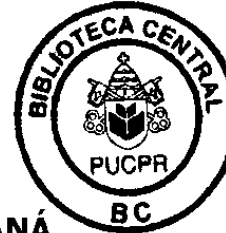


PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ

**CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PÓS-GRADUAÇÃO EM CLÍNICA CIRÚRGICA**

MESTRADO-2006

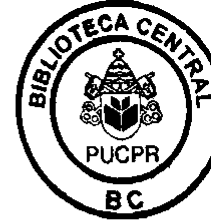


EFEITO DA IMUNOMODULAÇÃO DA NUTRIÇÃO ENTERAL EXPERIMENTAL ASSOCIADA À SEPSE

SÉRGIO SLIVA

**Dissertação apresentada ao Programa
de Mestrado em Clínica Cirúrgica, da
Pontifícia Universidade Católica do
Paraná, como requisito para a obtenção
ao título de Mestre**

**Orientador: Prof. Dr. Sérgio Luiz Rocha
Coordenador: Prof. Dr. Luiz Carlos Von
Bathen**



SÉRGIO SLIVA

EFEITO DA IMUNOMODULAÇÃO DA NUTRIÇÃO ENTERAL EXPERIMENTAL ASSOCIADA À SEPSE

Dissertação apresentada ao Programa
de Mestrado em Clínica Cirúrgica, da
Pontifícia Universidade Católica do
Paraná, como requisito parcial para a
obtenção ao título de Mestre

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Luiz Rocha
Coordenador: Prof. Dr. Luiz Carlos Von
Bathen

Curitiba
2006

Dados da Catalogação na Publicação
Pontifícia Universidade Católica do Paraná
Sistema Integrado de Bibliotecas – SIBI/PUCPR
Biblioteca Central

S633e
2006 Sliva, Sergio
Efeito da imunomodulação da nutrição enteral experimental associada à
sepse / Sergio Sliva ; orientador, Sérgio Luiz Rocha ; coordenador, Luiz Carlos
Von Bathen. – 2006.
xiii, 57 f. : il. ; 30 cm

Dissertação (mestrado) – Pontifícia Universidade Católica do Paraná,
Curitiba, 2006
Bibliografia: f. 43-49

1. Alimentação enteral. 2. Imunomodulação. 3. Glutamina. 4. Ácidos graxos
Ômega-3. 5. Septisemia. I. Rocha, Sérgio Luiz. II. Bathen, Luiz Carlos Von
III. Pontifícia Universidade Católica do Paraná. Programa de Pós-Graduação
em Cirurgia. IV. Título.

CDD 20. ed. – 617

Biblioteca Central
Efeito da imunomodulação da nutrição enteral
Ac. 294983 - R. 904565 Ex. 1
Doação - PPGC
13/08/2012



Pontifícia Universidade Católica do Paraná
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica

**ATA DA SESSÃO PÚBLICA DE EXAME DE DISSERTAÇÃO DO PROGRAMA
DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CLÍNICA CIRÚRGICA AO NÍVEL DE MESTRADO
DA PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ**

Aos vinte e sete dias do mês de outubro de 2006, realizou-se a sessão pública de defesa de dissertação “EFEITO DA IMUNOMODULAÇÃO DA NUTRIÇÃO ENTERAL EXPERIMENTAL ASSOCIADA A SEPSE”, apresentada por Sergio Sliva, orientado pelo Prof. Dr. Sergio Luiz Rocha, para obtenção do título de mestre. A Banca Examinadora foi composta pelos seguintes professores:

MEMBROS DA BANCA	ASSINATURA
Prof. Dr. Zacarias Alves de Souza Filho	
Prof. Dr. João Eduardo Nicoluzzi	
Prof. Dr. Paulo Afonso Nassif	

De acordo com as normas regimentais a Banca Examinadora deliberou sobre os conceitos a serem distribuídos e que foram os seguintes:

Prof. Dr. Zacarias Alves de Souza Filho

Avaliação: Aprovado

Prof. Dr. João Eduardo Nicoluzzi

Avaliação: APROVADO.

Prof. Dr. Paulo Afonso Nassif

Avaliação: Aprovado

Avaliação Final: Aprovado

Suplente: Prof. Dr. Luiz Carlos Von Bahten

Observações da Banca Examinadora:

Prof. Dr. Luiz Carlos Von Bahten

Diretor Adjunto do Programa de Pós-Graduação em Cirurgia

DEDICATÓRIA

Aos meus filhos pela alegria e estímulo que as suas existências me proporcionam.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Sérgio Luiz Rocha , professor de Anatomia Médica, Técnica Operatória e Cirurgia Experimental da Pontifícia Universidade Católica do Paraná , pelas valorosas orientações recebidas neste estudo, confiança e amizade.

Ao Prof. Dr. Luiz Carlos Von Bathen, diretor adjunto do Programa de Pós – Graduação em Clínica Cirúrgica do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Pontifícia Universidade Católica do Paraná , pela exemplar direção e dedicação ao curso.

A Prof. Dra. Cristina Martins , professora do curso de Nutrição da Pontifícia Universidade Católica do Paraná e nutricionista chefe das Clinicas de Doenças Renais de Curitiba pela amizade , grande incentivo, valiosas sugestões e ensinamentos.

A Dra. Ana Paula Martins Sebastião pelos Estudos Anátomo Patológicos , revisões das lâminas , grande incentivo e pela amizade.

Ao Dr. Indalécio Mainardis Sutil , diretor do biotério da Pontifícia Universidade Católica do Paraná , pela valiosa colaboração.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	ix
LISTA DE TABELAS.....	x
LISTA DE ABREVIACÕES.....	xi
RESUMO.....	xiii
ABSTRACT.....	xiv
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Objetivos	4
2 REVISÃO DA LITERATURA	5
2.1 Desnutrição e Imunidade	5
2.2 Imunonutrientes	6
2.2.1 Glutamina	7
2.2.2 Arginina	12
2.2.3 Ácidos Graxos n-3 e n-9	17
2.3 Sepses Experimental.....	23
2.3.1 Infusão Endovenosa de Endotoxinas.....	24
2.3.2 Infusão Endovenosa de Bactérias Vivas.....	24
2.3.3 Ligadura e Perfuração do Ceco.....	25
2.3.4 Inoculação Intraperitoneal de Bactérias Fecais.....	25
2.3.5 Inoculação Intraperitoneal de <i>Escherichia coli</i>	26
3 MÉTODO	27
3.1 Tipo de Estudo	27
3.2 População	27
3.3 Procedimentos	27

3.4 Análise Estatística	31
4 RESULTADOS	33
5 DISCUSSÃO	36
6 CONCLUSÕES	42
REFERÊNCIAS	43
APÊNDICES.....	50
APÊNDICE 1 - Ficha de Coleta de Dados	51
APÊNDICE 2 - Cálculo das Dietas para Um e Quinze Ratos	52
APÊNDICE 3 - Cronograma do Projeto	53
APÊNDICE 4 - Orçamento do Projeto	55
APÊNDICE 5 – Documentação da peritonite.....	56

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Metabolismo da arginina.....	13
Figura 2 – Efeitos do ácido eicosapentaenóico e ácido araquidônico sobre mediadores inflamatórios.....	22
Figura 3 – Neutrófilos pulmonares após a morte, no grupo de estudo e no grupo controle.....	31
Figura 4 – Evolução de peso nos três momentos, no grupo controle e no grupo de estudo.....	31
Figura 5 – Sepses experimental 1.....	56
Figura 6 – Sepses experimental 2.....	57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Glutamina em Humanos – Efeitos Positivos.....	11
Tabela 2 – Características e Formulação das Dietas.....	27
Tabela 3 – Quadro Resumido do Procedimento.....	28
Tabela 4 – Peso e Marcador Inflamatório entre os Grupos.....	30

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Glutamina em Humanos – Efeitos Positivos.....	11
Tabela 2 – Características e Formulação das Dietas.....	27
Tabela 3 – Quadro Resumido do Procedimento.....	28
Tabela 4 – Peso e Marcador Inflamatório entre os Grupos.....	30

LISTA DE ABREVIações

α -KG	α -cetoglutarato
ADC	arginina descarboxilase
AGA	agmatinase
AGAT	arginina:glicina amidinotransferase
Ala-Glu	dipeptideo alanina-glutamato
AS	argininosuccinato
ASL	argininosuccinato liase
Asp	aspartato
ASS	argininosuccinato sintase
BH4	(6R)-5,6,7,8-tetrahidro-L-biopterina
CK	creatina quinase
CP	carbamoilfosfato
CPS-I	carbamoilfosfato sintetase-I (amônia)
Cr-P	creatina-fosfato
DCAM	S-adenosilmetionina descarboxilada
DNA	ácido desoxiribonucléico
g	grama
GA	guanidinoacetato
GDH	glutamato desidrogenase
GI	grupo de estudo; dieta imunomoduladora
Gln	glutamina
Glu	glutamato
GMAT	guanidinoacetato N-metiltransferase
GP	grupo controle, dieta padrão
IgA	imunoglobulina A
kg	quilogramas
mL	mililitros
MTA	metiltioadenosina
N2	nitrogênio
NAG	N-acetilglutamato

NAGS	N-acetilglutamato sintase
NO	óxido nítrico
NOS	óxido nítrico sintase
NPT	nutrição parenteral total
OAT	ornitina aminotransferase
OCT	ornitina carbamoiltransferase
ODC	ornitina decarboxilase
P5CD	pirrolina-5-carboxilato desidrogenase
P5CR	pirrolina-5-carboxilato redutase
P5CS	pirrolina-5-carboxilato sintase
PO	prolina oxidase
SAHC	S-adenosilhomocisteína
SAM	S-adenosilmetionina
SAMD	S-adenosilmetionina descarboxilase
SPDS	spermidina sintase
TMO	transplante de medula óssea

RESUMO

Evidências sugerem que o sistema imune e o estado nutricional podem ser otimizados mediante a modulação de nutrientes. O objetivo deste estudo foi avaliar inflamação, peso e tempo de sobrevida de ratos, antes e após um insulto inflamatório, com o uso de fórmula enteral imunomoduladora (GI) ou padrão-normal (GP). As dietas continham a mesma distribuição e conteúdo de nutrientes. No GI, parte da proteína foi substituída por glutamina e parte do lipídio ômega-6 foi substituído por ômega-3. Foram utilizados 30 ratos, 15 em cada grupo, alimentados durante 7 dias por gavagem. No 8º dia, os ratos foram induzidos à peritonite, com inoculação de *E. coli*. A partir de então, os ratos foram alimentados somente com ração via oral, *ad libidum*. Ambos os grupos tiveram peso avaliado inicialmente. Após o óbito, foi avaliada a média de número de neutrófilos pulmonares, como marcador inflamatório. O peso foi reavaliado no momento da indução da peritonite e no óbito. Resultados: O GI não apresentou alteração do peso do início ao final do período da dieta ($287,4 \pm 6,6$ vs. $285,1 \pm 13,6$ g; $p=0,5$). De outro lado, o GP apresentou perda ($287,4 \pm 6,6$ vs. $270,3 \pm 16,9$ g; $p=0,001$). No GI, houve redução no peso do final do período da dieta até o óbito ($285,1 \pm 13,6$ vs. $268,9 \pm 5,8$ g; $p=0,0002$). Para o GP, não houve redução significativa ($270,3 \pm 16,9$ vs. $267,9 \pm 6,6$ g; $p=0,6$). Não houve diferença significativa na análise dos neutrófilos pulmonares entre GP e GI ($12,5 \pm 3,4$ vs. $10,2 \pm 3,1$ células/campo de grande aumento; $p=0,1287$). Não houve diferença significativa no tempo de sobrevida entre os grupos. Em conclusão, a dieta imunomoduladora, com manipulação da glutamina e dos ácidos graxos ômega-6 e ômega-3, foi capaz de preservar o peso dos ratos, provavelmente devido à melhora do anabolismo e otimização das calorias e nutrientes ingeridos. Esse fator, entretanto, não influenciou no tempo de sobrevida em jejum, ou na resposta inflamatória dos animais.

Palavras-chave: Imunomodulação, Glutamina, Ômega-3, Sepses, Peritonite.

ABSTRACT

Evidence suggests that the immune system and the nutritional status may be optimized through nutrient modulation. The aim of this study was to evaluate inflammation, body weight and survival time of mice, before and after an inflammatory insult, with the use of an immunomodulated (GI) or a standard enteral formula (GP). Both diets had the same nutrient distribution and amount. For the GI, part of the protein was replaced by glutamine, and part of the omega-6 fatty acids was replaced by omega-3. Thirty mice were included, 15 in each group, and were fed during 7 days, by means of gavage. At the 8th day, the mice were induced to peritonitis, with *E. coli* inoculation. From this moment on, the mice were fed orally *ad libidum* with rodent food. Both groups had their weight initially evaluated. After death, the mean number of pulmonary neutrophil count was evaluated, as an inflammatory marker. The weight was re-evaluated at the peritonitis induction time and again at death. Results: GI did not present weight change from beginning to diet termination (287.4 ± 6.6 vs. 285.1 ± 13.6 g; $p=0.5$). On the other hand, the GP presented weight loss (287.4 ± 6.6 vs. 270.3 ± 16.9 g; $p=0.001$). For GI, there was weight decrease from the period of diet termination until death (285.1 ± 13.6 vs. 268.9 ± 5.8 g; $p=0.0002$). For GP, there was not weight reduction in the same period of time (270.3 ± 16.9 vs. 267.9 ± 6.6 g; $p=0.6$). There was no significant difference in pulmonary neutrophil count between GP and GI (12.5 ± 3.4 vs. 10.2 ± 3.1 cells/field; $p=0.1287$). There was no significant difference in survival time between groups. In conclusion, the immunoenhancing diet, with alteration in glutamine, omega-6 and omega-3 fatty acids was capable to preserve body weight, probably due to improvement in anabolism and optimization of the ingested calories and nutrients. This factor, however, did not influence the survival time while the animals were fasting, as well as their inflammatory response.

Key words: Immunomodulation, Glutamine, Omega-3, Sepsis, Peritonitis.

1 INTRODUÇÃO

Embora as disfunções imunes nos pacientes cirúrgicos tenham causas multifatoriais, o estado nutricional pode ter um papel importante nesse aspecto. Evidências recentes sugerem que o sistema imune pode ser otimizado mediante a modulação, com o uso de meios específicos de suporte nutricional.

Dois grandes paradigmas existem a respeito da relação entre nutrição e infecção ⁽¹⁾:

- a desnutrição altera a imunidade humoral e a celular, predispondo o organismo ao risco aumentado para infecções. O desenvolvimento da infecção gera um estado catabólico, que exacerbará o estado de desnutrição, levando a um círculo vicioso;
- o estresse cirúrgico ou qualquer outro trauma físico produz um estado catabólico, proporcional à magnitude do insulto, em adição ao comprometimento da imunidade humoral e celular. O desenvolvimento de um estado catabólico persistente, que promove a desnutrição, compromete mais ainda a defesa imune e predispõe o paciente a complicações infecciosas.

Nos pacientes críticos, as mudanças no sistema imune decorrentes da enfermidade são complexas, variáveis e pouco definidas ⁽²⁾. Por exemplo, após uma condição de estresse, os pacientes apresentam algum grau de imunossupressão, aumentando o risco de morbidade e mortalidade por infecções adquiridas. A

imunoestimulação pode reduzir essas complicações infecciosas. Com o crescente interesse quanto ao papel do intestino no desenvolvimento de infecções e o desenvolvimento da insuficiência de múltiplos órgãos em pacientes críticos, o uso de nutrientes imunomoduladores parece bastante atrativo. Esses podem modular diretamente a secreção de citocinas do epitélio intestinal, ou alterar as propriedades da superfície de sua mucosa. Com isso, pode-se prevenir a interação de antígenos com a superfície mucosa, ou sua translocação pelas rotas paracelulares ou transcelulares. Ao final, poder-se-ia prevenir a resposta inflamatória das células submucosas ⁽³⁾.

Estudos, principalmente com animais de laboratório, têm mostrado vantagens do uso de imunonutrientes em estados críticos. Esses estudos mostram redução de complicações inflamatórias e infecciosas, melhora do estado nutricional e redução do período de recuperação. Porém, alguns outros estudos não apresentam as mesmas respostas. Então, pelo fato de ainda existirem muitas dúvidas quanto ao tipo, à dosagem e à combinação de imunonutrientes na resposta inflamatória, outros estudos são necessários.

São três as hipóteses que norteiam este trabalho. Inicialmente, questionamos se a dieta imunomoduladora teria maior preservação do peso nos animais em relação àqueles que ingeriram dieta padrão para a espécie. Uma segunda hipótese seria em relação à repercussão pulmonar após o desenvolvimento de peritonite induzida, levando ao quadro de sepse, pois o pulmão é um dos órgãos mais afetados em quadros de infecção sistêmica. Após a morte destes animais, haveria menor número de neutrófilos pulmonares no grupo com dieta imunomoduladora, representando resposta sistêmica mais adequada e com resultado terapêutico

melhor. E a terceira hipótese está relacionada ao tempo de sobrevida após a indução de peritonite, como melhor resposta no uso da dieta imunomoduladora, levando ao aumento do tempo de vida após o início do insulto infeccioso, com aumento do tempo de tentativa terapêutica na reversão do quadro inflamatório sistêmico.

1.1 Objetivos

Induzir peritonite aguda bacteriana em ratos alimentados previamente com dieta padrão para a espécie ou dieta imunomoduladora e comparar a evolução de peso antes, após a indução da inflamação e no momento da morte; comparar, após a morte, os níveis de neutrófilos pulmonares entre os grupos e avaliar o tempo de sobrevida entre os dois grupos.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Desnutrição e Imunidade

Os primeiros estudos envolvendo a ciência da nutrição e a imunologia surgiram em 1970. A partir de então, a análise dos parâmetros da imunidade passou a integrar a avaliação do estado nutricional.

O estado nutricional deficiente por si pode afetar os mecanismos imunológicos, deprimindo as funções humoral e celular. Alterações no número, proliferação e função dos linfócitos T circulantes e, conseqüentemente, da produção de citocinas e alterações do reconhecimento de antígenos estão presentes nas situações de desnutrição protéico-calórica ⁽⁴⁾.

Na presença de enfermidades críticas resultantes de trauma, queimaduras ou grandes operações, ocorre elevação intensa do catabolismo pela liberação de mediadores inflamatórios, como interleucina-1 e 6 e fator de necrose tumoral. Ocorrem, também, alterações no metabolismo de macronutrientes, perda de massa magra, imunossupressão e comprometimento do processo de cicatrização ⁽⁴⁾. A supressão da defesa imune pode causar diminuição na resistência orgânica e susceptibilidade aumentada à infecção. Essa pode ser a maior causa da falência múltipla de órgãos e morte. O intestino, cuja barreira mucosa apresenta-se comprometida em situações críticas, é uma fonte de invasão de bactérias e

endotoxinas bacterianas, contribuindo significativamente na resposta fisiopatológica ao trauma.

Três fatores podem determinar a perda da função de barreira da mucosa intestinal ⁽³⁾:

- alteração da permeabilidade da mucosa;
- diminuição das defesas do organismo; e
- aumento do número de bactérias no lúmen intestinal.

O sistema imune mucoso é a primeira linha de defesa para mais de 95% de todas as doenças virais e bactérias infecciosas. As citocinas são responsáveis pela produção de anticorpos mucosos e têm muitas funções que incluem quimiotaxia dos neutrófilos, ativação da IgA, proliferação celular epitelial, diferenciação e restituição da mucosa após a injúria ⁽³⁾. No paciente crítico, a barreira intestinal aos patógenos torna-se comprometida devido ao estresse, à injúria, assim como pela ausência da alimentação via enteral. A barreira intestinal danificada ou imatura pode levar ao aumento da permeabilidade intestinal a antígenos e da resposta imune. É assim, portanto, que é explicada a vulnerabilidade à inflamação e à infecção. Nos pacientes sépticos, há um desequilíbrio na produção de citocinas pro- e anti-inflamatórias, e falha na manutenção da defesa antioxidante ⁽³⁾.

2.2 Imunonutrientes

Os imunonutrientes são um grupo de substâncias químicas heterogêneas, com propriedades farmacológicas capazes de modular as respostas inflamatórias e

imunes. Os seguintes nutrientes são geralmente relacionados à função imunomoduladora: glutamina, arginina, nucleotídeos, ácidos graxos de cadeia curta e de cadeia longa, vitamina A, E, C, zinco e selênio^(4, 5). Devido à importância que se dá ao papel desses nutrientes na modulação da resposta inflamatória, muitos estudos têm sido realizados, principalmente em modelos animais. Entretanto, seus resultados ainda devem ser analisados com cautela.

Em uma meta-análise⁽²⁾ envolvendo 2.419 pacientes críticos e cirúrgicos, foi comparado o uso de dietas enterais contendo imunonutrientes com fórmulas padrão. Os resultados mostraram que, para pacientes cirúrgicos, a imunonutrição foi associada com menor período de hospitalização e menor taxa de infecção, principalmente após receberem dietas com maior teor de arginina. Entretanto, para pacientes críticos, os resultados não foram os mesmos. Os estudos que utilizaram produtos além daqueles ricos em arginina estiveram associados com taxa aumentada de mortalidade e tendência para aumento de complicações. Portanto, a imunoestimulação parece reduzir complicações infecciosas de pacientes cirúrgicos, mas não de críticos. Nesses, as mudanças no sistema imune, decorrentes da enfermidade, são complexas, variáveis e pouco definidas.

2.2.1 Glutamina

A glutamina é o aminoácido livre mais abundante no corpo humano, constituindo mais que 60% do *pool* de aminoácidos livres totais na musculatura esquelética⁽⁶⁾. Atua como intermediário em muitas vias metabólicas, como aquelas que resultam na síntese de nucleotídeos purínicos e pirimidínicos, de peptídeos e

outros aminoácidos, bem como na formação de glicosamina. Além disso, a glutamina atua ativamente no equilíbrio ácido-básico mediante sua participação na gliconeogênese, amoniogênese e redução de amônia. A glutamina é um combustível metabólico importante para as células de proliferação rápida, como as do trato gastrointestinal, enterócitos e colonócitos. Ela é, também, principalmente essencial para as células do sistema imune: linfócitos e macrófagos.

A glutamina é metabolizada por dois principais sistemas enzimáticos que se encontram distribuídos em diferentes tecidos do corpo: a glutaminase e a glutamina sintetase. A primeira é encontrada principalmente nos músculos esqueléticos e nos pulmões, e catalisa a hidrólise da glutamina em glutamato e amônia. A glutamina sintetase, por sua vez, está presente principalmente no intestino e nos rins, e catalisa a síntese da glutamina, permitindo rápida transformação da glutamina ^(4, 7).

Embora a glutamina seja um aminoácido não-essencial em situações normais, ela torna-se “condicionalmente essencial” durante períodos de estresse severo. Estados catabólicos, como estresse cirúrgico, trauma, sepse ou jejum, podem resultar em aumento da demanda tecidual para a glutamina, resultando em alterações de seu fluxo inter-órgãos. Isso conduz à redução significativa de seus níveis plasmáticos, apesar do grande aumento da liberação da glutamina pelo músculo esquelético ⁽⁶⁾.

A depleção intramuscular de glutamina é uma das características da injúria e de outras condições hipercatabólicas. Observações *in vitro* sugerem que a glutamina pode estar envolvida na regulação do balanço protéico muscular e seu efeito positivo nos processos anabólicos. Concentrações extremamente baixas de glutamina muscular podem ser correlacionadas com recuperação deficiente e aumento da

mortalidade, redução da taxa de proliferação de linfócitos e também piora da fagocitose por macrófagos peritoneais. Portanto, já que a manutenção do *pool* de glutamina intracelular promove a conservação da proteína muscular, há uma justificativa teórica para suplementação de glutamina na nutrição de pacientes com injúria e infecção ⁽⁶⁾.

A captação da glutamina pelos enterócitos excede, de longe, a de qualquer outro nutriente e, sob certos estados de estresse, a sua captação e utilização estão marcadamente aumentadas. Embora se saiba que a glutamina promova um pequeno crescimento intestinal e que limita a atrofia mucosa sob certas condições ⁽⁸⁻¹⁰⁾, seus efeitos benéficos sobre a barreira intestinal e função imune permanecem ainda pouco esclarecidos.

Um estudo foi realizado com 20 pacientes apresentando doença inflamatória intestinal e doença neoplásica ⁽⁸⁾. Os pacientes receberam, durante 10 a 14 dias, nutrição parenteral enriquecida com 0,23 g/kg/dia de glicil-L-glutamina (grupo NPT-Gln, n=10) e nutrição parenteral padrão (grupo NPT, n=10). Os resultados mostraram que houve aumento significativo da permeabilidade intestinal em todos os pacientes do grupo com nutrição parenteral padrão. Já no grupo suplementado com glutamina, a permeabilidade intestinal manteve-se inalterada. A profundidade das criptas não foi significativamente diferente entre os grupos e permaneceu inalterada pela nutrição parenteral. Comparado com o grupo controle, a altura das vilosidades foi maior no grupo NPT-Gln antes e depois da terapia nutricional, enquanto que no grupo NPT a altura das vilosidades diminuiu após duas semanas de nutrição parenteral.

Em adição, a glutamina também é precursora da glutathione. Este é um importante componente do sistema de defesa antioxidante e que ajuda a proteger o intestino, o fígado e outros órgãos contra injúria de isquemia-reperfusão. A glutathione, além de seu papel antioxidante, pode influenciar aspectos da função imune que estão relacionados aos linfócitos T, cujas funções podem ser potencializadas pela administração de glutathione *in vivo*.

Estudos clínicos mostraram redução no tempo de hospitalização em pacientes cirúrgicos recebendo suplementação de glutamina ⁽¹¹⁻¹³⁾. A sua suplementação de 0,57 g/kg/dia, ou 40 g/d, via nutrição parenteral, parece prevenir a deficiência de glutamina corporal, melhorar o balanço nitrogenado, reduzir a morbidade, a incidência de infecção clínica, a colonização microbiana e o período de hospitalização ^(14, 15). Em adição, a suplementação da glutamina está associada com contenção de custo, devido à redução no tempo de hospitalização ⁽¹⁶⁾.

Em conclusão, a utilização de suplementação de glutamina pode promover efeitos benéficos no tratamento de pacientes catabólicos, levando à considerável melhora na resposta imune e no balanço nitrogenado, à elevação da síntese protéica e à redução do período de hospitalização e dos custos.

A Tabela 1 mostra alguns estudos que apresentaram efeitos positivos do uso de glutamina em humanos.

Tabela 1 - Glutamina em Humanos - Efeitos Positivos

Estudo	N / Métodos	Resultados
Hammarqvist et al. <i>Ann Surg</i> , 1989	22 pacientes cirúrgicos 0,28 g/kg/dia Gln, 3 dias	↓perda de Gln livre no músculo ↑balanço nitrogenado
Schellinga et al. <i>Ann Surg</i> , 1991	20 pacientes de TMO 0,57 g/kg/dia, 27 dias	Água corporal total e fluido extracelular mantidos
Ziegler et al. <i>Ann Intern Med</i> , 1992	45 pacientes de TMO 2,83 g/100ml/dia Gln, 30 dias	↓cultura microbiana positiva
Van der Hulst et al. <i>Lancet</i> , 1993	20 pacientes cirúrgicos 0,23 g/kg/dia Glicil-Gln, 10-14 dias	Preservação da mucosa intestinal Manutenção da permeabilidade intestinal
Tremel et al. <i>Gastroenterology</i> , 1994	12 pacientes de UTI 20 g/dia L-Ala-Gln, 9 dias	Prevenção da atrofia intestinal ↓permeabilidade intestinal
McBurney et al. <i>J Am Diet Assoc</i> , 1994	43 pacientes de TMO 0,57 g/kg/dia Gln + RenAmin, 3 dias	↑balanço nitrogenado ↓permanência hospitalar ↓cultura microbiana positiva ↓custo hospitalar ↑humor e vigor
O'Riordain et al. <i>Ann Surg</i> , 1994	22 pacientes cirúrgicos 0,18 g/kg/dia Glicil-Gln, 6 dias	↑síntese de DNA células T
Lacey et al. <i>JPEN</i> , 1996	44 neonatos pré-termo 1,4 g/100 ml/dia Gln, 14 ± 6 dias	↓tempo de NPT; ↓tempo para alimentação completa; ↓tempo de ventilação
Griffiths et al. <i>Nutrition</i> , 1997	84 pacientes críticos Início = 18 g/dia Gln Final = 21 g/dia Gln	↑6 meses sobrevida ↓custo hospitalar
Van der Hulst et al. <i>JPEN</i> , 1997	20 pacientes com doença inflamatória, câncer 0,23 g/kg/dia Gln, 12 dias	↑tempo de vida das células intestinais
Morlion et al. <i>Ann Surg</i> , 1998	28 pacientes cirúrgicos 0,3 g/kg/dia Ala-Gln	Sem efeito colateral, ↑balanço nitrogenado, ↑recuperação de linfócitos, ↑geração de cisteinil-leucotrieno, ↓período de hospitalização

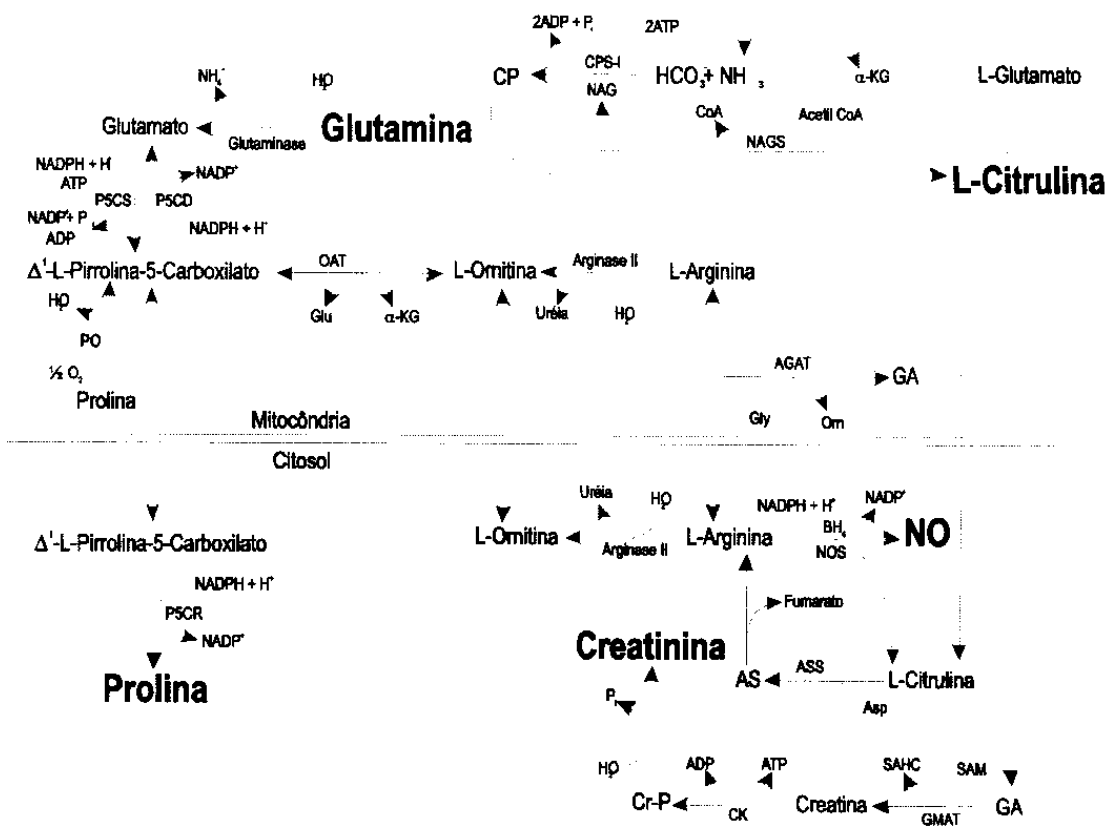
Powell-Tuck et al. <i>Gut</i> , 1999	168 pacientes 20 g/dia Gln, 8 dias	↓permanência hospitalar em pacientes cirúrgicos
Jiang et al. <i>JPEN</i> , 1999	120 pacientes cirúrgicos 0,5 g/kg/dia Gln, 6 dias	↑balanço nitrogenado, preservação da permeabilidade intestinal, ↓permanência hospitalar
Van Acker et al. <i>Am J Clin Nutr</i> , 2000	23 pacientes cirúrgicos 0,21 g/kg/dia Gln dipeptídeo, 8-10 dias	Não houve inibição da síntese endógena de glutamina
Lin et al. <i>Clin Nutr</i> , 2002	48 pacientes cirúrgicos 0,417 g/kg/dia Ala-Gln, 6 dias	↑resposta imune, melhora do balanço nitrogenado cumulativo nos pacientes com menor grau de severidade

Gln = glutamina; TMO = transplante de medula óssea; UTI = unidade de terapia intensiva

2.2.2 Arginina

A arginina é um aminoácido glicogênico, formado no fígado pelo ciclo da uréia. Tem carga positiva em pH neutro e possui uma das cadeias laterais mais longas, comparada aos outros aminoácidos. A arginina é usada por todos os tecidos, participando de importantes vias metabólicas. É necessária para crescimento máximo do tecido e balanço nitrogenado após uma injúria. Entretanto, ela não é considerada transportadora importante de nitrogênio inter-órgãos, apesar de conter quatro átomos de N₂. Por ser um intermediário no ciclo da uréia, exerce papel fundamental no metabolismo de N₂, sendo essencial à detoxificação da amônia e como suporte à síntese de óxido nítrico ⁽⁴⁾. O metabolismo da arginina, ilustrado na Figura 1, evidencia seu papel na formação do óxido nítrico e de aminoácidos.

Figura 1 - Metabolismo da Arginina



Fonte: Adaptado de Flynn, Meininger, Haynes et al. (17).

Abreviaturas: ADC, arginina descarboxilase; AGA, agmatinase; AGAT, arginina:glicina amidinotransferase; ASL, argininosuccinato liase; ASS, argininosuccinato sintase; AS, argininosuccinato; Asp, aspartato; BH_4 , (6R)-5,6,7,8-tetrahydro-L-biopterin; CP, carbamoilfosfato; CPS-I, carbamoilfosfato sintetase-I (amônia); DCAM, S-adenosilmetionina descarboxilada; Glu, glutamato; Gln, glutamina; GDH, glutamato desidrogenase; GA, guanidinoacetato; GMAT, guanidinoacetato N-metiltransferase; CK, creatina quinase; Cr-P, creatina-fosfato; α -KG, α -cetoglutarato; MTA, metiltioadenosina; NAG, N-acetilglutamato; NAGS, N-acetilglutamato sintase; NO, óxido nítrico; NOS, óxido nítrico sintase; OAT, ornitina aminotransferase; OCT, ornitina carbamoiltransferase; ODC, ornitina decarboxilase; PO, prolina oxidase; P5CD, pirrolina-5-carboxilato desidrogenase; P5CR, pirrolina-5-carboxilato redutase; P5CS, pirrolina-5-carboxilato sintase; SAM, S-adenosilmetionina; SAMD, S-adenosilmetionina descarboxilase, SAHC, S-adenosilhomocisteína; SPDS, spermidina sintase.

A deficiência de arginina pode resultar em hiperamonemia, concentração plasmática aumentada de glutamina, excreção aumentada de ácido orótico, desordens metabólicas, neurológicas, reprodutoras e no desenvolvimento, e imunossupressão. A arginina é classificada como um aminoácido condicionalmente essencial, sob condições hipermetabólicas, como trauma, extensa ressecção

intestinal e falência renal, quando suas concentrações sangüíneas estão diminuídas⁽¹⁷⁾. A arginina parece ser um aminoácido condicionalmente essencial também em pacientes severamente queimados^(18, 19). Em pacientes queimados, cujo catabolismo está elevado, há aumento na oxidação da arginina com síntese limitada “de novo”, a partir de seus precursores imediatos, como a citrulina e a ornitina.

A melhora dos níveis sangüíneos da arginina pode otimizar a retenção nitrogenada e promover função e reparo intestinais. Também tem sido mostrado que a melhora de seus níveis sangüíneos favorece a cicatrização de feridas e estimula a produção de vários hormônios, incluindo hormônio de crescimento, prolactina, insulina e glucagon. Dentre os efeitos imunomoduladores da arginina encontrados em estudos experimentais, podem ser citados: melhora da sobrevivência de animais sépticos e de animais com câncer, aumento do número de células T e da resposta de hipersensibilidade tardia de ratos atímicos, elevação da resposta blastogênica induzida por mitógenos de linfócitos tímicos e do sangue periférico, e diminuição da rejeição de enxertos em roedores⁽⁵⁾.

A arginina está envolvida na síntese protéica, na biossíntese de aminoácidos e seus derivados, no metabolismo da uréia e na produção de óxido nítrico, na síntese de fosfocreatina, além de ser um precursor do glutamato e da prolina. Estudos laboratoriais têm mostrado efeitos imunoestimuladores sobre várias funções dos linfócitos-T^(1, 20, 21). Em adição ao óxido nítrico, outros produtos do catabolismo da arginina, como ornitina, prolina, poliaminas, creatina e glutamato, podem também mediar os efeitos benéficos da arginina. Estudos nos últimos 25 anos têm estabelecido que os enterócitos possuem papel crucial na síntese de citrulina, o precursor imediato da arginina. Então, as concentrações plasmáticas da citrulina

podem ser marcador da massa e injúria intestinal. Também, mudanças nas concentrações plasmáticas de citrulina podem ser reflexo de mudanças na síntese intestinal de citrulina em neonatos e adultos ⁽⁴⁾.

O óxido nítrico tem efeito vasodilatador, um mediador da resposta imune, um neurotransmissor, um radical livre citotóxico e sinalizador molecular de amplo espectro. Sendo assim, o óxido nítrico participa de quase todas as funções orgânicas e celulares. Suas concentrações fisiológicas são essenciais para a regulação do tônus vascular e da hemodinâmica. Também estimula a angiogênese, que possui importante papel em eventos fisiológicos (por exemplo: cicatrização de feridas, remodelação vascular, ovulação e crescimento de placenta). Isso também ocorre em condições patológicas (por exemplo: crescimento tumoral, infarto do miocárdio e retinopatia diabética). O óxido nítrico inibe a adesão leucocitária, a agregação plaquetária, a geração de superóxido, a proliferação celular da musculatura lisa e a liberação de endotelina-1 (vasoconstritor). Então, o óxido nítrico é um fator vasodilatador, antiaterogênico, antiproliferativo e antitrombolítico ⁽¹⁷⁾. O óxido nítrico proporciona proteção aos tecidos após isquemia e reperfusão, diminuindo a lesão e o acúmulo de neutrófilos. Estudos demonstram que a arginina pode ser capaz de aumentar a síntese basal de óxido nítrico e, portanto, reduzir esta lesão.

No entanto, quando um excesso de óxido nítrico é produzido sob condições sépticas e inflamatórias, pode ocorrer hipotensão severa em animais e humanos ⁽¹⁷⁾. Dessa forma, em oposição aos efeitos benéficos da arginina, há dados objetivos indicando que grandes quantidades de arginina podem ser deletérias em situações nas quais a formação de óxido nítrico é exacerbada. Em um estudo realizado com

pacientes urêmicos recebendo nutrição parenteral total suplementada com 100 mg/dia de arginina, verificou-se melhora da disfunção do ciclo da uréia. Mas, de outro lado, houve elevação dos níveis de óxido nítrico e hipotensão nos pacientes (21).

Portanto, conclui-se que tanto a deficiência como o excesso na produção de óxido nítrico podem levar a disfunções de diversos órgãos e sistemas. Uma falha na síntese de óxido nítrico pela arginina pode resultar em anormalidades nos sistemas nervoso, muscular, circulatório, respiratório, digestivo, urinário, reprodutor, endócrino e imune (22, 23). Em contraste, a produção excessiva de óxido nítrico é destrutiva para as células e pode mediar a patogênese de doenças autoimunes, rejeição de enxerto e choque séptico (24). Dessa forma, não é aconselhado o uso de suplementação com doses elevadas de arginina em pacientes com infecções severas, desordens autoimunes ou inflamatórias e malignidade ativa (17). Portanto, o “equilíbrio ótimo” da produção de óxido nítrico parece ser crucial para a saúde e a sobrevivência de humanos e animais.

A ingestão de arginina na alimentação tem sido estimada em 5,4 g/dia. Devido à alta atividade da arginase na mucosa intestinal e ao sistema de transporte deste aminoácido para o fígado, aproximadamente 50% da arginina da dieta alcança a circulação sistêmica (17). Daly et al. (20) sugerem que a dose até 30 g/dia de L-arginina pode beneficiar pacientes cirúrgicos que estão em risco aumentado de infecção. Nesse estudo prospectivo e randomizado, foram avaliados os efeitos imunes e metabólicos da suplementação de L-arginina (25 g/dia, n=16), comparado a um grupo placebo isonitrogenado (43 g/dia de L-glicina, n=14), em 30 pacientes cirúrgicos. Estes dois grupos receberam suplementação de arginina por 7 dias após

a cirurgia, através de dieta enteral. O grupo que recebeu L-arginina apresentou retorno mais rápido da função normal dos linfócitos e média de balanço nitrogenado positivo ⁽²⁰⁾.

Muitos dos efeitos benéficos e deletérios da arginina, principalmente sobre o seu papel na regulação da síntese do óxido nítrico, foram gerados a partir de estudos *in vitro*. Estes, portanto, devem ser analisados com cautela quando extrapolados para animais ou seres humanos.

2.2.3 Ácidos Graxos n-3 e n-9

Os triglicerídeos são formados por uma molécula de glicerol e um a três ácidos graxos. Suas propriedades são determinadas pela proporção e estrutura química de seus ácidos graxos constituintes. Os triglicerídeos de cadeia longa (TCL) podem conter cadeias com 14, 16, 18, 20 ou 22 átomos de carbono com até três duplas ligações, contadas a partir do radical metil, nos carbonos 3 (n-3), 6 (n-6) e 9 (n-9). Os TCL fornecem os ácidos graxos essenciais e, dependendo do teor destes, podem interferir no sistema imune e no processo inflamatório.

Os triglicerídeos de cadeia média (TCM), de outro lado, são compostos por ácidos graxos saturados com cadeias formadas por 6, 8, 10 ou 12 átomos de carbono. São encontrados principalmente no óleo de coco ⁽²⁵⁾.

Durante o processo de digestão, pela ação da lipase pancreática, os TCL são hidrolisados em ácidos graxos livres e monoacilgliceróis, que posteriormente são absorvidos pelos enterócitos. Dentro da mucosa intestinal, os monoacilgliceróis e os ácidos graxos livres de cadeia longa são re-esterificados e incorporados nos

quilomicrons, que atingem a circulação sangüínea via sistema linfático. No plasma, os quilomicrons são hidrolisados pelas lipases em ácidos graxos e glicerol. No fígado, os ácidos graxos são metabolizados para produção de energia. Ao contrário dos TCL, os TCM são rapidamente hidrolisados pelo trato gastrintestinal. Com ácidos graxos de cadeia média, os TCM são curtos o suficiente para serem absorvidos diretamente pelo sangue portal, sem passar pelo sistema linfático. Dessa forma, os TCM podem alcançar a corrente sangüínea vinte minutos após a ingestão. Eles, então, são oxidados no fígado. As emulsões de TCM são clinicamente utilizadas em pacientes em estados catabólicos ou problemas de malabsorção ^(25, 26).

As recomendações de lipídeos em terapia nutricional enteral, com base nas necessidades calóricas totais do paciente, são de aproximadamente 30-40%, ou 1-1,5 g/kg de peso/dia em pacientes estáveis; 30%, ou 1 g/kg peso/dia, em pacientes graves.

Portanto, os ácidos graxos são cadeias de hidrocarbonos contendo grupo carboxila numa ponta da cadeia e um grupo metil em outra. Existem 24 ácidos graxos comuns que diferem entre si no comprimento da cadeia, no grau e na natureza de saturação. Muitos ácidos graxos possuem entre 4 e 22 carbonos, com 16 e 18 carbonos, ou são ácidos graxos de cadeia longa, sendo os mais prevalentes. No organismo, os ácidos graxos são parte importante dos fosfolipídeos nas membranas celulares. A classificação dos ácidos graxos é feita pelo número de carbono, pela posição da primeira dupla-ligação e pelo número de duplas-ligações. O local da primeira dupla-ligação, contando a partir do grupo metil, é designado pelo número ômega (ω - ou n-).

Sendo assim, os ácidos graxos saturados (AGS) são aqueles que não possuem duplas-ligações em sua cadeia e estão presentes em certos alimentos de origem vegetal e animal. Geralmente são sólidos à temperatura ambiente, à exceção do óleo de coco, que é altamente saturado e líquido à temperatura ambiente.

Quando a cadeia contém apenas uma dupla-ligação, são denominados ácidos graxos monoinsaturados (AGMI). O ácido oléico é o mais comum AGMI nos alimentos. O azeite de oliva, o óleo de canola, a manteiga de amendoim e as nozes são fontes concentradas de ácido oléico.

Os ácidos graxos polinsaturados (AGPI), por sua vez, contêm duas ou mais duplas-ligações. Há duas principais famílias de ácidos graxos polinsaturados: n-3 e n-6. Estas famílias de ácidos graxos têm funções bioquímicas muito diferentes. O ácido α -linolênico, juntamente com o ácido linoléico (n-6) são considerados ácidos graxos essenciais, pois não podem ser produzidos endogenamente, sendo oriundos apenas da dieta ⁽²⁶⁾. Os ácidos graxos polinsaturados (AGPI) n-3 e n-6 estão envolvidos na regulação do metabolismo lipídico e nos processos de transporte de lipídeos para os tecidos. São os principais componentes das membranas celulares, onde predomina o tipo n-6, com baixos níveis de n-3. Eles interferem na resposta imune, pois são substratos para síntese de eicosanóides, como prostaglandinas (PG), tromboxanos (TX) e leucotrienos (LT), hidroxiácidos e lipoxinas. O ácido araquidônico (AA) e o ácido eicosapentaenóico (EPA) são precursores da síntese dos eicosanóides ^(27, 28).

Embora vários AGPI estejam aptos a servir como precursores de eicosanóides, o AA é usualmente o principal substrato para sua síntese. Isto ocorre porque as membranas de muitas células contêm grandes quantidades de AA, se

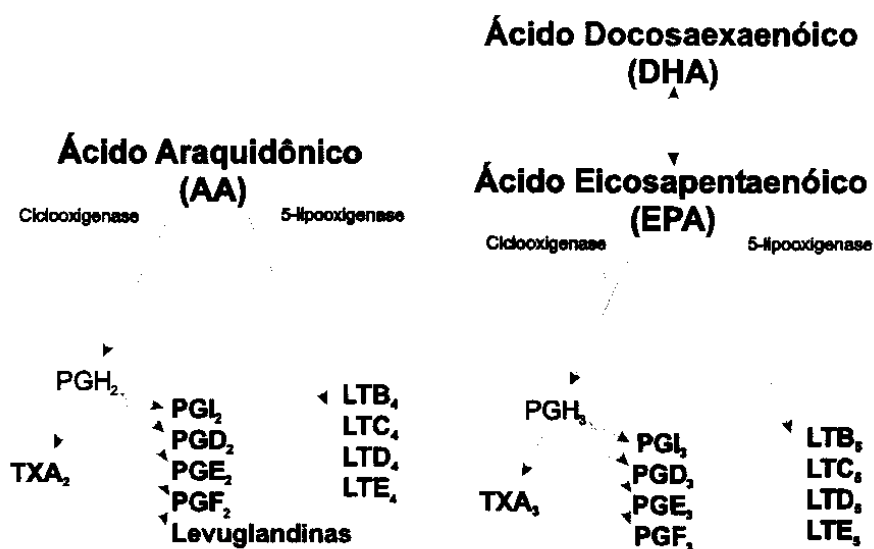
comparadas com outros precursores potenciais de eicosanóides (incluindo EPA). O AA nas membranas das células pode ser mobilizado por várias enzimas fosfolipases, mais notavelmente pela fosfolipase A2. O AA livre pode, subseqüentemente, atuar como substrato para as enzimas que sintetizam eicosanóides. O metabolismo do AA pelas enzimas ciclooxigenase (COX) elevam os níveis de PG da série 2 e TX (Figura 1). Há duas formas de COX: COX-1, que é uma enzima constitutiva, e COX-2, que é ativada em células inflamatórias como resultado da estimulação e é responsável pela produção marcadamente elevada de PG que ocorre sob ativação celular. O metabolismo do AA pela lipoxigenase-5 (LOX-5) eleva os níveis de LT da série 4 (LTB₄, LTC₄, LTD₄ e LTE₄)⁽²⁸⁾.

Os eicosanóides atuam como mediadores, modificam as respostas a outros mediadores (por exemplo: PGE₂ potencializa a dor causada por bradiquinina) e atuam como reguladores de outros processos, como agregação plaquetária, coagulação sangüínea, contração da musculatura lisa, quimioterapia de leucócitos, produção de citocinas inflamatórias e função imune. A PGE₂ tem um número de efeitos pró-inflamatórios, incluindo indução de febre, permeabilidade vascular aumentada e vasodilatação, aumento da dor e edema causados por outros agentes, como a bradiquinina e a histamina. A PGE₂ suprime a produção de TNF- α e interleucina-1 (IL-1) e, neste aspecto, é um antiinflamatório. A PGE₂ suprime a proliferação de linfócitos e a atividade das células NK (*natural killer*), e inibe a produção da interleucina-2 (IL-2) e TFN- γ . Neste aspecto, a PGE₂ é imunossupressora. A PGE₂ também promove a produção de IgE pelos linfócitos B; a IgE é mediadora de inflamação alérgica. TXA₂ promove agregação plaquetária, adesão de leucócitos e contração da musculatura lisa. LTB₄ aumenta a

permeabilidade vascular, eleva o fluxo sanguíneo local, é potente agente quimiotático para leucócitos, induz à liberação de enzimas lisossomais, eleva a geração de espécies oxigênio reativas e aumenta a produção de TNF- α , IL-1 e IL-6. Em todos esses aspectos, o LTB₄ é pró-inflamatório. Em condições inflamatórias, as taxas de produção de eicosanóides derivados do AA estão aumentadas e níveis elevados de certos eicosanóides são encontrados no sangue e nos tecidos de pacientes críticos e sépticos. Quando o óleo de peixe é fornecido, o EPA é incorporado aos fosfolípidos de membrana das células, no lugar do AA. Então, há menos AA disponível para a síntese de eicosanóides. Em adição, o EPA inibe a oxidação de AA pela COX. Em consequência, o óleo de peixe diminui a produção de prostaglandinas como PGE₂, de tromboxanos como TXA₂ e leucotrienos como LTB₄. Sendo assim, os AGPI n-3 podem potencialmente reduzir a agregação plaquetária, coagulação sanguínea, contração da musculatura lisa e quimiotaxia de leucócitos; e podem modular a produção de citocinas inflamatórias e função imune ⁽²⁸⁾.

Em adição à inibição do metabolismo do AA, o EPA atua como substrato para COX e LOX-5, formando derivados que possuem uma estrutura diferente daqueles produzidos pelo AA: PG e TX da série 3 e LT da série 5 (Figura 2). A supressão na produção de eicosanóides derivados do AA pelo EPA é acompanhada por uma elevação na produção de eicosanóides derivados de EPA. Os eicosanóides produzidos pelo EPA são considerados menos potentes biologicamente do que os análogos sintetizados pelo AA. A redução na geração de mediadores derivados do AA que ocorre pelo consumo de óleo de peixe tem levantado a idéia de que o óleo de peixe tem efeito anti-inflamatório que pode ser potencialmente benéfico para pacientes críticos e sépticos ⁽²⁸⁻³⁰⁾.

Figura 2 - Efeitos do ácido eicosapentaenóico e ácido araquidônico sobre mediadores inflamatórios



Fonte: Adaptado de Linder ⁽³¹⁾.

A ingestão alimentar de ácidos graxos essenciais está positivamente relacionada com as concentrações deles nos ésteres de colesterol e fosfolípidos no sangue. Os sintomas de deficiência do ácido linoléico são dermatite e crescimento insuficiente em crianças alimentadas com fórmulas sem lipídeo. A deficiência de ácidos graxos essenciais em crianças e adultos tem sido observada durante nutrição parenteral total sem lipídeo em longo prazo. Uma deficiência de ácido linolênico pode levar a alterações neurológicas, como fraqueza, incapacidade para caminhar, parestesia e piora da acuidade visual, que podem ser revertidas com reposição do ácido linolênico ⁽²⁶⁾.

A relação ótima de n-3 e n-6 nas emulsões lipídicas ainda não foi determinada para nenhum tipo de doença. A relação de 4:1 a 10:1 é sugerida por alguns autores ⁽³²⁾. Atualmente, as fórmulas disponíveis no mercado contêm a razão n-6 para n-3,

variando de 5,5:1 a 6,75:1. Para efeito imunomodulador, a recomendação é da relação 3:1 ou 2:1. Ou seja, menos ômega-6 para um maior teor de ômega-3.

Outras substâncias, como os nucleotídeos, os lipídeos estruturados, vitamina A e C, selênio, entre outros, também têm sido indicadas como imunonutrientes. Entretanto, esses nutrientes não entraram no objetivo do presente estudo.

2.3 Sepses Experimental

A sepse persiste como causa principal de mortalidade e morbidade em pacientes operados e nas vítimas de trauma, pois representa a falência e a disfunção de múltiplos órgãos ⁽³³⁾. Existem outros fatores que influenciam na alta prevalência de complicações e óbito na sepse, entre eles: o aumento de pacientes em uso de terapias imunossupressivas, elevação do número de pessoas cada vez mais idosas, uso indiscriminado de antibióticos, uso cada vez maior de meios invasivos de diagnóstico, monitorização e terapêutica ⁽³⁴⁾.

Desde 1970, houve pouca melhora nos índices de mortalidade devido à sepse. Isto pode ter ocorrido provavelmente em virtude da interpretação errônea de dados pré-clínicos e de estudos experimentais, que não mimetizam adequadamente a sepse humana. Este fato leva à falha no desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas, pois vários dos estudos, quando aplicados em seres humanos, não se traduzem em eficácia no tratamento ⁽³⁵⁾.

Existem vários modelos experimentais de desenvolvimento de sepse em ratos ^(34, 36-49), que serão, agora, descritos.

2.3.1 Infusão Endovenosa de Endotoxinas

Roedores, cães e gatos são resistentes à infusão de endotoxinas bacterianas, que são lipopolissacarídeos (LPS) e principais componentes presentes da parede celular de bactérias Gram negativas ⁽⁴²⁾. Há a necessidade de infusão de grande quantidade de LPS nestes animais para o desenvolvimento da sepse. Já em outros, como coelhos e carneiros, com pequenas doses é possível desenvolver quadro de falência cardiocirculatória acentuada e rápida. Nos carneiros, inclusive ocorre depressão miocárdica profunda, como nos seres humanos ⁽⁴²⁾. As principais críticas ao uso de LPS são: 1) existe a necessidade de doses elevadas nos ratos, que têm efeitos tóxicos para os animais, ao contrário dos seres humanos, que são sensíveis às pequenas doses; 2) as endotoxinas são liberadas por bactérias gram-negativas, mas as gram-positivas também desenvolvem quadros sépticos similares; 3) a administração de corticosteróides e anti-TNFa não reproduz os mesmos efeitos benéficos nos homens, como ocorre nos animais. Há um consenso geral entre os pesquisadores de que os LPS servem como modelo de choque endotóxico, mas não para sepse ⁽³³⁾.

2.3.2 Infusão Endovenosa de Bactérias Vivas

Outra maneira de desenvolver-se sepse experimental é com a infusão endovenosa de bactérias vivas. Assim como na infusão de LPS, esta prática pode

induzir à alterações graves no débito cardíaco e na perfusão tecidual em curto espaço de tempo. Este método tem a vantagem, em relação ao anterior, da possibilidade de utilização de bactérias tanto gram-negativas como gram-positivas. Entre elas, a *Escherichia coli* é a mais comumente utilizada ⁽⁴⁶⁾. Este modelo tem vantagem quando usado principalmente em grandes animais, com a possibilidade de testar equipamentos de monitorização, como em unidades de terapia intensiva ⁽³⁸⁾.

2.3.3 Ligadura e Perfuração do Ceco

A ligadura e a perfuração do ceco induzem ao quadro séptico em curto espaço de tempo, inclusive com relação direta entre o tempo de vida e o número de perfurações realizadas no intestino. O método reproduz o quadro séptico com flora bacteriana diversificada, como ocorre em humanos que desenvolvem quadros complicados de apendicite ou diverticulite agudas. Este talvez seja o método que representaria uma situação mais próxima da peritonite em seres humanos ⁽⁴⁴⁾.

2.3.4 Inoculação Intraperitoneal de Bactérias Fecais

A injeção de bactérias vivas intraperitoneais com flora bacteriana múltipla é outra forma de desenvolvimento de peritonite experimental. Estas bactérias podem ser obtidas de fezes de animais ou de seres humanos, com a produção de suspensão homogênea para injeção intraperitoneal. Se utilizadas as fezes dos

próprios animais, os resultados são desanimadores, pois estes parecem tolerar a sua própria flora fecal.

2.3.5 Inoculação Intraperitoneal de *Escherichia coli*

Ahrenholz e Simmons ⁽⁴⁰⁾, em 1980, mostraram mortalidade de 100% em ratos, 24 horas após receberem injeção intraperitoneal de *Escherichia coli* viáveis. Quando adicionaram a mesma quantidade de bactérias junto com coágulo sangüíneo bovino, levaram a formação de abscesso intraperitoneal, com mortalidade de 90% em 10 dias. Desta forma obteve-se um modelo experimental que simula um foco séptico, com liberação contínua e lenta de bactérias ou seus produtos na circulação, pelo retardo da absorção sistêmica e imediata das bactérias provocada pela presença de fibrina. A concentração de bactérias inoculadas no peritônio determina o tempo de sobrevida dos animais que desenvolvem peritonite. Sebben e cols. produziram peritonite através da inoculação de *Escherichia coli* intraperitoneal e avaliaram a incidência de infecção em telas de polipropileno colocadas extra-peritoneais em ratos, com todos os animais desenvolvendo peritonite ⁽⁴⁹⁾.

3 MÉTODO

3.1 Tipo de Estudo

Este estudo é randomizado, prospectivo e experimental.

3.2 População

Foram avaliados 30 ratos Wistar, machos adultos, sendo que 15 receberam dieta padrão (GP) e 15 receberam dieta imunomoduladora (GI). O estudo foi realizado em laboratório único, com o mesmo avaliador e com a mesma técnica.

3.3 Procedimentos

a) A coleta de dados foi realizada em ficha padronizada (em Anexo).

- b) Os ratos foram todos pesados em balança única e padronizada (balança digital C&f, nº. 046184, m=Máx-06 kg // Min-40 g // e=d=02 g // patrimônio da PUCPR).
- c) Trinta ratos foram selecionados, com peso aproximado de 275-300 g.
- d) Os ratos (n = 15 em cada grupo) foram aleatoriamente selecionados para receber dieta imunomoduladora (GI) ou dieta padrão normal (GP), durante sete dias. Dados utilizados para o cálculo da dieta:
- Calorias: um rato, desta idade, ingere aproximadamente 25-30 g de ração/dia. Cada 1.000 g de ração padrão para ratos, da marca NUVILAB CR1, registrada no Ministério da Agricultura e Reforma Agrária número PR 58033-00103, contém em torno de 2.900 kcal metabolizáveis. Portanto, cada rato ingere de 72,5 a 87 kcal/dia (média aproximada de 80 kcal/dia).
 - Os ratos receberam a mesma quantidade de calorias nas duas dietas, padrão normal (GP) e imunomoduladora (GI).
 - A diferença da dieta GI e GP foi somente nas quantidades de glutamina, que substituiu parte das proteínas totais, e de ômega-3, que substituiu parte do ômega-6. Permaneceram, portanto, as mesmas quantidades totais de proteínas e lipídeos em ambas as dietas (Tabela 2).
 - A densidade calórica da dieta foi de 2,0 kcal/ml, fornecendo um volume total no dia de 40 ml. O fracionamento foi de quatro vezes ao dia, de três em três horas, com 10 ml cada tomada. Horários: 8h, 11h, 14h e 17h.

- Os ratos foram alimentados através de gavagem: uma sonda de polietileno nº 8 FR do tipo uretral foi inserida através da cavidade oral pós-imobilização do animal nos momentos das refeições e, então, retirada.
 - A dieta foi administrada lentamente através de seringa com capacidade de 10 ml, conectada à sonda de polietileno.
- h) Após sete dias de alimentação, os ratos experimentaram condição de estresse produzida pela sepse. Para indução da sepse, foi desenvolvida peritonite por meio da inoculação de suspensão padrão de *Escherichia coli* $0,5 \times 10^8$ UFC/ml, fornecida pelo Laboratório de Microbiologia da PUCPR. Foram infundidos, via peritoneal, 0,8 ml desta solução, mediante punção da região do quadrante inferior direito com uso de agulha 13 x 4,5 G. Utilizou-se a bactéria *Escherichia coli*, ATCC 25922, LOTE 1184, FAB. Fev/2004 VAL Fev/2006. Imediatamente após a verificação do óbito, foi realizada laparotomia e coletado secreção peritoneal para cultura, sendo semeada em meio seletivo para bactérias gram-negativas, ágar Mac Conkey, no Laboratório de Microbiologia da PUCPR.
- i) Após os sete dias de alimentação via sonda e pós-indução da sepse, foi oferecida somente ração específica para ratos (*ad libidum*) e água.
- j) Avaliação da histopatológica pulmonar:
- Imediatamente após a morte do animal, foi medido o número médio de neutrófilos do pulmão, de acordo com a seguinte técnica: após fixação em formalina, amostras aleatórias de lobo pulmonar inferior foram processadas para confecção de blocos de

parafina. Cortes de quatro micrômetros de espessura foram corados pela técnica de hematoxilina-eosina, para estudo histológico e contagem do número de neutrófilos no interstício pulmonar. A leitura das lâminas foi realizada em campos microscópicos aleatórios e consecutivos. Em cada corte, obteve-se a contagem final de neutrófilos por campo, mediante a média aritmética dos valores relativos a 10 campos microscópicos com aumento de 400x.

- h) Os animais foram pesados no primeiro dia do estudo e no dia do término da dieta (antes da indução da peritonite), e logo após a morte, cuja eutanásia foi realizada por exsanguinação com o animal sedado.

Tabela 2 - Características e Formulação das Dietas

	Padrão Normal	Imunomoduladora
Calorias/ml	2,0	2,0
Distribuição calórica	Proteína: 25% Carboidratos: 55% Lipídeos: 20%	Proteína: 25% Carboidratos: 55% Lipídeos: 20%
Fonte de Proteínas	Caseinato de cálcio	Caseinato de cálcio + glutamina suplementar (160 mg/dia: 35 g/dia para homem de 70 kg: rato de 275 g ou 0,275 kg = ~0,14 g/dia)
Fonte de Carboidratos	Oligossacarídeos (polímeros de glicose)	Oligossacarídeos (polímeros de glicose)
Fonte de Lipídeos	Triglicerídeos de cadeia longa ômega-6 (óleo de soja) (100%)	Triglicerídeos de cadeia longa ômega-6 e ômega 3 (2:1) (óleo de soja + óleo de

		peixe)
Proteínas (g/dia)	5	4,85 + 0,15 de glutamina
Carboidratos (g/dia)	11	11
Lípídeos (g/dia)	1,8 de óleo de soja	1,2 de óleo de soja e 0,6 de óleo de peixe
Volume total	40 ml	40 ml

Tabela 3 - Resumo do Procedimento

Dia 0	Dia 1	Dia 7	Dia 8	Dia 9	Dias subseqüentes
• Coleta de sangue. • Peso inicial dos ratos.	• Início das dietas às 8h.	• Término das dietas às 17h. • Peso dos ratos.	• Coleta de sangue • Jejum	• Indução da sepse pela manhã. • Coleta de sangue após 12 horas da indução. • Oferecidas ração e água na gaiola.	• Coletas de sangue de 12 em 12 horas, até a morte. • Oferecidas ração e água na gaiola. • Peso na morte. • Análise de neutrófilos pulmonares.

3.4 Análise Estatística

A análise estatística descritiva foi realizada mediante média e desvio-padrão, e representada em tabelas e gráficos. Para comprovação do peso inicial e no momento da morte, foram utilizados os testes paramétricos "t de Student" para amostras independentes. Para comparar os grupos em relação ao número médio de

neutrófilos pulmonares, foi usada análise de covariância (ANCOVA) com a perda relativa de peso entre o início e o final (morte). Para esta análise, os dados de número de neutrófilos foram submetidos à transformação raiz quadrada. O nível de significância foi considerado 5% (p , 0,05).

4 RESULTADOS

Para todos os ratos, a peritonite foi comprovada por meio da semeadura em ágar Mac Conkey, fermentando a lactose presente no meio. Foi, assim, confirmada a presença da *E. coli*.

Aproximadamente 40 horas após a indução da peritonite, toda a população de ratos estudada evoluiu para óbito.

A análise dos neutrófilos após a morte, considerando as médias do número de neutrófilos de 10 campos do pulmão de cada rato, não apresentou diferença entre os grupos GP e GI ($12,5 \pm 3,4$ versus $10,2 \pm 3,1$ células/campo de grande aumento; $p=0,1287$) (Figura 3).

Quanto ao peso, o grupo que recebeu a dieta imunomoduladora (GI) não apresentou redução significativa do início ao final do período da dieta ($287,4 \pm 6,6$ versus $285,1 \pm 13,6$ g; $p=0,5$). Os resultados de peso estão demonstrados na Tabela 4 e na Figura 4. De outro lado, o grupo da dieta padrão (GP) apresentou perda significativa do peso ($287,4 \pm 6,6$ versus $270,3 \pm 16,9$ g; $p=0,001$). A perda relativa de peso do grupo GP do final da dieta até a morte foi de $0,5 \pm 4,4\%$. Houve diferença significativa ($p=0,01$) nos pesos no final da dieta, entre os dois grupos. A perda de peso relativa no período do final da dieta ao óbito também foi significativa entre os grupos GP e GI ($0,5 \pm 4,4$ versus $5,5 \pm 7,1$; $p=0,02$).

No GI, houve redução significativa no peso do final do período da dieta até o óbito ($285,1 \pm 13,6$ versus $268,9 \pm 5,8$ g; $p=0,0002$); perda de peso relativa de $5,48 \pm 7,13\%$. Para o GP, não houve redução significativa no peso do final do período da dieta até o óbito ($270,3 \pm 16,9$ versus $267,9 \pm 6,6$ g; $p=0,6$). Entretanto, não houve diferença significativa entre os dois grupos no peso no momento do óbito ($p=0,64$).

Quanto à sobrevida após a indução da peritonite, não houve diferença significativa nos tempos entre o GI e o GP ($p=0,56$). Para o GI, o tempo de sobrevida foi de $35,3 \pm 5,0$ horas. Para o GP, esse tempo foi de $34,2 \pm 5,1$ horas.

Ambas as dietas apresentaram boa tolerância e nenhuma alteração de trânsito intestinal foi observada durante todo o período do estudo (por exemplo: diarreia).

Foi observado que a ração colocada na gaiola, após a indução da peritonite, foi pouco ingerida em ambos os grupos do estudo.

Tabela 4 - Peso e Marcador Inflamatório entre os Grupos

		Dieta Padrão			Dieta Imunomoduladora		
Período	Início (todos)	Final da Dieta	Morte	p	Final da Dieta	Morte	p
N	30	15	15	-	15	15	-
Peso (g)	$287,4 \pm 6,6$	$270,3 \pm 16,9$	$267,9 \pm 6,6$	$0,001^*$ $0,6^{**}$	$285,1 \pm 13,6$	$268,9 \pm 5,8$	$0,5^*$ $0,0002^{**}$
Neutrófilos pulmonares (cel/campo)	-	-	$12,5 \pm 3,4$	-	-	$10,2 \pm 3,1$	NS

Média $\pm$ DP; *p entre início e final da dieta; **p entre final da dieta e morte

Figura 3 - Neutrófilos pulmonares após a morte, no grupo de estudo no grupo controle

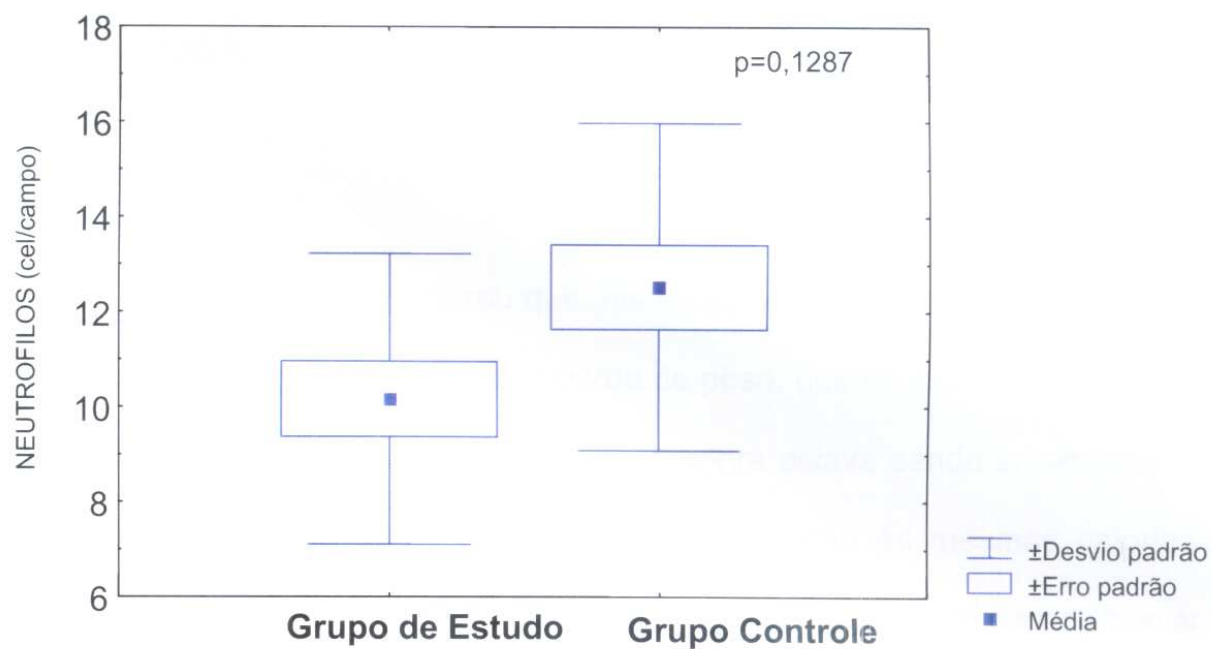
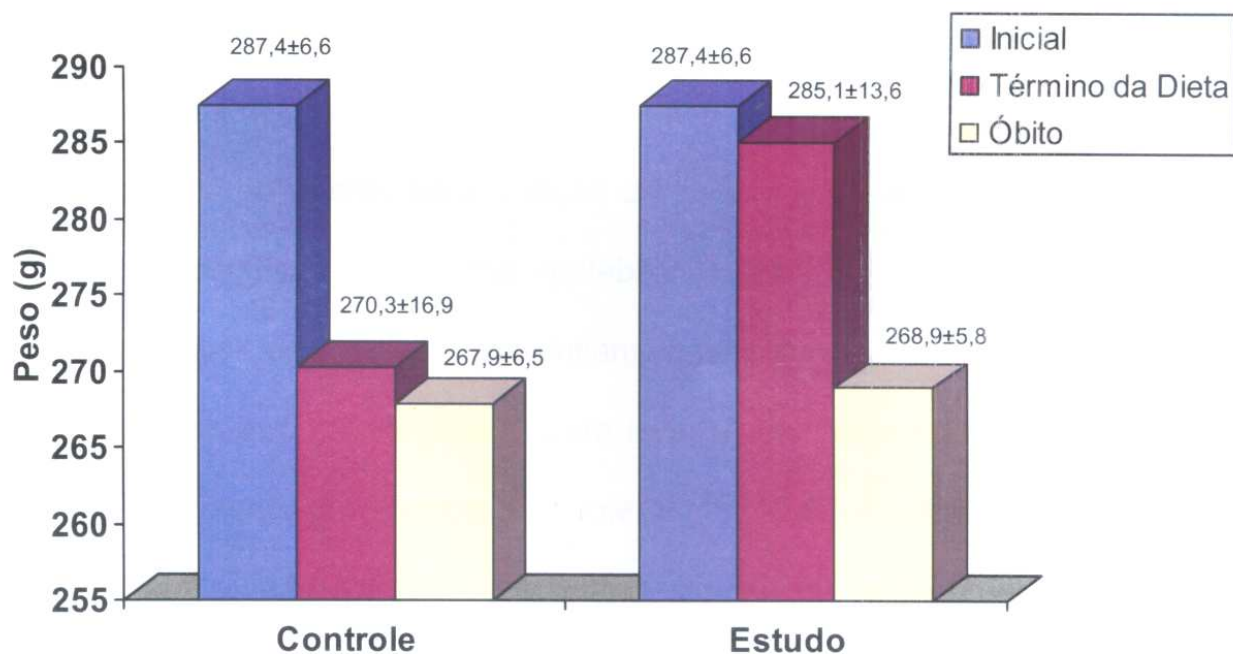


Figura 4 - Evolução de peso nos três momentos, no grupo controle e no grupo de estudo



$p < 0,001$ para o grupo controle do início ao término da dieta; $p = 0,01$ nos pesos no final da dieta, entre os dois grupos; $p = 0,0002$ para o grupo de estudo, do término da dieta até o óbito.

5 DISCUSSÃO

Este estudo demonstrou que, até o momento do insulto, o grupo com a dieta imunomoduladora não apresentou perda de peso, que foi significativa no grupo controle. Ou seja, enquanto a dieta imunomoduladora estava sendo administrada, o peso dos ratos deste grupo foi mantido, em comparação às mesmas calorias e porcentagens de nutrientes do controle. Portanto, o presente estudo parece apoiar a existência de um melhor anabolismo como resposta à imunomodulação proposta. Poderia-se dizer, com bases nos resultados de peso, que a fórmula imunomoduladora promoveu um efeito “otimizador” das calorias e demais nutrientes administrados. Este efeito foi, provavelmente, em consequência do melhor anabolismo e otimização das calorias e nutrientes ingeridos.

A redução do apetite para a ração *ad libitum*, após a indução da sepse, foi clara nesta pesquisa. Os efeitos metabólicos das citocinas e das proteínas plasmáticas envolvidas na resposta inflamatória pode ser a maior razão para o achado. Sabe-se que as citocinas podem levar ao aumento da lipólise, diminuição do apetite e aumento do catabolismo protéico ^(50, 51). A inflamação é uma resposta fisiológica, uma reação primária de defesa do organismo frente às agressões, como infecção, trauma, injúria tóxica e lesão ⁽⁵²⁾. O processo inflamatório envolve a ativação da resposta de fase aguda, que é caracterizada pelo aumento da atividade de citocinas pró-inflamatórias, como o TNF- α , IL-1, IL-6. Estas estimulam a síntese

hepática de mediadores de fase aguda positiva, como a proteína C reativa (PCR), a alfa-glicoproteína e o fibrinogênio, entre outros. Neste estudo, para avaliação do processo inflamatório, foram utilizados os neutrófilos pulmonares após a morte dos animais. Os neutrófilos são os tipos mais importantes e numerosos de leucócitos na reação de inflamação corporal. Eles constituem a defesa primária contra invasão microbiana. Em resposta aos organismos invasores, ocorre um aumento no número absoluto de neutrófilos (neutrofilia). No presente estudo, embora o número médio de neutrófilos tenha sido menor no grupo que recebeu a dieta imunomoduladora, essa diferença não foi significativa. Uma provável limitação pode ter sido o tamanho da amostragem. Por exemplo, através da análise estatística, poder-se-ia especular que, se mais 30 animais tivessem sido incluídos, o resultado teria tido tendência ou teria sido significativamente menor quanto à contagem de neutrófilos no grupo com dieta imunomoduladora, comparado ao grupo controle.

Várias fórmulas industrializadas usam o conceito de imunomodulação ou imunonutrição, variando nas quantidades e tipos de imunonutrientes. A determinação da fórmula ideal ou a melhor mistura de imunonutrientes para as diferentes populações permanece, ainda, como pergunta para pesquisa. A suplementação de glutamina via enteral tem sido extensivamente recomendada em condições de trauma/estresse ⁽⁵³⁻⁵⁵⁾. A suplementação de glutamina, tanto na forma livre como oligopeptídica, na nutrição enteral via gastrostomia de ratos com peritonite bacteriana induzida, mostrou maior altura, profundidade e número de mitoses das criptas do intestino delgado ⁽⁵⁶⁾. De forma similar, outro estudo em ratos com peritonite demonstrou maiores benefícios intestinais da nutrição parenteral suplementada com glutamina do que com aminoácidos de cadeia ramificada ⁽⁵⁷⁾. Um

estudo similar, com ratos em nutrição parenteral, mostrou que a suplementação de glutamina manteve a população de linfócitos no baço e melhorou os níveis de expressão das citocinas após peritonite séptica ⁽⁵⁸⁾. Também em ratos, a suplementação de glutamina na nutrição parenteral melhorou a resposta celular peritoneal e a função bactericida dos neutrófilos polimorfonucleares após peritonite química induzida ⁽⁵⁹⁾. Em outro estudo, agora em humanos com peritonite secundária ao tratamento cirúrgico ou clínico, a suplementação de glutamina em nutrição parenteral, mostrou melhorar a morbidade infecciosa, quando comparada a um grupo controle sem suplementação ⁽⁶⁰⁾. Mesmo assim, existem estudos mostrando que a suplementação de glutamina não melhorou o metabolismo protéico muscular de pacientes criticamente enfermos ⁽⁶¹⁾ ou as complicações infecciosas, o período febril e a terapia antimicrobiana ⁽⁶²⁾. Porém, é de consenso, que existem evidências suficientes para sustentar a recomendação do uso da glutamina em pacientes sépticos e críticos ⁽⁶³⁻⁶⁸⁾ e naqueles com proteólise intensa ^(69, 70). Esta é razão da glutamina ter sido selecionada para ser suplementada no presente estudo. Ela foi o único aminoácido que sofreu imunomodulação, com dose que simulou a recomendação máxima de suplementação para o ser humano (35 g).

Diferente da glutamina, a suplementação da arginina é controversa e, por isso, não foi modulada no estudo atual. Apesar do fato dela parecer muito interessante para a imunomodulação e cicatrização de feridas, as dietas enriquecidas com arginina não têm sido recomendadas para pacientes críticos. As discussões atuais mostram que dietas enriquecidas com grandes quantidades de arginina podem ser prejudiciais a pacientes hemodinamicamente instáveis e para aqueles apresentando insuficiência de múltiplos órgãos. Uma meta-análise de

Heyland et al ⁽⁷¹⁾ revelou que, em pacientes graves com sepse, a suplementação com arginina foi associada ao aumento da mortalidade.

Existem guias recomendando precaução com as dietas enriquecidas com imunonutrientes, considerando-se o risco atribuído, seu alto custo, e a necessidade de novos estudos controlados e randomizados ⁽⁷²⁾. Este tipo de recomendação, entretanto, pode ser muito generalista em se falando de imunonutrição. Isso porque existem muitas possibilidades, quantidades e combinações de nutrientes, assim como populações-alvo, para a imunomodulação. No presente estudo, por exemplo, a população-alvo era de ratos pré e pós sepse e, especificadamente, somente a glutamina e os ácidos graxos ômega-6 e ômega-3 foram modulados.

Quanto ao efeito imunomodulador, os ácidos graxos ômega-3 são anti-inflamatórios. Vários estudos, entretanto, fazem suplementação de ômega-3 em conjunto com várias modulações, como glutamina, arginina e nucleotídeos ⁽⁷²⁻⁷⁵⁾. Ou seja, poucos estudos mostram efeitos isolados desses ácidos graxos. Durante a sepse, a suplementação da nutrição parenteral com emulsão contendo óleo de peixe, comparado ao óleo de soja, prolongou a sobrevida e melhorou a função linfocítica de ratos ⁽⁷⁶⁾. Um estudo japonês recentemente avaliou a resposta inflamatória, a agregação plaquetária e a atividade de coagulação em situação pós-cirurgia imediata de câncer de esôfago ⁽⁷⁷⁾. Os indivíduos foram nutridos via enteral com dieta padrão ou rica em ômega-3. Os resultados mostraram níveis de interleucinas plasmáticas significativamente menores no grupo que recebeu a fórmula rica em ômega-3, assim como houve diminuição na agregação plaquetária e na atividade de coagulação. Outro estudo, em ratos com enterite induzida, investigou os efeitos da dieta rica em ômega-3 por 12 dias antes da indução do

insulto ⁽⁷⁸⁾. A dieta contendo somente ômega-6, diferente daquela rica em ômega-3, aumentou significativamente o dano da mucosa e os níveis de interleucinas. Portanto, no presente estudo, a modulação do ômega-3, assim como da glutamina, é respaldada por diversas outras investigações.

Embora no presente estudo tenha havido tendência à melhor sobrevida no grupo com dieta imunomoduladora, o resultado não foi significativo. De maneira similar, outra pesquisa mostrou que, após indução de peritonite bacteriana, os ratos alimentados com diferentes fórmulas contendo nutrientes imunomoduladores ou ração comum não apresentaram diferença na sobrevida ⁽⁷⁹⁾. Outro estudo, entretanto, demonstrou melhor sobrevida com a nutrição enteral suplementada com glutamina em ratos com peritonite ⁽⁸⁰⁾.

Uma intenção do presente estudo foi investigar se a modulação dos nutrientes especificados poderia resultar em “efeito residual”, ou seja, poderia ser preservado o resultado positivo por algum tempo após a descontinuação da terapia. Uma aplicação prática seria, por exemplo, a indicação dessa dieta antes do insulto, como uma operação, mesmo que o paciente não recebesse nenhuma alimentação nos dias posteriores. Isso não foi claramente confirmado pelos resultados obtidos. O efeito positivo no peso pré peritonite, que foi o achado mais expressivo, não foi preservado após a descontinuação da dieta. Ao final, não houve diferença na perda de peso e na sobrevida entre os grupos. Portanto, uma pergunta importante mantém-se: teria havido melhor resposta no peso, resposta inflamatória e sobrevida se os animais tivessem sido alimentados após o insulto?

Enfim, os resultados deste estudo trazem evidências de que a imunomodulação é segura. Pode trazer benefícios em situações de sepse,

6 CONCLUSÕES

A dieta imunomoduladora, com manipulação da glutamina e dos ácidos graxos ômega-6 e ômega-3, foi capaz de preservar o peso dos ratos, enquanto estava sendo administrada.

Não houve diferença no tempo de morte, após a indução da inflamação, entre os grupos que receberam dieta imunomoduladora ou padrão-normal.

Não houve efeito residual de nenhuma das dietas na mortalidade dos animais estudados.

Houve tendência para maior sobrevida no grupo com a dieta imunomoduladora.

O número médio de neutrófilos pulmonares, como marcador inflamatório, não apresentou diferença significativa entre os grupos.

REFERÊNCIAS

1. Mainous MR, Deitch EA: Nutrition and infection. Surg Clin North Am 74(3):659-76, 1994
2. Heyland DK, Novak F, Drover JW, et al: Should immunonutrition become routine in critically ill patients? A systematic review of the evidence. JAMA 286(8):944-53, 2001
3. Neu J, Bernstein H: Update on host defense and immunonutrients. Clin Perinatol 29(1):41-64, 2002
4. Duarte ACG: Semiologia Imunológica Nutricional. 1 ed. Rio de Janeiro, Axcel Books, 2003
5. Waitzberg DL, Lotierzo P, Duarte AJS, et al: Imunonutrição, in: Waitzberg, DL, editor. Nutrição Oral, Enteral e Parenteral na Prática Clínica. 3 ed. São Paulo: Atheneu; 2000. p. 1511 - 1538
6. Furst P: Substratos em Nutrição Parenteral, in: Waitzberg, DL, editor. Nutrição Oral, Enteral e Parenteral na Prática Clínica. 3 ed. São Paulo: Atheneu; 2000. p. 789 - 826
7. Wolinsky I, Williams L: Nutrition in pharmacy practice. Washington, D. C., American Pharmaceutical Association, 2002
8. Van der Hulst RR, van Kreel BK, von Meyenfeldt MF, et al: Glutamine and the preservation of gut integrity. Lancet 341(8857):1363-5, 1993
9. Tremel H, Kienle B, Weilemann LS, et al: Glutamine dipeptide-supplemented parenteral nutrition maintains intestinal function in the critically ill. Gastroenterology 107(6):1595-601, 1994
10. Huang Y, Shao XM, Neu J: Immunonutrients and neonates. Eur J Pediatr 162(3):122-8, 2003
11. Lacey JM, Crouch JB, Benfell K, et al: The effects of glutamine-supplemented parenteral nutrition in premature infants. JPEN J Parenter Enteral Nutr 20(1):74-80, 1996

REFERÊNCIAS

1. Mainous MR, Deitch EA: Nutrition and infection. Surg Clin North Am 74(3):659-76, 1994
2. Heyland DK, Novak F, Drover JW, et al: Should immunonutrition become routine in critically ill patients? A systematic review of the evidence. JAMA 286(8):944-53, 2001
3. Neu J, Bernstein H: Update on host defense and immunonutrients. Clin Perinatol 29(1):41-64, 2002
4. Duarte ACG: Semiologia Imunológica Nutricional. 1 ed. Rio de Janeiro, Axcel Books, 2003
5. Waitzberg DL, Lotierzo P, Duarte AJS, et al: Imunonutrição, in: Waitzberg, DL, editor. Nutrição Oral, Enteral e Parenteral na Prática Clínica. 3 ed. São Paulo: Atheneu; 2000. p. 1511 - 1538
6. Furst P: Substratos em Nutrição Parenteral, in: Waitzberg, DL, editor. Nutrição Oral, Enteral e Parenteral na Prática Clínica. 3 ed. São Paulo: Atheneu; 2000. p. 789 - 826
7. Wolinsky I, Williams L: Nutrition in pharmacy practice. Washington, D. C., American Pharmaceutical Association, 2002
8. Van der Hulst RR, van Kreel BK, von Meyenfeldt MF, et al: Glutamine and the preservation of gut integrity. Lancet 341(8857):1363-5, 1993
9. Tremel H, Kienle B, Weilemann LS, et al: Glutamine dipeptide-supplemented parenteral nutrition maintains intestinal function in the critically ill. Gastroenterology 107(6):1595-601, 1994
10. Huang Y, Shao XM, Neu J: Immunonutrients and neonates. Eur J Pediatr 162(3):122-8, 2003
11. Lacey JM, Crouch JB, Benfell K, et al: The effects of glutamine-supplemented parenteral nutrition in premature infants. JPEN J Parenter Enteral Nutr 20(1):74-80, 1996

12. Wilmore DW: The effect of glutamine supplementation in patients following elective surgery and accidental injury. *J Nutr* 131(9 Suppl):2543S-9S; discussion 2550S-1S, 2001
13. Lin MT, Kung SP, Yeh SL, et al: The effect of glutamine-supplemented total parenteral nutrition on nitrogen economy depends on severity of diseases in surgical patients. *Clin Nutr* 21(3):213-8, 2002
14. Ziegler TR, Young LS, Benfell K, et al: Clinical and metabolic efficacy of glutamine-supplemented parenteral nutrition after bone marrow transplantation. A randomized, double-blind, controlled study. *Ann Intern Med* 116(10):821-8, 1992
15. Furst P, Stehle P: [Glutamine supplemented nutrition in clinical practice--use of glutamine-containing dipeptides]. *Infusionsther Transfusionsmed* 22(5):317-24, 1995
16. Mertes N, Schulzki C, Goeters C, et al: Cost containment through L-alanyl-L-glutamine supplemented total parenteral nutrition after major abdominal surgery: a prospective randomized double-blind controlled study. *Clin Nutr* 19(6):395-401, 2000
17. Flynn NE, Meininger CJ, Haynes TE, et al: The metabolic basis of arginine nutrition and pharmacotherapy. *Biomed Pharmacother* 56(9):427-38, 2002
18. Yu YM, Ryan CM, Burke JF, et al: Relations among arginine, citrulline, ornithine, and leucine kinetics in adult burn patients. *Am J Clin Nutr* 62(5):960-8, 1995
19. Yu YM, Ryan CM, Castillo L, et al: Arginine and ornithine kinetics in severely burned patients: increased rate of arginine disposal. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 280(3):E509-17, 2001
20. Daly JM, Reynolds J, Thom A, et al: Immune and metabolic effects of arginine in the surgical patient. *Ann Surg* 208(4):512-23, 1988
21. Matsushita Y, Yokoyama K, Tagami T, et al: Effect of arginine administration in patients with total parenteral nutrition and chronic renal failure. *Nephron* 83(2):165-6, 1999
22. Wu G, Meininger CJ, Knabe DA, et al: Arginine nutrition in development, health and disease. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 3(1):59-66, 2000
23. Cooke JP, Dzau VJ: Nitric oxide synthase: role in the genesis of vascular disease. *Annu Rev Med* 48:489-509, 1997

24. Cook HT, Cattell V: Role of nitric oxide in immune-mediated diseases. *Clin Sci* 91:375-384, 1996
25. Waitzberg DL, Borges VC: Gorduras, in: Waitzberg, DL, editor. *Nutrição oral, enteral e parenteral na prática clínica*. 3 ed. São Paulo: Atheneu; 2000. p. 55 -76
26. Krummel D: Lipids, in: Mahan, LK, Escott-Stump, S, editors: *Krause's food, nutrition and diet therapy*. 9 ed. Philadelphia: W.B. Saunders; 1996. p. 49 - 62
27. Holman RT: The slow discovery of the importance of omega 3 essential fatty acids in human health. *J Nutr* 128(2 Suppl):427S-433S, 1998
28. Calder PC: Long-chain n-3 fatty acids and inflammation: potential application in surgical and trauma patients. *Braz J Med Biol Res* 36(4):433-46, 2003
29. Tashiro T: N-3 polyunsaturated fatty acids in pharmaconutrition and immunonutrition. *J Gastroenterol* 35 Suppl 12:24, 2000
30. Morlion BJ, Torwesten E, Lessire H, et al: The effect of parenteral fish oil on leukocyte membrane fatty acid composition and leukotriene-synthesizing capacity in patients with postoperative trauma. *Metabolism* 45(10):1208-13, 1996
31. Linder MC: *Nutritional Biochemistry and Metabolism with Clinical Applications*. 2 ed. New York, Elsevier, 1991
32. Neuringer M, Anderson GJ, Connor WE: The essentiality of n-3 fatty acids for the development and function of the retina and brain. *Annu Rev Nutr* 8:517-41, 1988
33. Riedemann NC, Guo RF, Ward PA: The enigma of sepsis. *J Clin Invest* 112(4):460-7, 2003
34. Angus DC, Linde-Zwirble WT, Lidicker J, et al: Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. *Crit Care Med* 29(7):1303-10, 2001
35. Piper RD, Cook DJ, Bone RC, et al: Introducing Critical Appraisal to studies of animal models investigating novel therapies in sepsis. *Crit Care Med* 24(12):2059-70, 1996
36. Opal SM, Cohen J: Clinical gram-positive sepsis: does it fundamentally differ from gram-negative bacterial sepsis? *Crit Care Med* 27(8):1608-16, 1999
37. Ebong S, Call D, Nemzek J, et al: Immunopathologic alterations in murine models of sepsis of increasing severity. *Infect Immun* 67(12):6603-10, 1999

38. Silverstein R, Wood JG, Xue Q, et al: Differential host inflammatory responses to viable versus antibiotic-killed bacteria in experimental microbial sepsis. *Infect Immun* 68(4):2301-8, 2000
39. Stamme C, Bundschuh DS, Hartung T, et al: Temporal sequence of pulmonary and systemic inflammatory responses to graded polymicrobial peritonitis in mice. *Infect Immun* 67(11):5642-50, 1999
40. Ahrenholz DH, Simmons RL: Fibrin in peritonitis. I. Beneficial and adverse effects of fibrin in experimental *E. coli* peritonitis. *Surgery* 88(1):41-7, 1980
41. Fink MP, MacVittie TJ, Casey LC: Inhibition of prostaglandin synthesis restores normal hemodynamics in canine hyperdynamic sepsis. *Ann Surg* 200(5):619-26, 1984
42. Fink MP, Heard SO: Laboratory models of sepsis and septic shock. *J Surg Res* 49(2):186-96, 1990
43. Natanson C, Fink MP, Ballantyne HK, et al: Gram-negative bacteremia produces both severe systolic and diastolic cardiac dysfunction in a canine model that simulates human septic shock. *J Clin Invest* 78(1):259-70, 1986
44. Wichterman KA, Baue AE, Chaudry IH: Sepsis and septic shock--a review of laboratory models and a proposal. *J Surg Res* 29(2):189-201, 1980
45. Parker SJ, Watkins PE: Experimental models of gram-negative sepsis. *Br J Surg* 88(1):22-30, 2001
46. Hardaway RM, Williams CH, Sun Y: A new approach to the treatment of experimental septic shock. *J Surg Res* 61(2):311-6, 1996
47. Hinshaw LB: Sepsis/septic shock: participation of the microcirculation: an abbreviated review. *Crit Care Med* 24(6):1072-8, 1996
48. Freise H, Bruckner UB, Spiegel HU: Animal models of sepsis. *J Invest Surg* 14(4):195-212, 2001
49. Sebben GA, Rocha SL, Von Bahten LC, et al: Infection on the meshes implantation area in the abdominal wall of rats with induced bacterial peritonitis. *Acta Cir Bras* 21(3):155-160, 2006
50. Biolo G, Toigo G, Ciocchi B, et al: Metabolic response to injury and sepsis: changes in protein metabolism. *Nutrition* 13(9 Suppl):52S-57S, 1997

51. Wischmeyer PE: Clinical applications of L-glutamine: past, present, and future. *Nutr Clin Pract* 18(5):377-85, 2003
52. Weissman C: Nutrition in the intensive care unit. *Crit Care* 17:67-75, 1999
53. Sacks GS: The data in support of glutamine supplementation. *Nutr Clin Pract* 18(5):386-90, 2003
54. Buchman A: The role of glutamine: counterpoint. *Nutr Clin Pract* 18(5):391-6, 2003
55. Gore DC, Wolfe RR: Glutamine supplementation fails to affect muscle protein kinetics in critically ill patients. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 26(6):342-9; discussion 349-50, 2002
56. Furukawa S, Saito H, Inaba T, et al: Glutamine-enriched enteral diet enhances bacterial clearance in protected bacterial peritonitis, regardless of glutamine form. *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition* 21(4):183-184, 1997
57. Naka S, Saito H, Hashiguchi Y, et al: Alanylglutamine-enriched total parenteral nutrition improves protein metabolism more than branched chain amino acid-enriched total parenteral nutrition in protracted peritonitis. *J Trauma* 42(2):343-344, 1997
58. Yeh SL, Lai YN, Shang HF, et al: Effects of glutamine supplementation on splenocyte cytokine mRNA expression in rats with septic peritonitis. *World J Gastroenterol* 11(12):1742-1746, 2005
59. Ikeda S, Kudsk KA, Le T, et al: Glutamine improves impaired cellular exudation and polymorphonuclear neutrophil phagocytosis induced by total parenteral nutrition after glycogen-induced murine peritonitis. *Shock* 19(1):50-54, 2003
60. Fuentes-Orozco C, Anaya-Prado R, Gonzales-Ojeda A, et al: L-alanyl-L-glutamine-supplemented parenteral nutrition improves infectious morbidity in secondary peritonitis. *Clin Nutr* 23(1):13-21, 2004
61. Guidelines for the use of parenteral and enteral nutrition in adult and pediatric patients. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 26(1 Suppl):1SA-138SA, 2002
62. Hall JC, Dobb G, Hall J, et al: A prospective randomized trial of enteral glutamine in critical illness. *Intensive Care Med*. 29(10):1710-1716, 2003

63. Heyland DK, Samis A: Does immunonutrition in patients with sepsis do more harm than good? *Intensive Care Med* 29(5):669-71, 2003
64. Singleton KD, Beckev VE, Wischmeyer PE: Glutamine prevents activation of NK-kappaB and stress kinase pathways, attenuates inflammatory cytokine release, and prevents acute respiratory distress syndrome (ARDS) following sepsis. *Shock* 24(6):583-589, 2005
65. Yeh CL, Hsu CS, Yeh SL, et al: Dietary glutamine supplementation modulates Th1/Th2 cytokine and interleukin-6 expressions in septic mice. *Cytokine* 31(5):329-334, 2005
66. Singleton KD, Serkova N, Beckev VE, et al: Glutamine attenuates lung injury and improves survival after sepsis: role of enhanced heat shock protein expression. *Crit Care Med* 33(6):1206-1213, 2005
67. Griffiths RD, Allen KD, Andrews FJ, et al: Infection, multiple organ failure, and survival in the intensive care unit: influence of glutamine-supplemented parenteral nutrition on acquired infection. *Nutrition* 18(7-8):546-552, 2002
68. Andrews FJ, Griffiths RD: Glutamine: essential for immune nutrition in the critically ill. *Br J Nutr* 87 Suppl 1:S3-S8, 2002
69. Kalhan SC, Parimi PS, Gruca LL, et al: Glutamine supplement with parenteral nutrition decreases whole body proteolysis in low birth weight infants. *J Pediatr* 146(5):642-647, 2005
70. des Robert C, Le Bacquer O, Piloquet H, et al: Acute effects of intravenous glutamine supplementation on protein metabolism in very low birth weight infants: a stable isotope study. *Pediatr Res* 51(1):87-93, 2002
71. Heyland DK, Dhaliwal R, Drover JW, et al: Canadian clinical practice guidelines for nutrition support in mechanically ventilated, critically ill adult patients. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 27(5):355-73, 2003
72. Choudhry MA, Haque F, Khan M, et al: Enteral nutritional supplementation prevents mesenteric lymph node T-cell suppression in burn injury. *Crit Care Med* 31(6):1764-70, 2003
73. Grimble RF: Immunonutrition. *Curr Opin Gastroenterol* 21(2):216-22, 2005
74. Gianotti L, Braga M, Fortis C, et al: A prospective, randomized clinical trial on perioperative feeding with an arginine, omega-3 fatty acid, and RNA enriched enteral

diet: effect on host response and nutritional status. JPEN J Parenter Enteral Nutr 23:314-320, 1999

75. Saffle JR, Wiebke G, Jennings K, et al: Randomized trial of immune-enhancing enteral nutrition in burn patients. J Trauma 42(5):793-800, 1997

76. Lanza-Jacoby S, Flynn JT, Miller S: Parenteral supplementation with a fish-oil emulsion prolongs survival and improves rat lymphocyte function during sepsis. Nutrition 17(2):112-116, 2001

77. Aiko S, Yoshizumi Y, Tsuwano S, et al: The effects of immediate enteral feeding with a formula containing high levels of omega-3 fatty acids in patients after surgery for esophageal cancer. JPEN J Parenter Enteral Nutr 29(3):141-7, 2005

78. Andoh A, Tsujikawa T, Ishizuka I, et al: N-3 fatty acid-rich diet prevents early response of interleukin-6 elevation in trinitrobenzene sulfonic acid-induced enteritis. Int J Mol Med 12(5):721-5, 2003

79. Grant AP, Grant JP, Snyder PJ, et al: Effects of enteral feeding products on survival from Escherichia coli peritonitis. J Trauma 37(5):778-785, 1994

80. Naka S, Saito H, Hashiguchi Y, et al: Alanyl-glutamine-supplemented total parenteral nutrition improves survival and protein metabolism in rat protracted bacterial peritonitis model. JPEN J Parenter Enteral Nutr 20(6):417-423, 1996

APÊNDICES

APÊNDICE 2 - Cálculo das Dietas para Um e Quinze Ratos*

	Padrão Normal		Imunomoduladora	
	1 rato	17 ratos*	1 rato	17 ratos*
Proteínas (g/dia)	5 g	85 g	4,85 g + 0,15 g de glutamina	82,5 g de caseinato + 2,6 g de glutamina
Carboidratos (g/dia)	11 g	187 g	11 g	187 g
Lípídeos (g/dia)	1,8 g de óleo de soja	31 g de óleo de soja	1,2 g de óleo de soja + 0,6 g de óleo de peixe	20 g de óleo de soja + 11 g + de óleo de peixe
Volume sólido	17,8 g	302,6 g	17,8 g	302,6 g
Água	22,2 ml	377,4 ml	22,2 ml	377,4 ml
Volume total	40 ml	680 ml	40 ml	680 ml

Volume medido da extensão da sonda: 2,5 ml

*Volume de 2 ratos (total de 17) para considerar perdas e dificuldades de medição.

APÊNDICE 3 - Cronograma do Projeto

Período (2005)	Atividade
4ª semana de fevereiro	➤ Aquisição dos módulos de nutrientes para preparo das dietas ➤ Treinamento de pessoal e logística para o preparo das dietas ➤ Aquisição e pesagem (seleção) dos ratos
1ª e 2ª semanas de março	➤ Coleta de amostra inicial de sangue de 10 ratos e envio para o laboratório ➤ Administração da dieta normal x 7 dias ➤ Indução da inflamação ➤ Coleta de amostra final de sangue de 10 ratos e envio das amostras para o laboratório ➤ Início da planilha dos dados de resultados ➤ Revisão do texto de Introdução do artigo científico
3ª e 4ª semanas de março	➤ Coleta de amostra inicial de sangue de mais 10 ratos e envio para o laboratório ➤ Administração da dieta normal x 7 dias ➤ Indução da inflamação ➤ Coleta de amostra final de sangue dos 10 ratos e envio das amostras para o laboratório ➤ Atualização da planilha dos resultados ➤ Revisão do texto de Materiais e Métodos do artigo científico
1ª e 2ª semanas de abril	➤ Coleta de amostra inicial de sangue de mais 10 ratos e envio para o laboratório ➤ Administração da dieta imunomoduladora x 7 dias ➤ Indução da inflamação

	➤ Coleta de amostra final de sangue dos 10 ratos e envio das amostras para o laboratório ➤ Atualização da planilha dos resultados ➤ Atualização de referências bibliográficas sobre o assunto
3ª e 4ª semanas de abril	➤ Coleta de amostra inicial de sangue de mais 10 ratos e envio para o laboratório ➤ Administração da dieta imunomoduladora x 7 dias ➤ Indução da inflamação ➤ Coleta de amostra final de sangue dos 10 ratos e envio das amostras para o laboratório ➤ Análise de neutrófilos pulmonares após a morte ➤ Finalização da planilha dos resultados e envio para análise estatística
1ª semana de maio	➤ Redação dos resultados
2ª e 3ª semanas de maio	➤ Redação da Discussão, Conclusão e Resumo do estudo (término do artigo científico)

APÊNDICE 4 - Orçamento do Projeto

Material	Gênero	Quantidade	Valor (R\$)
Material de consumo	Ratos	40	
	Dieta padrão	12 ml x 7 dias x 20 ratos (1680 ml)	250,00
	Dieta imunomoduladora	12 ml x 7 dias x 20 ratos (1680 ml)	500,00
	Folha A4	1.000 folhas	30,00
	Cartucho impressora	1 unidade	70,00
	Encadernação	3 unidades	25,00
Material permanente - Exames laboratoriais	Proteína C reativa	80 testes	
	Alfa-glicoproteína	80 testes	
	Neutrófilos pulmonares	30 testes de 10 campos em cada rato	
Equipamentos			
TOTAL			

APÊNDICE 5 – Documentação da peritonite

Figura 5 – Peritonite experimental 1

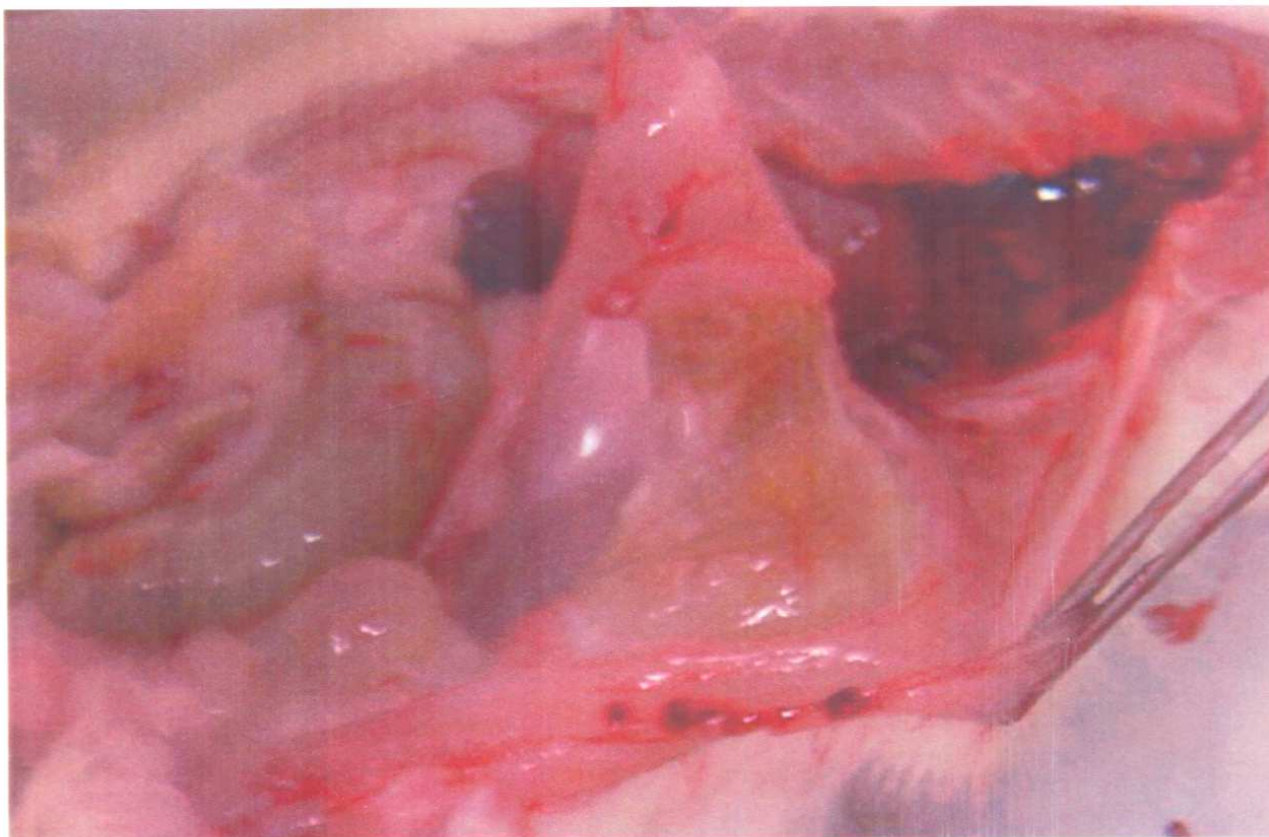


Figura 6 – Peritonite experimental 2

