerca de 25% de GLUT circulante. Ela é captada pelas células epiteliais do intestino a uma velocidade semelhante à da captação da glicose, sendo mesmo mais importante do que esta como fonte energética para enterócitos e colonócitos [28,98]. Efeitos positivos para reverter e/ou prevenir o aumento da permeabilidade intestinal têm sido demonstrados com administração de GLUT antes [99] ou imediatamente após a lesão [100], diminuindo, assim, o risco de complicações infecciosas em pacientes cirúrgicos.

Durante a fase crítica da sepse, com a integridade da barreira mucosa intestinal comprometida, a translocação bacteriana associa-se à má utilização de GLUT pelo trato gastrointestinal, prejudicando ainda mais a permeabilidade da mucosa e perpetuando a translocação, agravando, ainda mais, o estado catabólico [101].

A resposta do intestino à sepse é caracterizada por redução da utilização de GLUT, possivelmente pela diminuição da atividade da glutaminase [101, 102]. A atividade da glutaminase no intestino é preservada quando realizada suplementação com GLUT à dieta por quatro dias antes da endotoxemia induzida em ratos. Foi constatado que o efeito dessa suplementação proporcionou um aumento de 25% na atividade da glutaminase na mucosa intestinal, mesmo durante a sepse [103]. Chen *et al* estabeleceram três parâmetros principais que determinam o metabolismo da GLUT no intestino: a quantidade de substrato, a habilidade para transportá-lo e a atividade da glutaminase. Em ratos com endotoxemia, a suplementação com GLUT

aumentou efetivamente a concentração de GLUT no sangue, induzindo a atividade da glutaminase, mantendo o metabolismo da mucosa intestinal [104].

Resultados de estudos anteriores que avaliaram os efeitos da GLUT na permeabilidade intestinal apresentam grande variabilidade e dependem, primariamente, da duração de administração e da dose utilizada [56,105]. Usualmente, dietas orais, enterais e parenterais contêm pouca quantidade de GLUT, mas, em períodos de estresse, pode haver demanda aumentada para a manutenção da homeostase, ratificando a real necessidade de sua suplementação [55]. Optou-se pela suplementação de GLUT com uma dose que já vem sendo utilizada em outros trabalhos desta linha de pesquisa em desenvolvimento no Laboratório de Cirurgia Experimental da Faculdade de Ciências Médicas da UERJ – 1 g/kg/dia.

Investigou-se o perfil pró- e antiinflamatório dos grupos de animais em estudo, verificando a concentração plasmática das citocinas IFN- γ , IL-6 e IL-10 em três momentos diferentes, sendo dois deles na presença de sepse abdominal, já que elas possuem atuação em diversas células, por meio de seus receptores de superfície, induzindo a produção e liberação de mediadores inflamatórios [18,61].

O objetivo deste estudo foi verificar se a suplementação dietética com GLUT seria capaz de minimizar a resposta inflamatória na sepse. Verificou-se que, com a imunonutrição, ocorreu modificação da resposta inflamatória do grupo de animais tratados, com o aumento da concentração plasmática de IL-10. Poder-se-ia especular que o tempo de utilização da GLUT não foi suficiente para a observação de modificações nas concentrações das outras citocinas avaliadas ou ainda que o período de acompanhamento dos animais não foi suficiente para tal observação.

Alguns autores que utilizaram a suplementação dietética com GLUT comprovaram o decréscimo na produção de citocinas pró-inflamatórias em pacientes cirúrgicos e com neoplasias malignas [106,107], e a supressão da lesão na mucosa intestinal causada pela endotoxemia em ratos [108]. Ding constatou que a GLUT pode reduzir a secreção de interleucinas, o que seria benéfico para a redução dos danos relativos à permeabilidade intestinal [109].

Corroborando alguns de nossos resultados, Yeh *et al* (2004) demonstraram que a suplementação de GLUT por 10 dias na dieta de ratos submetidos a CLP, aumenta a atividade fagocitária, preserva as células CD4⁺ e mantém a população de linfócitos T no sangue, mas não interferiu na produção de citocinas, levando à conclusão de que esse aminoácido aumenta a resposta imune no local da lesão,

mas que o seu efeito na resposta imune sistêmica não é suficiente para aumentar a sobrevivência [110]. Kew *et al* (1999) constataram que a suplementação de diferentes concentrações de GLUT em camundongos elevou a capacidade de resposta dos linfócitos T à estimulação mitogênica, promovendo a resposta imune mediada por células, aumentando a produção de IL-2, embora não tenha exercido influência na produção de IL-4, IL-10 e INF- γ [109,111].

Outro experimento demonstrou que ratos suplementados com GLUT por dez dias antes de procedimento cirúrgico, após indução de sepse por CLP, apresentaram aumento significativo de IL-2, IL-4, IL-10 e TNF- α , quando comparados ao grupo sem suplementação com aminoácidos [112]. Esses achados mostram que a suplementação dietética com GLUT auxilia na manutenção da população de linfócitos T no baço, mantendo assim a atividade fagocitária dos macrófagos peritoneais [113].

O INF- γ , produzido notadamente por células T a partir do desencadeamento do processo inflamatório, é conhecido como citocina regulatória e pró-inflamatória. Essa citocina estimula e regula a secreção de outras citocinas, sinalizando para o recrutamento e ativação de neutrófilos, monócitos e linfócitos [114]. Não se observou variação significativa de INF- γ nos grupos de estudo, o que pode se dever à possibilidade de que a GLUT não exerce ou exerce pouca influência na regulação da produção desta citocina pró-inflamatória. Ratificando nossos achados, Van den Berg (2009) já havia mostrado que a suplementação com GLUT em humanos com sepse não determina alteração significativa na resposta dessa citocina, supondo que a redução da infecção se deva à influência direta na mucosa intestinal e não na resposta imune sistêmica [115].

A IL-6, derivada principalmente dos macrófagos e monócitos, promove o crescimento e diferenciação dos macrófagos e monócitos e a sua síntese pode ser induzida pela TNF- α e INF- γ [116]. A liberação de IL-6 é dependente da produção de TNF- α , haja vista que a neutralização desta citocina com anticorpos específicos diminui os níveis plasmáticos de IL-6 [62,117]. Essa citocina participa, principalmente, da indução da febre e da produção, pelo fígado, de proteínas de fase aguda, sugerindo que ela funciona como peça-chave na regulação da resposta inflamatória, especialmente em sua fase aguda [118]. Apesar de não estar clara a relevância de seus efeitos na sepse, a IL-6 é a citocina que apresenta melhor correlação com a mortalidade, tanto em modelos experimentais quanto em

pacientes, isto é, quanto maiores os níveis plasmáticos de IL-6, maior a probabilidade de evolução para morte [119]. Este fato foi constatado em outros estudos, onde pacientes com sepse e gravemente comprometidos apresentaram rápido aumento de IL-6 na circulação sanguínea, o que contribuiu para a evolução para falência múltipla de órgãos [120].

Como citocina antiinflamatória, utilizamos como marcador a IL-10, que tem sido identificada como importante modulador da resposta inflamatória, sendo rapidamente expressa durante as fases iniciais da sepse [121,122].

A diminuição da concentração de IL-10 aumenta o risco de mortalidade após CLP [123]; em contraposição, camundongos tratados com IL-10 recombinante humana apresentam retardo no início da mortalidade e melhora na sobrevida [123]. Ao que parece, a deficiência de IL-10 possui maior impacto no início da sepse, sugerindo que ela poderia evitar a progressão do processo inflamatório para o choque séptico irreversível no modelo CLP [87, 121-123]. Ela funcionaria, então, como “regulador temporal” da transição da sepse precoce reversível para a fase tardia irreversível do choque séptico [123].

Verificou-se aumento significativo de IL-10 nos animais que receberam suplementação com GLUT, podendo-se eventualmente supor que, se observados por um período mais longo após os procedimentos cirúrgicos, esses animais poderiam ter maior sobrevida.

Para se chegar à relação inequívoca do efeito da imunonutrição com L-glutamina na sepse abdominal, muito ainda deve ser pesquisado. A continuação desta linha de pesquisa se faz necessária, no intuito de confirmar e complementar os dados apresentados, com avaliação em períodos mais tardios após a indução da sepse, e empregando diferentes dosagens e períodos de suplementação dietética.

5 CONCLUSÃO

A suplementação dietética com L-glutamina em animais submetidos à indução de sepse abdominal com modelo CLP propiciou aumento na concentração plasmática de IL-10, sugerindo potencialização da resposta antiinflamatória, enquanto as concentrações de INF- γ e IL-6 não apresentaram variação significativa.

REFERÊNCIAS

1. Ono S, Ueno C, Seki S, Matsumoto A, Mochizuki H. Interleukin-12 and 18 induce severe liver injury in mice recovered from peritonitis after sublethal endotoxin challenge. *Surgery* 2003; 134: 92-100.
2. Singer M. Cellular dysfunction in sepsis. *Clin Chest Med* 2008; 29: 655-60.
3. Ding LA, Li SJ. Gut in diseases: physiological elements and their clinical significance. *World J Gastroenterol* 2003; 9: 2385-9.
4. Guarner F, Malagelada JR. Gut flora in health and disease. *Lancet* 2003; 361: 512-9.
5. O' Boyle CJ, MacFie J, Mitchell CJ, Johnstone D, Sagar PM, Sedman PC. Microbiology of bacterial translocation in humans. *Gut* 1998; 42: 29-35.
6. Swank GM, Deitch EA. Role of the gut in multiple organ failure: bacterial translocation and permeability changes. *World J Surg* 1996; 20: 411-7.
7. Rombeau JL, Takala J. Summary of round table conference: gut dysfunction in critical illness. *Intensive Care Med* 1997; 23: 476-9.
8. Lichtman SM. Bacterial translocation in humans. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2001; 33: 1-10.
9. Foitzik T, Kruschewski M, Kroesen AJ, Hotz HG, Eibl G, Buhr HJ. Does glutamine reduce bacterial translocation? *Int J Colorectal Dis* 1999; 14: 143-9.
10. Manley OT. The transplantation of splenic tissue into the subcutaneous fascia of the abdomen in rabbits. *J Exp Med* 1917; 25: 619-27
11. Faria HCC Neto. Citocinas e Resposta Inflamatória Sistêmica em Cirurgia. In: Marques RG (ed.). *Técnica Operatória e Cirurgia Experimental*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan 2005; p. 36-9.
12. Lanier LL. The origin and functions of natural killer cells. *Clin Immunol* 1999; 95(1 Pt 2): S14-8.
13. Yeh SL, Yeh CL, Lin MT, Lo PN, Chen WJ. Effects of glutamine-supplemented total parenteral nutrition on cytokine production and T cell population in septic rats. *JPEN J Parenter Ent Nutr* 2001; 25: 269-74.
14. van der Poll T, Sauerwein HP. Tumor necrosis factor alpha: its role in the metabolic response to sepsis. *Clin Sci* 1993; 84: 247-56.
15. Fleisher TA, Bleesing JJ. Immune function. *Pediatr Clin North Am* 2000; 47: 1197-209.
16. Li J, Carr B, Goyal M, Gaieski DF. Sepsis: the inflammatory foundation of pathophysiology and therapy. *Hosp Pract (Minneap)* 2011; 39: 99-112.

17. Grunig G, Corry DB, Leach MW, Seymour BW, Kurup VP, Rennick DM. Interleukin-10 is a natural suppressor of cytokine production and inflammation in murine model of allergic bronchopulmonary aspergillosis. *J Exp Med* 1997; 185: 1089-99.
18. Badiu DC, Paunescu V, Aungurenci A, Pasarica D. Proinflammatory cytokines in peritonitis. *J Med Life* 2011; 4: 158-62.
19. Wichterman KA, Baue AE, Chaudry IH. Sepsis and septic shock – a review of laboratory models and a proposal. *J Surg Res* 1980; 29: 189-201.
20. Rittirsch D, Hoesel LM, Ward PA. The disconnect between animal models of sepsis and human sepsis. *J Leukoc Biol* 2007; 81: 137-43.
21. Bem-shaul V, Sofer Y, Bergman M, Zurovsky Y, Grossman S. Lipopolysaccharide-induced oxidative stress in the liver: comparison between rat and rabbit. *Shock* 1999; 12: 288-93.
22. Maier S, Traeger T, Entleutner M, Westerholt A, Kleist B, Hüser N, *et al.* Cecal ligation and puncture versus colon ascendens stent peritonitis: two distinct animal models for polymicrobial sepsis. *Shock* 2004; 21: 505-11.
23. Lopes WM, Aguilar-Nascimento JE, Nascimento DD, Silva MH, Silva VA. Associação de glutamina e probióticos no trofismo mucoso do cólon na peritonite experimental. *Rev Col Bras Cir* 2007; 34: 48-53.
24. Ardawi MSM, Newsholme EA. Glutamine metabolism in lymphocytes of the rat. *Biochem J* 1982; 208: 743-51.
25. Souba WW, Smith RJ, Wilmore DW. Glutamine metabolism by the intestinal tract. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 1985; 9: 608-17.
26. Yaqoob P, Calder PC. Glutamine requirement of proliferating T lymphocytes. *Nutrition* 1997; 13: 646-51.
27. Kew S, Wells SM, Yaqoob P, Wallace FA, Miles EA, Calder PC. Dietary glutamine enhances murine T-lymphocyte responsiveness. *J Nutr* 1999; 129: 1524-31.
28. Lopes-Paulo F. Efeitos da glutamina sobre a parede intestinal e sua aplicabilidade potencial em coloproctologia. *Rev Bras Coloproct* 2005; 25: 75-8.
29. Souba WW. Interorgan ammonia metabolism in health and disease: a surgeon's view. *JPEN J Parenter Enter Nutr* 1987; 11: 569-79.
30. Smith RJ. Glutamine metabolism and its physiologic importance. *JPEN J Parenter Enter Nutr* 1990; 14: 40S-44S
31. Lacey JM, Wilmore DW. Is glutamine a conditionally essential amino acid? *Nutr Rev* 1990; 48: 297-309.

32. Sawyer DW, Donowitz DR, Mandell GL. Polymorphonuclear neutrophils: an effective antimicrobial force. *Rev Infect Dis* 1989; 11: 1532-44.
33. Ringer TV, Zimmermann JJ. Inflammatory host responses in sepsis. *Crit Care Clin* 1992; 8: 163-89.
34. Taudow G, Wiart J, Panijel J. Influence of amino acid deficiency and t-RNA aminoacylation on DNA synthesis and DNA polymerase activity during secondary immune response in vitro. *Mol Immunol* 1983; 20: 255-62.
35. Roth E, Funovics J, Muhlbacher F, Schemper M, Mauritz W. Metabolic disorders in severe abdominal sepsis: glutamine deficiency in skeletal muscle. *Clin Nutr* 1982; 1: 25-41.
36. Kafkewitz D, Bendich A. Enzyme-induced asparagine and glutamine depletion and immune system function. *Am J Clin Nutr* 1983; 37: 1025-31.
37. Wells CL, Maddaus MA, Simmons RL. Role of macrophages in the translocation of intestinal bacteria. *Arch Surg* 1987; 122: 48-53.
38. Souba WW. Glutamine: a key substrate for the splanchnic bed. *Annu Rev Nutr* 1991; 11: 285-308.
39. Calder PC. Fuel utilization by cells of the immune system. *Proc Nutr Soc* 1995; 54: 65-82.
40. Calder PC, Yagoob P. Glutamine and the immune system. *Amino Acids* 1999; 17: 227-41.
41. Wilmore DW, Shabert JK. Role of glutamine in immunologic responses. *Nutrition* 1998; 14: 618-26.
42. Souba WW, Scott TE, Wilmore DW. Intestinal consumption of intravenously administered fuels. *JPEN J Parenter Enter Nutr* 1985; 9: 18-22.
43. Souba WW, Klimberg VS, Plumley DA. The role of glutamine in maintaining a healthy gut and supporting the metabolic response to injury and infection. *J Surg Res* 1990; 48: 383-91.
44. Souza DA, Greene LJ. Intestinal permeability and systemic infections in critically ill patients: effect of glutamine. *Crit Care Med* 2005; 33: 1125-35.
45. Rohde T, MacLean DA, Klarlund Pedersen B. Glutamine, lymphocyte proliferation and cytokine production. *Scand J Immunol* 1996; 44: 648-50.
46. Bulus NM, Abumrad NN, Grishan FK. Characteristics of glutamine transport in dog jejunal brush border membrane vesicles. *Am J Physiol* 1989; 257: 80-5.
47. Salloum RM, Herskowitz K, Souba WW. Intravenous glutamine stimulates brush border glutamine transport. *Surg Forum* 1990; 41: 195-8.

48. Souba WW, Wilmore DW. Gut-liver interaction during accelerated gluconeogenesis. *Arch Surg* 1985; 120: 66-70.
49. van Acker BA, von Meyenfeldt MF, van der Hulst RR, Hulsewe KW, Wagenmakers AJ, Deutz NE, *et al.* Glutamine: the pivot of our nitrogen economy? *JPEN J Parent Enteral Nutr* 1999; 23(5 Suppl): S45-8.
50. Hall JC, Heel K, McCauley R. Glutamine. *Br J Surg* 1996; 83: 305-12.
51. Chwals WJ. Regulation of the cellular and physiological effects of glutamine. *Mini Rev Med Chem* 2004; 4: 833-8.
52. Cao Y, Feng Z, Hoos A, Klimberg VS. Glutamine enhances gut glutathione production. *JPEN J Parent Enteral Nutr* 1998; 22: 224-7.
53. Rouse K, Nwokedi E, Woodliff JE, Epstein J, Klimberg VS. Glutamine enhances selectivity of chemotherapy through changes in glutathione metabolism. *Ann Surg* 1995; 221: 420-6.
54. Vinnars E, Bergstro J, Furst P. Influence of postoperative state on the intracellular free amino acids in human muscle tissue. *Ann Surg* 1975; 182: 665-71.
55. Souba WW, Herskowitz K, Klimberg VS, Salloum RM, Plumley DA, Flynn TC, *et al.* The effects of sepsis and endotoxemia on gut glutamine metabolism. *Ann Surg* 1990; 211: 543-49.
56. Chun H, Sasaki M, Fujiyama Y, Bamba T. Effect of enteral glutamine on intestinal permeability and bacterial translocation after abdominal radiation injury in rats. *J Gastroenterol* 1997; 32: 189-95.
57. Baker CC, Chaudry IH, Gaines HO, Baue AC. Evaluation of factors affecting mortality rate after sepsis in a murine cecal ligation and puncture model. *Surgery* 1983; 24: 331-5.
58. Marques RG, Morales MM, Petroianu A. Brazilian law for scientific use of animals. *Acta Cir Bras* 2009; 24: 69-74.
59. Suassuna I, Suassuna IR. Duplo açúcar uréia DAU: um meio de triagem para enterobactéria. *Nota técnica. Bras Patol Clin* 1978; 14: 201-3
60. Hugh R, Leifson E. The taxonomic significance of fermentative versus oxidative metabolism of carbohydrates by various gram negative bacteria. *J Bacteriol* 1953; 66: 24-6.
61. Vincent JL. Clinical sepsis and septic shock – definition, diagnosis and management principles. *Langenbecks Arch Surg* 2008; 393: 817-24.
62. Jafari HS, Mccracken GH. Sepsis and septic shock: a review for clinicians. *Pediatr Infect Dis J* 1992; 11: 739-49.

63. Wells CL, Juni BA, Cameron SB, Mason KR, Dunn DL, Ferrieri P, *et al.* Stool carriage, clinical situation, and mortality during an outbreak of vancomycin-resistant enterococci in hospitalized medical and/or surgical patients. *Clin Infect Dis* 1995; 21: 45-50.
64. Benjamin CF. Present understanding of mediators and experimental models of sepsis. *Medicina (Ribeirão Preto)* 2001; 34: 18-26.
65. Remick DG, Newcomb DE, Gerald LB, Call DR. Comparison of the mortality and inflammatory response of two models of sepsis: lipopolysaccharide vs. cecal ligation and puncture. *Shock* 2000; 13: 110-6.
66. Heyman M, Ducroc R, Desjeux JF, Morgat JL. Horseradish peroxidase transport across adult rabbit jejunum in vitro. *Am J Physiol* 1982; 242: G558-G64.
67. Shanahan F. A gut reaction: Lymphoepithelial communication in the intestine. *Science* 1997; 275: 1897-98.
68. Mitsuoka T. Bifidobacteria and their role in human health. *J Ind Microbiol* 1990; 6: 263-8.
69. Mitsuoka T. Intestinal flora and aging. *Nutr Rev* 1992; 50: 438-46.
70. Holzapfel WH, Haberer P, Snel J, Schillinger U, Veld JHJH. Overview of gut flora and probiotics. *Int J Food Microbiol* 1998; 41: 85-101.
71. Farhadi A, Banan A, Fields J, Keshavarzian A. Intestinal barrier: an interface between health and disease. *J Gastroenterol Hepatol* 2003; 18: 479-97.
72. van Felius LD, Akkermans LMA, Bosscha K, Verheem A, Harmsen W, Visser MR, *et al.* Interdigestive small bowel motility and duodenal bacterial overgrowth in experimental acute pancreatitis. *Neurogastroenterol Motil* 2003; 15: 267-76.
73. Dervenis C, Smailis D, Hatzitheoklitos E. Bacterial translocation and its prevention in acute pancreatitis. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2003; 10: 415-8.
74. Wiest R, Rath HC. Bacterial translocation in the gut. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2003; 17: 397-425.
75. Windsor AC, Kanwar S, Li AG, Barnes E, Guthrie JA, Spark JI, *et al.* Compared with parenteral nutrition, enteral feeding attenuates the acute phase response and improves disease severity in acute pancreatitis. *Gut* 1998; 42: 431-5.
76. Dervenis C. Enteral nutrition in severe acute pancreatitis: future development. *JOP* 2004; 5: 60-3.
77. Delves PJ, Roitt IM. The immune system – first of two parts. *N Engl J Med* 2000; 343: 37-49.

78. Fleisher TA, Bleasing JJ. Immune function. *Pediatr Clin North Am* 2000; 47: 1197-209.
79. Newsholme P. Why is L-glutamine metabolism important to cells of the immune system in health, postinjury, surgery or infection? *J Nutr* 2001; 131: 2515S-22S
80. Pereira Junior GA, Marson F, Abeid M, Ostini FM, Souza SH, Basile Filho A. Fisiopatologia da sepse e suas implicações terapêuticas. *Medicina (Ribeirão Preto)* 1998, 31: 349-62.
81. Gérard C, Bruyins C, Marchant A, Abramowicz D, Vandenamee P, Delvaux A, *et al.* Interleukin 10 reduces the release of tumor necrosis factor and prevents lethality in experimental endotoxemia. *J Exp Med* 1993; 177: 547-52.
82. Kolls JK, McCray PB Jr, Chan YR. Cytokine-mediated regulation of antimicrobial proteins. *Nat Rev Immunol* 2008; 8: 829-35.
83. Esche C, Stellato C, Beck LA. Chemokines: key players in innate and adaptive immunity. *J Invest Dermatol* 2005; 125: 615-28.
84. Delves PJ, Roitt IM. The immune system – second of two parts. *N Engl J Med* 2000; 343: 108-17.
85. Walley KR, Lukacs NW, Standiford TJ, Strieter RM, Kunkel SL. Balanced of inflammatory cytokines related to severity and mortality of murine sepsis. *Infect Immun* 1996; 64: 4733-8
86. Rittirsch D, Flierli MA, Ward PA. Harmful molecular mechanisms in sepsis. *Nat Rev Immunol* 2008; 8: 776-87.
87. Bazzoni F, Tamassia N, Rossato M, Cassatella MA. Understanding the molecular mechanisms of the multifaceted IL-10-mediated anti-inflammatory response: lessons from neutrophils. *Eur J Immunol* 2010; 40: 2360-8.
88. Song C, Zhanq Q, Liu X, Shan Y. IL-12 and IL-10 production are differentially regulated by phosphatidylinositol 3-kinase in mast cells. *Scand J Immunol* 2011; 75: 266-72.
89. van Deventer SJH, Elson CO, Fedorak RN. Multiple doses of intravenous interleukin 10 in steroid-refractory Crohn's disease. *Gastroenterology* 1997; 113: 383-9.
90. Schade DS. Surgery and diabetes. *Med Clin North Am* 1988; 72: 1531-43.
91. Hirsch IB, McGill JB. Role of insulin in management of surgical patients with diabetes mellitus. *Diabetes Care* 1990; 13: 980-91.
92. Rose T, Efendic S, Rupnik M. Ca²⁺-secretion coupling is impaired in diabetic Goto Kakizaki rats. *J Gen Physiol* 2007; 129: 493-508.

93. Jacob A, Steinberg ML, Yang J, Dong W, Ji Y, Wang P. Sepsis-induced inflammation is exacerbated in an animal model of type 2 diabetes. *Int J Clin Exp Med* 2008; 1: 22-31.
94. Kudsk KA. Immunonutrition in surgery and critical care. *Annu Rev Nutr* 2006; 26: 463-79.
95. Calder PC. Immunonutrition. *BMJ*. 2003; 327: 117-8.
96. Papaconstantinou HT, Hwang KO, Rajaraman S, Hellmich MR, Townsend CM, Ko TC. Glutamine deprivation induces apoptosis in intestinal epithelial cells. *Surgery* 1998; 124: 152-60.
97. Elwyn DH, Parikh HC, Shoemaker WC. Aminoacid movements between gut, liver and periphery in unanesthetized dogs. *Am J Physiol* 1968; 215:1260-75.
98. Buchman A. The role of glutamine: counterpoint. *Nutr Clin Pract* 2003; 18: 391-6.
99. van der Hulst RR, van Kreel BK, von Meyenfeldt MF, Brummer RJ, Arends JW, Deutz NE, *et al.* Glutamine and the preservation of gut integrity. *Lancet* 1993; 341: 1363-5.
100. Jiang ZM, Cao JD, Zhu XG, Zhao WX, Yu JC, Ma EL, *et al.* The impact of alanyl-glutamine on clinical safety, nitrogen balance, intestinal permeability and clinical outcome in postoperative patients: a randomized, double-blind, controlled study of 120 patients. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 1999; 23(5 Suppl): S62-S6.
101. Souba WW, Klimberg VS, Copeland EM. Glutamine nutrition in the management of radiation enteritis. *JPEN J Parent Enteral Nutr* 1990; 14(4 Suppl): S106-8.
102. Salloum RM, Copeland EM, Souba WW. Brush border transport of glutamine and other substrates during sepsis and endotoxemia. *Ann Surg* 1991; 213: 401-10.
103. Dudrick PS, Austgen PA, Chen MK, Miller D, Pickens B, Souba WW. Prefeeding with glutamine preserves intestinal glutaminase activity in the endotoxin-treated rat. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 1992 16: 18S-35S.
104. Chen K, Okuma T, Okamura K, Torigoe Y, Miyauchi Y. Glutamine-supplemented parenteral nutrition improves gut mucosa integrity and function in endotoxemic rats. *JPEN J Parent Enteral Nutr* 1994; 18: 167-71.
105. Novak F, Heyland DK, Avenell A, Drover JW, Su X. Glutamine supplementation in serious illness: a systematic review of the evidence. *Crit Care Med* 2002; 30: 2022-9
106. O'Riordain MG, De Beaux A, Fearon KC. Effect of glutamine on immune function in the surgical patient. *Nutrition* 1996; 12: S82-4.

107. Lu CY, Shih YL, Sun LC, Chuang JF, Ma CJ, Chen FM, *et al.* The inflammatory modulation effect of glutamine-enriched total parenteral nutrition in postoperative gastrointestinal cancer patients. *Am Surg* 2011; 77: 59-64.
108. Kessel A, Toubi E, Pavlotzky E, Mogilner J, Coran AG, Lurie M, *et al.* Treatment with glutamine is associated with down-regulation of Toll-like receptor-4 and myeloid differentiation factor 88 expression and decrease in intestinal mucosal injury caused by lipopolysaccharide endotoxaemia in a rat. *Clin Exp Immunol* 2008; 151: 341-7.
109. Ding LA, Li JS. Effects of glutamine on intestinal permeability and bacterial translocation in TPN-rats with endotoxemia. *World J Gastroenterol* 2003; 9: 1327-32
110. Yeh SL, Lai YN, Shang HF, Lin MT, Chen WJ. Effects of glutamine supplementation on innate immune response in rats with gut-derived sepsis. *Br J Nutr* 2004; 91: 423-9.
111. Kew S, Wells SM, Yaqoob P, Wallace FA, Miles EA, Calder PC. Dietary glutamine enhances murine T-lymphocyte responsiveness. *J Nutr* 1999; 129: 1524-31.
112. Yeh SL, Lai YN, Shang HF, Lin MT, Chiu WC, Chen WJ. Effects of glutamine supplementation on splenocyte cytokine mRNA expression in rats with septic peritonitis. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 1742-6.
113. Lai YN, Yeh SL, Lin MT, Shang HF, Yeh CL, Chen WJ. Glutamine supplementation enhances mucosal immunity in rats with gut-derived sepsis. *Nutrition* 2004; 20: 286-91.
114. Warhurst AC, Hopkins SJ, Warhurst G. Interferon gamma induces differential upregulation of alpha and beta chemokine secretion in colonic epithelial cell lines. *Gut* 1998; 42: 208-13.
115. van den Berg A, van Elburg RM, Vermeij L, van Zwol A, van den Brink GR, Twisk JW, *et al.* Cytokine responses in very low birth weight infants receiving glutamine-enriched enteral nutrition. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2009; 48: 94-101.
116. Biffl WL, Moore EE, Moore FA, Peterson VM. Interleukin-6 in the injured patient: marker of injury or mediator of inflammation? *Ann Surg* 1996; 224: 647-64.
117. Blackwell TS, Christman JW. Sepsis and cytokines: current status. *Br J Anaesth* 1996; 77: 110-7.
118. Coeffier M, Marion R, Ducrotté P, Déchelotte P. Modulating effect of glutamine on IL-1 β -induced cytokine production by human gut. *Clin Nutr* 2003; 22: 407-13.

119. Echtenacher B, Falk W, Männel DN, Krammer PH. Requirements of endogenous tumor necrosis factor/ cachectin for recovery from experimental peritonitis. *J Immunol* 1990; 145: 3762-66.
120. Hoch RC, Rodriguez R, Manning T, Bishop M, Mead P, Shoemaker WC, *et al.* Effects of accidental trauma on cytokine and endotoxin production. *Crit Care Med* 1993; 21:839-45.
121. Song C, Zhanq Q, Liu X, Shan Y. IL-12 and IL-10 production are differentially regulated by phosphatidylinositol 3-kinase in mast cells. *Scand J Immunol* 2012; 75: 266-72.
122. Sabat R, Grütz G, Warszawska K, Kirsch S, Witte E, Wolk K, *et al.* Biology of interleukin-10. *Cytokine Growth Factor Rev* 2010; 21: 331-44.
123. Latifi SQ, O'Riordan MA, Levine AD. Interleukin-10 controls the onset of irreversible septic shock. *Infect Immun* 2002; 70: 4441-6.

APÊNDICE – Análises sanguíneas

Leucócitos

Tabela 1A. Leucometria total (células/mm³) por grupo de animais, em todos os tempos do experimento.

Animais/ Grupos	Tempo 0			Tempo 1			Tempo 2		
	I	II	III	I	II	III	I	II	III
1	9,9	8,1	6,4	10,9	7,4	7,2	10,0	11,3	8,4
2	9,7	7,6	5,8	11,9	7,5	6,1	11,6	9,0	9,6
3	9,1	6,8	9,2	11,5	7,7	4,9	11,3	7,7	8,4
4	7,1	6,9	11,9	7,4	9,4	4,2	8,4	8,0	7,5
5	10,6	8,0	9,5	9,6	9,5	7,2	0,1	11,2	6,1
6	10,5	8,4	11,4	8,9	8,0	8,4	9,2	9,0	11,8
7	9,9	14,3	10,6	8,1	11,4	6,9	8,6	11,8	9,5
8	11,4	7,9	6,4	11,1	9,3	4,3	11,1	6,9	4,2

Glicemia

Tabela 2A. Valores de glicemia (mg/dl), por grupo de animais, em todos os tempos do experimento.

Animais/ Grupos	Tempo 0			Tempo 1			Tempo 2		
	I	II	III	I	II	III	I	II	III
1	266	267	231	449	462	279	498	600	413
2	301	301	323	435	475	505	591	600	532
3	251	178	320	527	600	413	600	600	600
4	366	337	265	532	461	405	600	600	600
5	203	113	230	260	485	373	482	599	592
6	223	196	336	284	600	411	600	600	598
7	285	235	254	412	402	483	546	600	600
8	245	303	326	343	502	386	600	600	552

Citocinas

Tabela 3A. Valores de IFN- γ (pg/ml), por grupo de animais, em todos os tempos do experimento.

Animais/ Grupos	Tempo 0			Tempo 1			Tempo 2		
	I	II	III	I	II	III	I	II	III
1	303,97	164,04	704,89	332,23	136,41	191,8	81,71	54,75	205,73
2	275,79	1.242,26	28,2	191,8	1.615,41	54,75	247,69	1.734,31	28,2
3	388,97	908,38	474,55	81,71	191,8	108,96	136,41	205,73	81,71
4	28,2	0,01	4.319,43	0,01	2,55	690,41	28,2	0,01	1.069,28
5	2.452,49	360,57	136,41	1.600,56	247,69	2,55	2.107,42	164,04	28,2
6	8.044,66	2.783,94	2,55	5.378,6	2.302,26	2,55	5.301,61	2.077,5	81,71
7	28,2	560,6	748,13	0,01	675,95	169,63	0,01	219,69	345,40
8	332,23	388,97	303,97	136,41	303,97	136,41	81,71	332,23	922,98

Tabela 4A. Valores de IL-6 (pg/ml), por grupo de animais, em todos os tempos do experimento.

Animais/ Grupos	Tempo 0			Tempo 1			Tempo 2		
	I	II	III	I	II	III	I	II	III
1	323,88	290,18	723,00	188,41	357,49	557,66	189,52	985,59	1.213,85
2	154,19	1.667,22	50,05	222,46	1.083,57	119,78	188,41	2.021,15	3.185,34
3	391,02	590,82	323,88	323,88	256,38	188,41	391,02	690,02	357,49
4	50,05	85,11	4.054,89	85,11	50,05	1.892,65	154,19	4.747,01	2.692,60
5	1.699,47	755,94	154,19	1.586,52	541,06	85,11	1.796,13	690,02	1.667,22
6	6.746,80	1.699,47	102,48	5.530,36	1.343,77	119,78	5.811,64	17.846,62	323,88
7	50,05	920,13	10.150,04	154,19	1.116,17	3.928,74	188,41	623,93	574,24
8	323,88	961,68	491,18	171,32	678,35	256,38	222,46	3.943,48	1.034,61

Tabela 5A. Valores de IL-10 (pg/ml), por grupo de animais, em todos os tempos do experimento.

Animais/ Grupos	Tempo 0			Tempo 1			Tempo 2		
	I	II	III	I	II	III	I	II	III
1	2.331,47	1.031,04	4.866,49	6.752,86	2.301,34	4.382,16	2.963,97	3.627,10	3.687,44
2	10.109,76	4.200,77	3.536,61	2.210,96	3.385,85	4.412,40	7.518,13	11.823,56	20.032,65
3	12.387,30	4.625,28	2.903,73	8.009,36	5.336,47	1.426,04	7.763,60	8.795,77	1.939,67
4	3.235,14	755,26	1.335,13	3.959,09	878,16	1.092,01	8.132,34	13.613,51	6.752,86
5	2.692,89	4.593,94	2.337,92	1.274,45	3.325,56	1.792,68	1.788,81	9.861,59	7.431,46
6	3.747,79	1.335,13	444,27	3.174,87	2.994,09	538,31	2.120,56	10.420,37	4.866,49
7	939,40	18.581,50	285,15	1.516,85	18.388,61	285,15	1.031,04	6.112,13	5.807,68
8	3.898,70	1.879,34	2.994,09	2.210,96	6.081,66	412,72	1.304,79	6.112,13	8.933,47

ANEXO – Aprovação da Comissão de Ética para o cuidado e uso de animais experimentais – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ



UNIVERSIDADE DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE BIOLOGIA ROBERTO ALCANTARA GOMES



**COMISSÃO DE ÉTICA PARA O CUIDADO E USO DE ANIMAIS EXPERIMENTAIS
CERTIFICADO**

Certificamos que o Protocolo nº CEUA/031/2011 sobre "Efeito da suplementação dietética com L-glutamina na sepse abdominal em rato", sob a responsabilidade de Ruy Garcia Marques, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética Para o Cuidado e Uso de Animais Experimentais do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes da UERJ (CEA), em 14/07/2011. Este certificado expira em 14/07/2015.

Rio de Janeiro, 14 de Julho de 2011.

Prof. Patricia Cristina Lisboa
CEA/IBRAG/UERJ

Prof. Israel Felzenszwalb
CEA/IBRAG/UERJ

Prof.ª Dra. Patricia Cristina Lisboa da Silva
Prof.ª Adj. do Dept. Ciências Fisiológicas - IBRAG/IBR
Matrícula 34763-9

Prof. Israel Felzenszwalb
Coordenador do CEA
IBRAG/IBR
14/07/2011

1/000