

MIRELLE LOMAR VIANA

**ARGININA NO PROCESSO DE TRANSLOCAÇÃO
BACTERIANA: PERMEABILIDADE INTESTINAL,
VIAS DE AÇÃO E RESPOSTA IMUNOLÓGICA NA
OBSTRUÇÃO INTESTINAL INDUZIDA EM
CAMUNDONGOS**

Faculdade de Farmácia da UFMG

Belo Horizonte-MG

2010

MIRELLE LOMAR VIANA

ARGININA NO PROCESSO DE TRANSLOCAÇÃO BACTERIANA: PERMEABILIDADE INTESTINAL, VIAS DE AÇÃO E RESPOSTA IMUNOLÓGICA NA OBSTRUÇÃO INTESTINAL INDUZIDA EM CAMUNDONGOS

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do grau de Doutor em Ciência de Alimentos

Orientador: Prof. Dr. Valbert Nascimento Cardoso

Co-Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria Isabel Toulson
Davisson Correia

Faculdade de Farmácia da UFMG
Belo Horizonte, MG
2010

Dedico este trabalho aos meus pais e ao meu namorado Alexandre que estiveram comigo durante todo este trabalho, em momentos de alegria e de cansaço.

AGRADECIMENTOS

A Deus por me fortalecer e iluminar até mesmo quando eu achei que não seria capaz;

Ao meu orientador, Dr. Valbert Nascimento Cardoso, pesquisador em essência, por sua confiança no meu trabalho, entusiasmo com a pesquisa, paciência e dedicação em ver e rever resultados, sugerir soluções, estimular parcerias e por fornecer toda a estrutura para que este trabalho pudesse ser realizado;

À minha co orientadora, Dra. Maria Isabel Toulson Davidson Correia, grande pesquisadora e incentivadora do trabalho, que com seus conhecimentos teóricos e práticos, contribuiu de maneira única para o sucesso da pesquisa e deu grande projeção internacional ao trabalho e ao grupo de pesquisa;

Ao professor Dr. Jacques Robert Nicoli pela atenção e colaboração ativa, por suas sugestões pertinentes e muito válidas e disponibilização do seu laboratório para a execução da dosagem de slgA;

Ao aluno de pós doutorado, Dr. Flaviano dos Santos Martins, pela simplicidade, ajuda e orientações na dosagem de slgA;

À professora Dra Rosa Maria Esteves Arantes pelas sugestões preciosas e dedicação nas análises histológicas;

Ao professor Dr. José Augusto Nogueira por sua orientação nas dosagens das citocinas e por disponibilizar o seu laboratório para que este experimento pudesse ser realizado;

Ao professor Dr. Roberto Gonçalves Junqueira pelo apoio nas análises estatísticas;

À professora do laboratório de Radioisótopos, Dra Simone Odília Diniz, pela eficiência em providenciar os materiais necessários ao desenvolvimento da pesquisa e organização, o que torna o laboratório um ambiente agradável e seguro para trabalhar;

Ao professor Dr. Tasso Moraes e Santos por gentilmente disponibilizar equipamentos do seu laboratório;

Às companheiras de doutorado e amigas de vida, Rosana das Graças Carvalho dos Santos, Simone de Vasconcelos Generoso e Iara Pacífico Quirino, pela ajuda nos experimentos, nas discussões teóricas, nos artigos e pelas longas conversas e risos que tornaram o doutorado e a minha vida em Belo Horizonte ainda mais agradável;

A todos os amigos do laboratório de Radioisótopos, e em especial aos doutorandos Luciene Mota e André Luis Branco de Barros, pela amizade, apoio, companheirismo e ajuda de sempre na elaboração dos experimentos;

Aos funcionários do Biotério da FAFAR/UFMG Adelaide e Batista pela atenção e simpatia;

A todos os colegas de mestrado e doutorado em Ciências de Alimentos. Cada um de vocês colaborou de maneira importante para o meu processo de aprendizagem;

Aos meus pais Vera e Geraldo, pelo exemplo, apoio, incentivo e amor incondicional e aos meus irmãos Caroline e Fabricio, por estarem sempre na torcida, pela alegria e carinho de sempre na minha chegada a cada viagem;

Ao meu namorado Alexandre, que sabe tudo o que representa para mim. Pelo carinho, paciência e apoio indescritíveis em todos os momentos desta trajetória;

Às colegas de trabalho do Centro Universitário São Camilo – ES, em especial, Érica, Ana Paula, Lyvia, Wânia, Vivianne e Amanda, pelo apoio, torcida e pensamento positivo;

À AJINOMOTO por fornecer a arginina;

Ao CNPQ pelo apoio financeiro;

A todos que, de uma maneira ou de outra, contribuíram para a realização deste trabalho, o meu MUITO OBRIGADA!

*“A mente que se abre a uma nova idéia jamais
voltará ao seu tamanho original.”*

Albert Einstein

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	9
LISTA DE FIGURAS	10
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	11
RESUMO.....	13
ABSTRACT	14
1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO DA LITERATURA	17
2.1 ARGININA.....	17
2.1.1 Aspectos gerais.....	17
2.1.2 Metabolismo.....	18
2.1.2.1 Síntese endógena.....	18
2.1.2.2 Absorção	19
2.1.3 Vias e produtos do catabolismo da arginina.....	21
2.1.3.1 Arginase – síntese de poliaminas	21
2.1.3.2 Óxido nítrico sintase – produção do óxido nítrico	22
2.2 ARGININA E TRANSLOCAÇÃO BACTERIANA.....	23
2.2.1 Função de barreira intestinal.....	23
2.2.2 Mecanismos de translocação bacteriana	24
2.2.2.1 Alteração da microbiota intestinal	26
2.2.2.2 Imunossupressão	26
2.2.2.2.1 Efeitos da arginina na resposta imunológica.....	28
2.2.2.3 Dano à estrutura intestinal.....	30
2.2.2.3.1 Testes de permeabilidade intestinal	31
2.2.2.3.2 Arginina e dano intestinal	31
2.3 MARCAÇÃO DA BACTÉRIA COM ISÓTOPO RADIOATIVO.....	33
CAPÍTULO I ESTUDO DOS EFEITOS DO PRÉ-TRATAMENTO COM ARGININA SOBRE A MUCOSA INTESTINAL E TRANSLOCAÇÃO BACTERIANA	34
RESUMO.....	34
ABSTRACT	35
1. INTRODUÇÃO	36
2.0 MATERIAL E MÉTODOS.....	37
2.1 Animais e Tratamento	37
2.2 Procedimento Cirúrgico.....	37

2.3 Estudo da Permeabilidade Intestinal	37
2.4 Histologia do Íleo.....	38
2.5 Radiomarcção da <i>E.coli</i>	38
2.6 Translocação Bacteriana	39
2.7 Análises estatísticas	39
3.0 RESULTADOS	40
3.1 Ganho de peso, consumo diário de ração, ingestão calórica e nitrogenada...	40
3.2 Efeitos da arginina na permeabilidade intestinal.....	40
3.3 Efeitos da arginina na translocação bacteriana.....	41
3.4 Histologia do Íleo.....	42
4.0 DISCUSSÃO E CONCLUSÕES.....	44
CAPÍTULO II AVALIAÇÃO DA VIA DE AÇÃO DA ARGININA NA TRANSLOCAÇÃO BACTERIANA	46
RESUMO	46
ABSTRACT	47
1. INTRODUÇÃO	48
2.0 MATERIAL E MÉTODOS.....	50
2.1 Animais e Tratamento	50
2.2 Procedimento Cirúrgico	50
2.3 Radiomarcção da <i>E.coli</i>	51
2.4 Translocação Bacteriana	51
2.5 Permeabilidade Intestinal	52
2.6 Histologia do íleo.....	52
2.7 Dosagem das Citocinas	52
2.8 Dosagem da IgA.....	52
2.9 Análises estatísticas	53
3.0 RESULTADOS	53
3.1 Influência do óxido nítrico na translocação bacteriana	53
3.2 Influência do óxido nítrico na permeabilidade intestinal	54
3.3 Análises histológicas	55
3.4 Dosagem de Citocinas	56
3.5 Concentração de IgA no fluido intestinal	57
4.0 DISCUSSÃO E CONCLUSÕES.....	58
3. CONCLUSÕES INTEGRADAS E PERSPECTIVAS.....	62
3.1 CONCLUSÕES INTEGRADAS.....	62

3.2 PERSPECTIVAS.....	62
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	63
5. ANEXOS	74

LISTA DE TABELAS

[Capítulo I]	
	Ganho de peso, consumo diário de ração, ingestão calórica e
I.1	nitrogenada..... 40
I.2	Biodistribuição da <i>Escherichia coli</i> marcada com tecnécio-99m 18 horas
	após a obstrução intestinal em animais tratados com arginina..... 41
[Capítulo II]	
II.1	Efeito da inibição da enzima óxido nítrico sintase (NOS) na translocação
	bacteriana..... 54

LISTA DE FIGURAS

1	Estrutura química da arginina.....	17
2	Eixo intestino-rins no metabolismo de arginina.....	19
3	Vias e produtos da degradação de arginina.....	20
4	Síntese de óxido nítrico a partir da L-arginina.....	22
5	Detecção e amostragem de bactérias intestinais.....	24
6	Mecanismos e componentes imunológicos envolvidos no processo de translocação bacteriana.....	25
[CAPÍTULO I]		
I.1	Efeitos da arginina na permeabilidade intestinal.....	41
I.2	Avaliação histológica do íleo distal.....	43
[CAPÍTULO II]		
II.1	Efeito da inibição da óxido nítrico sintase por L-NAME na permeabilidade intestinal.....	55
II.2	Histopatologia do íleo de animais do grupo ARG+L-NAME.....	56
II.3	Níveis das citocinas INF- γ e IL-10 no soro dos animais.....	57
II.4	Níveis de sIgA no fluido intestinal.....	58

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

^{99m}Tc	- ^{99m}Tc Tecnécio
^{99m}Tc – DTPA	- DTPA marcado com ^{99m}Tc Tecnécio
ARG	- Arginina
ARGase	- Arginase
ASL	- Argininossuccinato liase
ASS	- Argininossuccinato sintase
ATP	- Adenosina trifosfato
CAT	- Transportador de aminoácidos catiônicos
CIT	- Citrulina
CPS	- Carbamoil fosfato-sintase
DNA	- Ácido desoxirribonucléico
DTPA	- Ácido dietilenotriaminopentacético
<i>E.coli</i>	- <i>Escherichia coli</i>
EDTA	- Ácido etilenodiamino tetra-acético
eNOS	- Óxido nítrico sintase endotelial
GALT	- Tecido linfóide associado ao intestino
GH	- Hormônio do crescimento
GLN	- Glutamina
GLNase	- Glutaminase
GLU	- Glutamato
HCl	- Ácido clorídrico
Ig A	- Imunoglobulina A
IGF	- Fator de crescimento semelhante à insulina
IL-1	- Interleucina-1
IL-10	- Interleucina-10
IL-13	- Interleucina-13
IL-4	- Interleucina-4
INF- γ	- Interferon-gama
iNOS	- Óxido nítrico sintase indutiva
L-NAME	- N-ômega-nitro-L-arginina metil éster
LNM	- Linfonodos mesentéricos

L-NMA	- N-monomethyl-L-arginine
L-NNA	- N-ômega-nitro-L-arginina
MBq	- Megabequerel
Na ^{99m} TcO ₄	- Pertecnetato de sódio
NADPH	- Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NAG	- N-acetil-glutamato
NaOH	- Hidróxido de Sódio
NOS	- Óxido nítrico sintase
OAT	- Ornitina aminotransferase
ODC	- Ornitina descarboxilase
OI	- Obstrução intestinal
ON	- Óxido nítrico
ORN	- Ornitina
OTC	- Ornitina transcarbamilase
P5C	- Pirrolina-5-carboxilase
PBS	- Tampão fosfato salina
PDG	- Glutaminase dependente de fosfato
RNA	- Ácido ribonucléico
slgA	- Imunoglobulina A secretória
TB	- Translocação bacteriana
Th	- T <i>helper</i> – linfócito T auxiliar
TNF- α	- Fator de necrose tumoral- α
UFC	- Unidades formadoras de colônia
VCT	- Valor calórico total

RESUMO

Investigou-se o papel da arginina na integridade intestinal, translocação bacteriana (TB) e imunomodulação em camundongos submetidos à obstrução intestinal (OI). A função do óxido nítrico (ON) foi investigada com o uso do L-NAME, inibidor da enzima óxido nítrico sintase. Os camundongos foram divididos em quatro grupos, tratados por sete dias: Grupo ARG, ração com arginina 2%; grupo ARG+L-NAME, a mesma ração e L-NAME, por gavagem; e grupos *Sham* e OI, ração convencional. Para estudo da permeabilidade intestinal, no 8º dia os animais receberam por gavagem solução de ácido dietileno triamino pentacético marcado com tecnécio-99m e 90 min depois, foram anestesiados e o íleo terminal ligado, exceto nos do grupo *Sham*. Após 4, 8 e 18 h, o sangue foi coletado para determinação da radioatividade. Amostras do íleo foram retiradas para análise histológica. Outro grupo de animais, tratados por sete dias, recebeu por gavagem 10^8 UFC/mL de ^{99m}Tc -E.coli. Posteriormente, os animais foram submetidos ao procedimento cirúrgico descrito e a TB determinada a partir da captação de ^{99m}Tc -E.coli nos linfonodos mesentéricos, sangue, fígado, baço e pulmões 18 h após a operação. Soro e fluido intestinal foram coletados para dosagens de citocinas (INF- γ , IL-10) e sIgA, respectivamente. A oferta de arginina reduziu a permeabilidade intestinal, a TB e preservou a mucosa do íleo em animais submetidos à OI. O tratamento com arginina aumentou os níveis de IL-10 e sIgA em relação aos grupos *Sham* e OI. O bloqueio da produção de ON não preveniu a TB, mas preservou a integridade intestinal. As concentrações de citocinas e sIgA foram similares nos grupos ARG+L-NAME e *Sham*. Os resultados obtidos sugerem que a arginina desempenha ação protetora no processo de translocação bacteriana por mecanismos de preservação da integridade da mucosa intestinal. Além disso, atua na modulação da resposta imunológica por equilibrar a produção sérica de citocinas Th1 e Th2, contribuindo também para aumentar a secreção de IgA na mucosa intestinal. Os resultados indicam que a via de ação da arginina na redução da TB provavelmente é mediada pelo efeito do ON na modulação da resposta imunológica.

Palavras-chave: Arginina; translocação bacteriana; dano intestinal; óxido nítrico; resposta imunológica.

ABSTRACT

This work evaluated the effects of arginine on intestinal mucosa integrity, bacterial translocation (BT) and immunomodulation in mice undergoing intestinal obstruction (IO). The role of nitric oxide (NO) was studied using L-NAME, a nitric oxide synthase blocker. The mice were divided in four groups, treated for seven days: ARG group fed a chow with 2% of arginine; ARG+L-NAME group, the same diet and L-NAME, by gavage; and groups *Sham* and IO, fed a standard chow. To assess intestinal permeability, on the 8th day the animals were gavaged with radiolabeled diethylene triamine pentaacetic acid solution and after 90 min, they were anesthetized and the ileum ligated, except the *Sham* group. At 4, 8 and 18 hours, blood was collected for radioactivity determination. Ileum samples were collected for histological analyses. Another group of animals, treated for 7 days was gavaged with 10⁸ CFU/mL of ^{99m}Techetium-*E.coli*. Afterwards, the mice underwent the same surgical procedure described above and BT was determined by the uptake of ^{99m}Techetium-*E.coli* in mesenteric lymph nodes, blood, liver, spleen and lungs, 18 h after the operation. Blood and intestinal fluid were removed for serum cytokines (INF- γ and IL-10) and intestinal sIgA analysis. Arginine reduced intestinal permeability, BT and preserved mucosal integrity in mice undergoing IO. Arginine also increased the levels of IL-10 and sIgA when compared with groups *Sham* and IO. NO blockage did not prevent bacterial translocation, but preserved gut integrity. The levels of cytokines and sIgA were similar in the groups *Sham* and ARG+L-NAME. The current results suggest arginine protection against bacterial translocation through preservation of the intestinal mucosa integrity. Besides that, arginine modulated the immunological response and enhanced IgA production. NO has an important role in BT prevention, by modulation of the immunological response. The results show that arginine impacts on BT via nitric oxide production which on the other hand modulates the immunological response.

Key-words: Arginine; bacterial translocation; intestinal injury; nitric oxide; immunological response.

1 INTRODUÇÃO

A translocação bacteriana (TB) é definida como a passagem de microorganismos viáveis, não viáveis e seus subprodutos, através da mucosa intestinal, para o interior da lâmina própria e então, para os linfonodos mesentéricos e corrente sanguínea (GATT et al., 2007). A TB é considerada evento espontâneo, importante para apresentação de antígenos na mucosa de indivíduos saudáveis. No entanto, em condições de estresse metabólico como trauma, grandes operações, queimaduras, isquemia e obstrução intestinal, distúrbios nos mecanismos de defesa do hospedeiro e alterações na função da barreira intestinal promovem ou exacerbam a translocação bacteriana, que se torna então, um processo patológico (SAMEL et al, 2002; HUA & MOOCHHALA, 2000; MACFIE et al., 1999).

A fim de evitar a translocação bacteriana que pode ocorrer na fase aguda da doença, a suplementação com substratos imunomoduladores torna-se importante (TSUEI et al., 2005; BASTIAN & WEIMANN, 2002). Neste contexto, a arginina tem sido extensivamente estudada.

A arginina é considerada aminoácido condicionalmente essencial, uma vez que as necessidades tornam-se aumentadas durante o estresse metabólico. Possui importante função na barreira intestinal pela atuação nos mecanismos imunológicos e não imunológicos responsáveis pela manutenção da integridade desta barreira (CHOI et al., 2009; WU et al., 2009).

Estudos demonstram que a arginina desempenha função central no sistema imunológico, sendo o metabolismo especialmente importante para macrófagos e linfócitos T (STECHMILLER et al., 2004; ZEA et al., 2004; SUCHNER et al., 2002).

Arginina dietética eleva a atividade de macrófagos, aumenta a proporção de células T CD4:CD8, o número de linfócitos nas placas de Peyer, bem como os níveis de IgA secretória. Também aumenta a expressão de RNA mensageiro para a produção de citocinas Th1 e citocinas Th2, sugerindo que a arginina atua tanto na resposta imunológica celular quanto na humoral (SHANG et al, 2005; SHANG et al, 2004; STECHMILLER et al., 2004; YEH et al., 2002). Além disso, possui efeito na manutenção da integridade da mucosa intestinal por prevenir o dano morfológico e funcional (CINTRA et al., 2008; SAYAN et al., 2008).

Diversos achados apontam o óxido nítrico (ON) como o responsável por estes efeitos biológicos da arginina (LUIKING et al., 2010; WILEY, 2007; BODGAN, 2001). A arginina constitui-se no único substrato para síntese de ON nas células eucarióticas. O

ON é potente regulador vasoativo, neuromodulador e molécula sinalizadora. É o principal fator de relaxamento derivado do endotélio, melhorando a vasoconstrição e aumentando o fluxo sanguíneo em tecidos lesados (POPOVIC et al., 2007; SAMEL et al., 2003).

O óxido nítrico é componente da defesa não específica do hospedeiro, mostrando-se efetivo contra parasitas intra e extracelulares por aumentar a citotoxicidade de macrófagos (WILEY et al., 2007; HARDY et al., 2006). Atua ainda na prevenção de danos na função e estrutura dos enterócitos provocados pelo trauma cirúrgico e isquemia/reperfusão (SAYAN et al., 2008; THOMAS et al. 2001; KHANNA et al., 2000; WARD et al., 2000).

Em baixas concentrações, o óxido nítrico parece exercer função fisiológica protetora, porém tanto a ausência de produção quanto a produção excessiva podem acarretar efeitos prejudiciais sobre a barreira intestinal (NADLER & FORD, 2000; DEITCH et al., 2002). Por este motivo, embora seja claro que a arginina tenha importante função imunomoduladora, o uso é controverso em pacientes sépticos, uma vez que a sepse é caracterizada por aumentada produção de óxido nítrico pela iNOS, isoforma indutiva da enzima óxido nítrico sintase (HARDY et al., 2006).

Na literatura existem poucos estudos sobre o papel da arginina no processo de translocação bacteriana. Além disso, os mecanismos de ação deste nutriente ainda não estão completamente elucidados. Neste contexto, investigações sobre a contribuição da arginina no processo de translocação bacteriana tornam-se imprescindíveis para melhor elucidar o complexo mecanismo de ação e as vias metabólicas pelas quais a arginina desempenha o efeito imunomodulador.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 ARGININA

2.1.1 Aspectos gerais

A arginina ou ácido L-amino-5-guanidino-valérico (Figura 1) é um aminoácido básico, estável em soluções aquosas e à esterilização (ZALOGA et al, 2004; WU et al., 2000). Possui quatro átomos de nitrogênio por molécula e devido a essa característica estrutural é o principal carreador de nitrogênio em humanos e animais, apresentando importante função na síntese protéica e no metabolismo intermediário de nitrogênio por participar do ciclo da uréia (WILMORE, 2004).

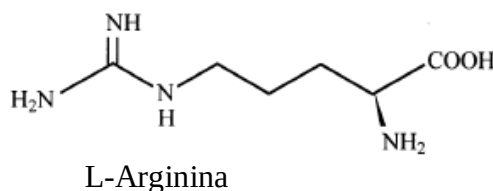


Figura 1 - Estrutura química da arginina (extraído de TAPIERO et al., 2002)

É precursora da síntese de moléculas com grande importância biológica como ornitina, poliaminas, óxido nítrico, creatina, agmatina, glutamina e prolina, dentre outras (CHIARLA et al., 2006; WILMORE, 2004).

Tradicionalmente é considerada não essencial para adultos e crianças, devido à capacidade do organismo em sintetizá-la (HARDY et al, 2006). No entanto, em certas condições clínicas como trauma e sepse, principalmente, ocorre aumento do consumo. Esse excede a capacidade de produção corporal levando à depleção da arginina, que nestes casos é ainda agravada pela reduzida ingestão do nutriente em doentes graves. Desta forma, a denominação mais adequada é aminoácido condicionalmente essencial (PAN et al., 2004; SUCHNER et al., 2002).

Em casos de sepse, operação e outros estados pós-traumáticos, a arginina possui importante papel na manutenção da resposta imunológica, processos inflamatórios, síntese de colágeno na cicatrização de feridas e outras adaptações fisiopatológicas (CHIARLA et al., 2006; SUCKHOTNIK et al., 2005).

2.1.2 Metabolismo

Os níveis plasmáticos de arginina são mantidos a partir de fontes: exógena (dieta) e endógena (degradação protéica corporal e síntese endógena pela citrulina). A síntese endógena de arginina varia de acordo com a espécie, estado nutricional e estágio de desenvolvimento (WU & MORRIS, 1998).

Em adultos, não ocorre entrada de quantidades substanciais de arginina dietética na circulação sistêmica, pois 40% da arginina ingerida é degradada pelo intestino delgado na primeira etapa do metabolismo. A bioquímica da arginina é complexa e envolve diversas vias metabólicas e sistemas orgânicos (WU et al., 2009).

2.1.2.1 Síntese endógena

A quebra de proteínas corporais e dietéticas gera arginina, que pode então seguir duas vias: ciclo da uréia ou degradação intestinal (CREEN & CYNOBER, 2010).

A arginina pode ser diretamente sintetizada no tecido hepático a partir do ciclo da uréia, porém devido à alta atividade da enzima arginase, a arginina produzida será rapidamente hidrolisada em uréia e ornitina, não havendo, portanto, síntese líquida do aminoácido (WU et al. 2009; FILHO & ZILBERSTEIN, 2000).

A outra via de utilização da arginina consiste na transformação que é dependente do metabolismo intestinal. A arginina produzida da degradação de proteínas corporais é transformada no epitélio intestinal em citrulina, sintetizada a partir do glutamato, glutamina e ornitina em processo que ocorre nas mitocôndrias dos enterócitos e é dependente das enzimas ornitina aminotranferase e ornitina transcarbamilase (HALLEMEESCH et al., 2002; TAPIERO et al., 2002).

A citrulina circulante, proveniente dos enterócitos é então captada pelos rins e convertida em arginina em processo mediado pelas enzimas argininosuccinato sintase (ASS) e argininosuccinato liase (ASL), que contribui para aproximadamente 10% do fluxo plasmático de arginina. Desta forma, a síntese endógena de arginina em adultos envolve principalmente o eixo intestino-rins (Figura 2) (CREEN & CYNOBER, 2010; EVANS et al., 2004).

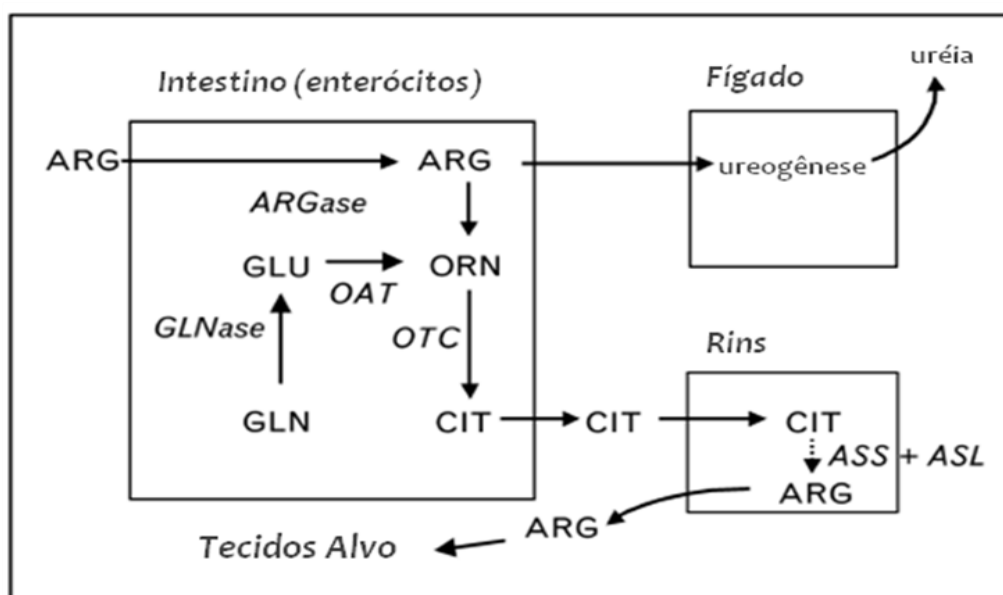


Figura 2 - Eixo intestino-rins no metabolismo de arginina. ARG, arginina; ARGase, arginase; ASS+ASL, argininosuccinato sintase + argininosuccinato liase; CIT, citrulina; GLN, glutamina; GLNase, glutaminase; GLU, glutamato; OAT, ornitina aminotranferase; ORN, ornitina; OTC, ornitina transcarbamilase (extraído de CREEN & CYNOBER, 2010).

É importante ressaltar que além da síntese renal, a citrulina é rapidamente convertida em arginina em quase todas as células, incluindo adipócitos, células endoteliais, enterócitos, macrófagos, neurônios e miócitos. Estudos com macrófagos e células endoteliais demonstraram que a citrulina é transportada para o interior celular pelo sistema “N”, seletivo para aminoácidos com cadeia lateral contendo um grupo amino. Dentro das células, a conversão de citrulina em arginina via argininosuccinato sintase e liase é a única via para a utilização de citrulina (CREEN & CYNOBER, 2010).

2.1.2.2 Absorção

A absorção da arginina ocorre no jejuno e íleo a partir de componentes saturáveis e não saturáveis. No cólon, a absorção é reduzida (CYNOBER et al., 1995).

O transporte de arginina constitui-se no primeiro passo da utilização pelas células. O transporte de aminoácidos catiônicos, incluindo a arginina ocorre por diferentes sistemas de transporte (y^+ , $b^{0,+}$, y^+L e $B^{0,+}$). No entanto, o mais importante para a maioria das células é o sistema y^+ , que possui como características principais a independência de sódio e a alta afinidade. Estudos em animais demonstraram que a arginina foi predominantemente transportada através da membrana intestinal via y^+ (PAN et al., 2004).

As proteínas transmembrana CAT-1, CAT-2 e CAT-3, apesar de apresentarem menor afinidade, também possuem propriedades de transporte de aminoácidos consistentes com o transportador y^+ . A CAT-3 é específica para o cérebro (HALLEMEESCH et al., 2002).

Uma vez no interior celular, existem múltiplas vias de degradação da arginina nas quais importantes produtos biológicos são formados (Figura 3).

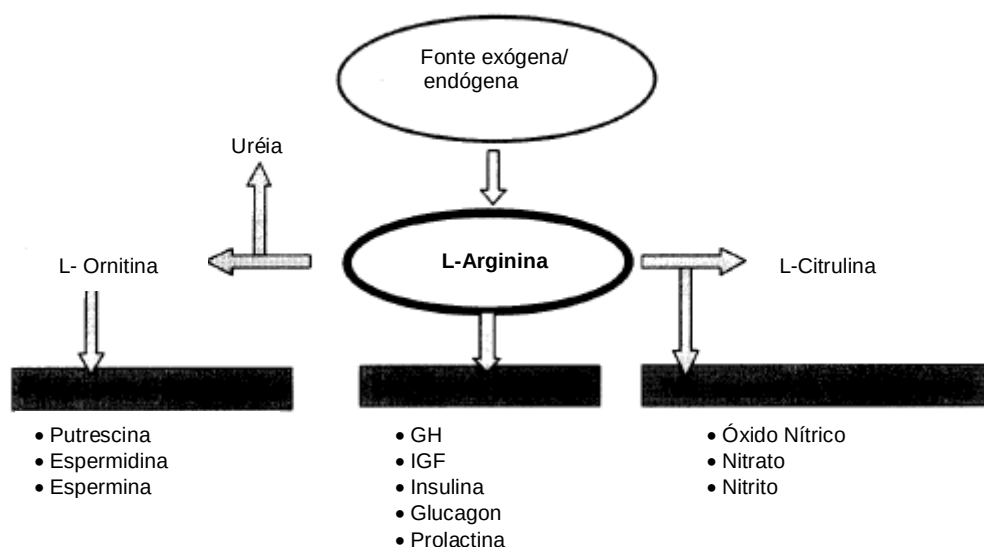


Figura 3 - Vias e produtos da degradação de arginina (Extraído de SUCHNER et al., 2002).

A arginina possui ação secretagoga. Induz a liberação de somatotropina e prolactina pela hipófise e a liberação pancreática de insulina. Também estimula a secreção de fator de crescimento semelhante à insulina (IGF) e a liberação de hormônios anti-insulinêmicos como glucagon, somatostatina e catecolaminas (SUCHNER et al., 2002).

A arginina é precursora da creatina, importante substrato do metabolismo energético. A ingestão dietética de arginina é de aproximadamente 5g/dia em adultos, destes em média 2,3 g são utilizados para a síntese de creatina (ARGAMAN et al. 2003; EVANS et al., 2004).

Existem, contudo, duas vias de degradação direta. A primeira é mediada pela arginase, liberando ornitina e uréia, enquanto a outra é catalisada pela enzima óxido nítrico sintase e tem como produto o óxido nítrico (CYNOBER et al., 1995).

2.1.3 Vias e produtos do catabolismo da arginina

2.1.3.1 Arginase – síntese de poliaminas

Existem duas isoformas distintas da arginase (tipo I e tipo II). A arginase citosólica do tipo I é expressa abundantemente em hepatócitos e está envolvida na detoxificação de amônia e síntese de uréia. A arginase mitocondrial do tipo II é expressa em níveis relativamente baixos nas mitocôndrias de células extra-hepáticas, incluindo enterócitos, células mielóides do baço, células endoteliais, epiteliais, macrófagos e células vermelhas, estando envolvida em funções biossintéticas como: síntese de ornitina, prolina e glutamato. As diferentes localizações subcelulares das isozimas da arginase podem prover mecanismo de regulação metabólica da arginina (WU et al., 2009; FLYN et al., 2002; TAPIERO et al., 2002).

O metabolismo da L-ornitina via ornitina aminotransferase (OAT) leva à produção de prolina, componente essencial do colágeno (MUNDER, 2009). Além dessa via, a L-ornitina pode ser metabolizada a poliaminas (putrescinas, espermidina, espermina) pela enzima ornitina descarboxilase (ODC). As poliaminas são pequenas moléculas catiônicas e podem interagir com diversas estruturas aniônicas incluindo DNA, RNA e proteínas. São consideradas como segundos mensageiros intracelulares, influenciando a síntese de proteínas e ácidos nucleicos e se tornando essenciais para a divisão celular normal e crescimento, além de atuarem como antioxidantes, protegendo as células de danos oxidativos (MUNDER et al. 2009; FLYN et al., 2002; MURPHY, 2001).

A mucosa intestinal e colônica apresenta demanda especial por poliaminas, devido à alta taxa de proliferação. Desta forma, essas possuem importante contribuição para a manutenção da função intestinal. A função principal se dá no reparo de eventuais danos por dois mecanismos sucessivos: a restituição no qual a superfície lesada é recoberta por células vizinhas, e a reposição das células perdidas pela divisão celular (MOINARD et al., 2005; LOSER et al., 1999).

OSMAN et al (1998) observaram que em concentrações fisiológicas, a espermina reduziu a permeabilidade intestinal em ratos. Em concordância com este dado, LOSER e cols (1999) verificaram que dietas deficientes em poliaminas resultaram em hipoplasia da mucosa do intestino delgado e do cólon, demonstrando a função das poliaminas no trofismo intestinal.

2.1.3.2 Óxido nítrico sintase – produção do óxido nítrico

A arginina, quando metabolizada à citrulina, promove a formação de compostos nitrogenados como: óxido nítrico, nitritos e nitratos. Grande parte da importância biológica da arginina está atribuída ao ON (óxido nítrico) (POPOVIC, 2007).

A N-hidroxiarginina é a intermediária na reação da NOS, na qual o grupo guanidino é modificado pelo oxigênio molecular para formar ON e citrulina em reação que possui como cofatores o NADPH_2 , Ca^{2+} (Figura 4) (HALLEMEESECH et al, 2002).

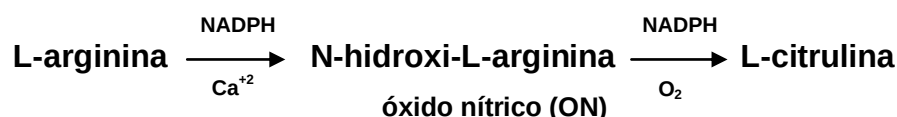


Figura 4 - Síntese de óxido nítrico a partir da L-arginina (Extraído de FILHO & ZILBERSTEIN, 2000).

A enzima é encontrada em três formas diferentes. A NOS-1 ou nNOS tem origem neuronal e função de neurotransmissor não adrenérgico e não colinérgico, sendo expressa nos plexos mientéricos do intestino. A NOS-3 ou eNOS, de origem endotelial, é potente vasodilatador que regula o fluxo sanguíneo gastrointestinal. NOS-1 e NOS-3 são enzimas constitutivas controladas pelo Ca^{2+} intracelular e produzem baixos níveis de ON. No entanto, a terceira isoforma indutiva NOS-2 ou iNOS é produzida em quantidades maiores e expressa por macrófagos e outros tecidos em resposta a mediadores pró-inflamatórios, como lipopolissacarídeos de membrana bacteriana, endotoxinas e citocinas pró-inflamatórias (LUIKING et al., 2009; WIEST & RATCH, 2003; NADLER & FORD, 2000).

O óxido nítrico está envolvido em variedade de funções biológicas em todo o organismo (LUIKING et al., 2010). É potente regulador vasoativo e principal fator de relaxamento derivado do endotélio. Ao promover a vasodilatação, eleva o fluxo sanguíneo a tecidos lesados (SAMEL et al., 2003). Além disso, o ON possui importante papel na resposta imunológica, sendo produzido por células que atuam na resposta imunológica inata como os monócitos, macrófagos, micróglia, células de Kupffer, eosinófilos e neutrófilos, por isso, durante a inflamação, age mediando mecanismos de citotoxicidade e defesa não específica do hospedeiro (BOGDAN, 2001).

No entanto, o óxido nítrico parece exercer dupla função no organismo, os efeitos benéficos ou destrutivos, dependem da quantidade em que é produzido (BODGAN,

2001). Muitas células expressam iNOS, quando expostas a lipopolissacarídeos presentes na parede bacteriana ou citocinas pró inflamatórias como IL-1 β , TNF- α e INF- γ , podendo gerar grandes quantidades de óxido nítrico. A expressão aumentada da iNOS tem sido demonstrada em desordens como: destruição da mucosa, sepse e sintomas clínicos inerentes a essa condição (LUIKING & DEUTZ, 2003).

A quantificação da produção de ON é difícil, já que este é rapidamente oxidado pela oxihemoglobina a nitrato e nitrito o que contribui para a meia-vida no sangue ser muito curta (<1 segundo). Assim, o óxido nítrico normalmente é medido indiretamente a partir da concentração dos metabólitos no plasma ou nas células (LUIKING et al., 2009).

2.2 ARGININA E TRANSLOCAÇÃO BACTERIANA

2.2.1 Função de barreira intestinal

O trato gastrointestinal é habitado por grande variedade de microorganismos que estão contidos no lúmen intestinal e separados do interstício corporal pelo epitélio. Esta barreira protege o hospedeiro da invasão da própria microbiota ou toxinas (THOMAS et al., 2001).

A função de barreira é mantida por mecanismos de defesa imunológicos, como a produção de imunoglobulina A secretória, e o GALT composto por linfócitos intra mucosos, placas de Peyer e linfonodos mesentéricos; e não imunológicos, como a integridade das membranas plasmáticas celulares e junções do tipo *tight*, além da elaboração de produtos secretórios (CLAYBURGH et al., 2004; DING & LI, 2003; THOMAS et al., 2001).

A eficácia desta barreira pode ser verificada considerando-se a grande concentração bacteriana no lúmen intestinal, que corresponde a 10^{12} microorganismos/mL de fezes no ceco, enquanto linfonodos mesentéricos, sangue portal e outros tecidos, são geralmente mantidos estéreis (GATT et al., 2007).

A defesa do hospedeiro requer interpretação acurada do micro ambiente, a fim de distinguir os microorganismos comensais dos patogênicos e regular as respostas subseqüentes. A superfície dos enterócitos secreta mediadores imunológicos em resposta a antígenos, são eles: peptídeos antibacterianos, imunoglobulina A (IgA) e quimiocinas. A detecção imunológica de conteúdos intestinais requer a amostragem de antígenos a partir de células M especializadas e a apresentação por células apresentadoras de antígenos que incluem células dendríticas e macrófagos (Figura 5).

Ao serem apresentados aos linfócitos T eles poderão se diferenciar em células do tipo Th1 ou Th2 produtoras de citocinas (O'HARA & SHANAHAN, 2006; SHANAHAN, 2002).

As citocinas do tipo Th1, como o interferon-gama ($\text{INF-}\gamma$) e fator de necrose tumoral ($\text{TNF-}\alpha$), aumentam a imunidade mediada por células. O efeito Th1 predominante resulta na ativação de macrófagos e linfócitos T, particularmente os citotóxicos. As citocinas Th2, incluindo a IL-4 e IL-10, aumentam a imunidade humoral, resultando em ativação de linfócitos B e aumento da produção de anticorpos. Os efeitos Th1 e Th2 são contra-regulatórios, por isso, no indivíduo saudável, a mucosa intestinal se encontra em estado inflamatório controlado (SHANG et al., 2004; NEURATH et al., 2002; SHANAHAN, 2002).

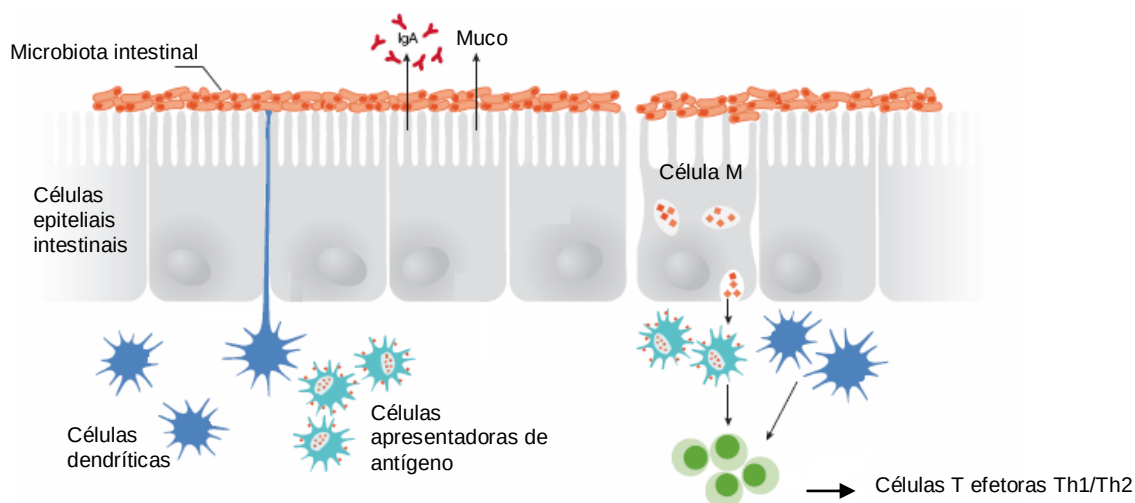


Figura 5 - Detecção e amostragem de bactérias intestinais (Extraído de O'HARA & SHANAHAN, 2006).

2.2.2 Mecanismos de translocação bacteriana

A translocação bacteriana é definida como a passagem de microorganismos viáveis, não viáveis e subprodutos, através da mucosa epitelial, para o interior da lâmina própria e então, para os linfonodos mesentéricos e corrente sanguínea (GATT et al., 2007; HUA & MOOCHHALA, 2000).

É considerada evento espontâneo em humanos, importante para apresentação de antígenos à mucosa, estímulo à produção de IgA secretória e otimização da função de barreira intestinal. Entretanto, o estresse fisiológico pode transformar este processo

homeostático em patológico, agindo como fator crucial na patogênese da sepse e falha múltipla de órgãos (SAMEL et al, 2002; NADLER et al., 2000).

O rompimento da barreira intestinal provocado por injúria inicial induz a passagem de conteúdos luminais, inclusive bactérias e outros patógenos através do epitélio, promovendo ativação de macrófagos e conseqüente produção da IL-12, que induz a resposta de citocinas Th1 (Figura 6). O $\text{INF-}\gamma$ produzido por linfócitos Th1 induz a ativação de macrófagos e estes, a produção de $\text{TNF-}\alpha$, com a finalidade de promover a resposta inflamatória. As citocinas $\text{TNF-}\alpha$ e $\text{INF-}\gamma$, também influenciam a barreira epitelial por meio da contração da actina/miosina, promovendo abertura das junções *tight*, o que leva a contínua perda da função de barreira. Simultaneamente ocorre a regulação desta resposta por meio de citocinas do tipo Th2, como a IL-10, com ação antiinflamatória. No entanto, resposta antiinflamatória quando hiper estimulada permite que a inflamação se amplie e persista por tempo maior que o usual, continuando o ciclo de progressão da doença (SHANAHAN, 2002; CLAYBURG et al., 2004).

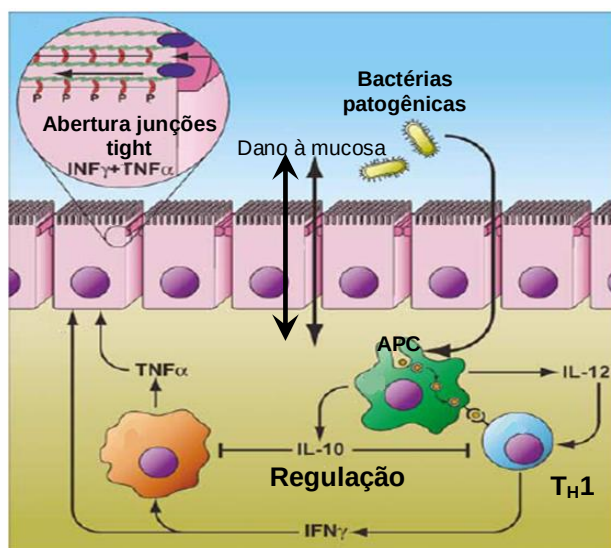


Figura 6 - Mecanismos e componentes imunológicos envolvidos no processo de translocação bacteriana (extraído de: CLAYBURG et al., 2004).

Estudos em humanos e animais sugerem que a presença de icterícia obstrutiva, doenças inflamatórias intestinais, administração de nutrição parenteral total (por desuso do trato gastrointestinal) e doenças malignas estão associadas com incidência aumentada de translocação bacteriana (O'BOYLE et al, 1998). No entanto, a isquemia

e a obstrução intestinal estão entre as condições que mais parecem se relacionar à translocação e sepse, por causarem dano da mucosa com conseqüente aumento da permeabilidade (SAMEL et al., 2002).

Segundo GATT et al. (2007), os fatores responsáveis pela promoção da translocação bacteriana são alteração da microbiota intestinal, imunossupressão do hospedeiro e alterações da mucosa intestinal.

2.2.2.1 Alteração da microbiota intestinal

O trato gastrointestinal humano é colonizado por bactérias aeróbicas e anaeróbicas. Existe microbiota característica em cada parte do intestino e estas bactérias são impedidas da migração para os sítios extraintestinais pela monocamada mucosa. O estômago e o intestino proximal contém quantidade pequena de bactérias, principalmente bactérias gram-positivas e aeróbicas, sendo as espécies freqüentemente isoladas *Streptococcus*, *Staphylococcus* e *Lactobacilos*. No íleo distal, bactérias gram-negativas superam o número de bactérias gram-positivas, sendo a *Enterobacteriaceae* predominante e as bactérias anaeróbicas encontradas em números substanciais (MACFIE et al,1999).

Em condições normais, a microbiota intestinal encontra-se em estado de equilíbrio com o hospedeiro, o que é mutuamente benéfico. No entanto, este delicado balanço pode ser afetado como resultado de diversos agravos como por exemplo em eventos de pancreatite, choque hemorrágico, queimaduras e trauma cirúrgico. Nessas condições, a microbiota anormal pode se tornar predominante como resultado de estresse, uso repetido de antibióticos ou deficiências nutricionais (LI et al., 2010; BAILEY et al., 2006).

As bactérias que podem translocar com maior eficiência do trato gastrointestinal aos nódulos linfáticos mesentéricos são as gram-negativas anaeróbicas facultativas, tais como *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* e *Proteus mirabilis*. Bactérias gram-positivas e tolerantes ao oxigênio como *Staphylococcus epidermidis* translocam em níveis intermediários, enquanto bactérias anaeróbicas obrigatórias são as menos efetivas na translocação aos linfonodos mesentéricos e parecem translocar somente em situações de injúria mucosa (WUEST & RATCH, 2003; BERG, 1995).

2.2.2.2 Imunossupressão

As bactérias, após terem translocado aos linfonodos mesentéricos ou outros tecidos extra-intestinais se multiplicarão caso resistam aos mecanismos imunológicos

presentes nestes locais. Dependendo da imunocompetência do hospedeiro e das propriedades patológicas da bactéria, essa infecção pode ser controlada ou, então, gerar a sepse (BERG, 2001). Desta forma, o sistema imunológico do hospedeiro é componente integral na dinâmica da translocação bacteriana, processo em que as defesas celulares e humorais estão envolvidas (NAABER et al., 2000).

Pacientes acometidos por trauma grave, sepse ou submetidos a grandes operações, principalmente se desnutridos, exibem função imunológica deprimida e alto risco de desenvolvimento de infecções, pois o estresse induz a mudanças no número e na função (especialmente a produção de $\text{INF-}\gamma$) de células imunológicas no timo, nos linfonodos ou no sangue periférico (ZHANG et al., 2005; BEALE et al., 1999).

A translocação bacteriana é mais comum em ratos sem o timo do que em ratos normais, sugerindo a existência da imunidade mediada por células T na inibição da translocação (O'BOYLE et al., 1998). ZHANG et al. (2009), em estudo realizado com ratos, verificaram que as contagens de células T CD4 nos linfonodos mesentéricos e esplenócitos esteve reduzida, enquanto a translocação bacteriana aumentou no grupo experimental submetido a ligação e perfuração cecal.

A ação das células T é extremamente importante na resposta inflamatória, pois o balanço na produção de citocinas Th1/Th2 limita a resposta inflamatória exacerbada, e desta forma protege contra o rompimento da barreira e o aumento da permeabilidade intestinal (CLAYBURG et al., 2004).

Outra característica do tecido linfático é a propensão à produção da IgA (ACHESON & LUCCIOLI, 2004). A IgA é importante na proteção da mucosa por atuar na inibição da aderência e colonização de microorganismos, neutralização de enzimas, toxinas e vírus, inibição da absorção de antígenos. Além disso, a IgA interage com fatores de defesa humoral e potencializa efeitos de fatores antibacterianos específicos como lactoferrina e lactoperoxidase (QUIAO et al, 2005).

Diversos estudos demonstram a correlação entre translocação e disfunção da resposta imunológica. NAABER et al. (2000), em estudo realizado em ratos utilizando o modelo de choque séptico, verificaram que estágios iniciais de sepse estão relacionados com baixas contagens de linfócitos, enquanto estágios mais tardios com baixas taxas de neutrófilos, demonstrando redução na resposta celular. FUKATSU e cols (2006), utilizando o modelo de isquemia/reperfusão intestinal em camundongos, observaram redução do número de linfócitos nas placas de Peyer, no espaço intraepitelial e na lâmina própria, bem como a redução dos níveis intestinais de IgA no primeiro dia após a indução da isquemia.

2.2.2.2.1 Efeitos da arginina na resposta imunológica

A suplementação com arginina aumenta a função imunológica em modelos humanos e animais, agindo na defesa do hospedeiro, no processo inflamatório, na cicatrização e em uma série de adaptações fisiopatológicas. Porém, os mecanismos pelos quais a arginina atua ainda não estão completamente esclarecidos (CHIARLA et al., 2006; SUKHOTNIK et al., 2005; WU et al., 2000).

O aporte exógeno de arginina está acompanhado de aumento na proliferação de linfócitos, principalmente das células T-helper, o que induz à apropriada produção de citocinas, aumento da fagocitose por potencializar a atividade de macrófagos e reforço na atividade de células *natural-killers*. (SUCHNER et al., 2002).

Na ausência de L-arginina, células humanas e de camundongos possuem prejudicada capacidade de proliferação e expressão da cadeia CD3- ζ (principal elemento de transdução de sinal do receptor de células T); efeito este revertido pela adição de arginina exógena (CHOI et al., 2009; ZEA et al., 2004; BANSAL & OCHOA, 2003).

Arginina dietética pode aumentar o peso do timo em animais saudáveis, efeito diretamente relacionado com o aumento no número de linfócitos T tímicos, além de possuir efeito direto sobre a atividade de células T *in vivo* e *in vitro* (STECHMILLER et al, 2004). YEH et al. (2002), estudando modelo de ratos sépticos, com o objetivo de verificar os efeitos da infusão parenteral de arginina na população de células T, verificaram que a razão CD4:CD8 foi significativamente maior no grupo infundido com arginina do que no grupo controle, que recebeu glicina. Este resultado sugere que a imunidade foi aumentada no grupo que recebeu arginina.

É notório o efeito da arginina sobre a imunidade da mucosa intestinal. SHANG et al, 2004, em estudo realizado em ratos com indução da sepse, verificaram que a administração de arginina enteral na proporção de 2% do valor calórico total (VCT) diário, aumentou o número de linfócitos nas placas de Peyer, bem como os níveis de IgA secretória tenderam a ser aumentados nos grupos tratados com arginina antes da ligação e perfuração cecal. O mesmo grupo de pesquisa verificou em estudo posterior que a suplementação de arginina aumenta a expressão de RNA mensageiro tanto para a produção de citocinas Th1 (INF- γ e IL-2) e citocinas Th2 (IL-4 e IL-10), sugerindo que a arginina atua tanto na resposta imunológica celular quanto na humoral (SHANG et al., 2005).

A arginina também eleva a fagocitose pelos neutrófilos e a adesão de células polimorfonucleares, bem como a atividade de macrófagos (STECHMILLER et al.,

2004). A proliferação e a ativação de macrófagos requerem altas concentrações de arginina para a síntese protéica e produção de óxido nítrico, na via clássica de ativação, provida por citocinas do tipo Th1 como o interferon- γ , ou para a produção de poliaminas e prolina, na via alternativa de ativação, provida por citocinas Th2 como IL-10 e IL-4 (YERAMIAN et al., 2006; STECHMILLER et al., 2004). Desta forma, nos macrófagos, a L-arginina pode ser metabolizada pela iNOS para produzir o óxido nítrico, importante em mecanismos citotóxicos destas células, ou pela arginase I ou arginase II, para produzir uréia e L-ornitina, sendo o último substrato para as poliaminas (ZEA et al., 2004).

O óxido nítrico é componente da defesa não específica do hospedeiro mostrando-se efetivo contra parasitas intra e extracelulares. A citotoxicidade envolve a geração de peroxinitrito, produzido a partir da reação entre o óxido nítrico e o radical superóxido. O peroxinitrito interage com lipídeos, DNA e proteínas, promovendo danos oxidativos e desta forma, o ON é capaz de mediar os efeitos citotóxicos dos macrófagos (WILEY et al., 2007; HARDY et al., 2006). No entanto, a expressão aumentada de iNOS nos macrófagos e outros tipos celulares durante a ativação da resposta imunológica tal como em casos de sepse e infecções graves, pode causar vasodilatação excessiva, instabilidade hemodinâmica e lesão aos tecidos do hospedeiro, por se tratar de resposta não específica (HARDY et al., 2006; BANSAL & OCHOA, 2003). Por este motivo, embora seja claro que a arginina tenha importante função imunomoduladora, o uso é controverso em pacientes sépticos, uma vez que a sepse é caracterizada por aumentada produção de óxido nítrico pela iNOS (HARDY et al., 2006).

A arginase I, por outro lado, prejudica a resposta das células T por modular a disponibilidade de arginina. A alta atividade de arginase, reportada no trauma, doenças infecciosas e inflamações crônicas, coincide com o transporte de arginina extracelular para o interior das células, gerando redução da arginina no microambiente (CHOI et al., 2009; BANSAL & OCHOA, 2003; HESSE et al., 2001). Assim, tem sido demonstrado que doentes críticos possuem baixos níveis de arginina circulante, que são correlacionados com altas taxas de mortalidade (HARDY et al., 2006).

Verifica-se então, a necessidade de mais estudos sobre os efeitos da arginina e do ON, principal produto do metabolismo desta, sobre a resposta imunológica nas diversas condições clínicas.

2.2.2.3 Dano à estrutura intestinal

Estruturalmente, o intestino compreende uma camada única de células epiteliais colunares, organizadas a fim de formar barreira entre o lúmen intestinal e o ambiente extra-intestinal. O tráfego de moléculas através do epitélio intestinal ocorre por duas rotas: paracelular (entre as células) ou transcelular (através das células) (ACHESON & LUCCIOLI, 2004; WIEST & RATCH, 2003).

A via paracelular é dependente da integridade de complexos de junção formados por junções do tipo *tight*, junções intermediárias e desmossomos, que em conjunto funcionam como filtro seletivo para o tráfego de pequenas moléculas entre o lúmen e a mucosa. Em contraste, a via transcelular permite o transporte de grandes moléculas através do citoplasma de células epiteliais, que pode ocorrer de forma não específica como consequência da pinocitose ou endocitose de constituintes da membrana. Em adição, as células M (subtipo de células epiteliais que atravessam agregados linfóides) são especializadas no transporte transcelular de microorganismos e antígenos para o GALT subjacente (GAREAU et al., 2008; WIEST & RATCH, 2003).

A manutenção apropriada de ambas as vias é essencial à homeostase intestinal por regular o tráfego de alimentos e antígenos bacterianos. Porém, a barreira intestinal é especialmente vulnerável a condições patológicas como queimaduras, choque, trauma ou estresse cirúrgico, e desta forma, o comprometimento dessa tem sido apontado como o maior mecanismo indutor da translocação bacteriana (SAMEL et al., 2002; BERG, 2001; THOMAS et al., 2001).

A translocação pode ocorrer pelas rotas transcelular e paracelular ou pela combinação das duas. A via transcelular ocorre sob controle específico de bombas e canais de membranas, enquanto a paracelular é permitida pela quebra de junções *tight*. Na maioria das vezes, a translocação ocorre predominantemente de forma transcelular através de tecidos necrosados e lesados ou pelas células M (MACFIE, 2004; WIEST & RATCH, 2003).

Os estudos não são conclusivos quanto à influência de danos na mucosa sobre a permeabilidade intestinal e consequente translocação. NAABER et al. (2000), não verificaram associação clara entre translocação e mudanças morfológicas graves na mucosa, tais como necrose e hemorragia, enquanto CHANG e cols. (2005), observaram que a injúria da mucosa aumentou significativamente a permeabilidade intestinal. Desta forma, o ideal é que os métodos de avaliação da permeabilidade intestinal sejam utilizados juntamente com outros métodos para verificar a injúria

epitelial, tais como a histologia intestinal ou as medidas urinárias de proteína ligante de ácido graxo intestinal (IFAB) (BESSELINK et al, 2009).

2.2.2.3.1 Testes de permeabilidade intestinal

Medidas não invasivas, para avaliação da permeabilidade intestinal, têm sido empregadas como preditoras do índice de integridade da barreira epitelial, para conseqüente avaliação do risco de translocação bacteriana (ELLIS, 2004).

A permeabilidade intestinal é descrita como a taxa de aparecimento ou desaparecimento de uma substância no lúmen intestinal. É considerada quando se observa a passagem de moléculas com peso molecular acima de 150 daltons pela barreira intestinal (SUN et al., 1998).

Modelos animais desenvolvidos para o estudo da permeabilidade utilizam marcadores específicos com a finalidade de acompanhar a passagem da bactéria pela mucosa intestinal (SAMEL et al., 2002). Estes marcadores possuem como características comuns a solubilidade em água, a resistência à destruição intestinal, a não toxicidade, e a característica de serem facilmente detectáveis na urina e separados de compostos similares (ARRIETA et al., 2006).

São utilizados diversos métodos de avaliação da permeabilidade intestinal e não se pode afirmar qual marcador ou teste é o ideal, uma vez que não existe padrão ouro para avaliação da permeabilidade. A excreção urinária de carboidratos não absorvíveis tais como a lactulose e manitol, ou de polietilenoglicol (PEG) oralmente administrados tem sido empregada para avaliar a permeabilidade intestinal (JORGENSEN et al., 2006; KATOZIAN et al., 2005; SUN et al., 2005).

Algumas vantagens têm sido demonstradas com o uso de isótopos radioativos de alto peso molecular, tais como ^{51}Cr -EDTA e $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -DTPA, uma vez que estes complexos radiomarcados apresentam características comuns aos oligossacarídeos e possuem o benefício de serem fáceis de medir. O $^{99\text{m}}\text{Tc}$ por possuir meia-vida curta (seis horas) permite que maiores doses possam ser utilizadas, facilitando a recuperação em pequenas amostras de sangue ou urina (JORGENSEN et al., 2006; SUN et al., 1998).

2.2.2.3.2 Arginina e dano intestinal

Os efeitos da arginina na manutenção da integridade da mucosa intestinal têm sido foco de diversas investigações. Em modelo de isquemia/reperfusão intestinal, a arginina melhorou o peso da mucosa do duodeno, jejuno e íleo e o índice de

proliferação celular jejunal em ratos. Reduziu ou preveniu, também, o dano morfológico e funcional do intestino, além de ter atuado na proteção da peroxidação lipídica e manutenção dos níveis teciduais de glutathione, um potente varredor de radicais livres (CINTRA et al., 2008; SAYAN et al., 2008; SUKHORTINIK et al., 2005).

Estudos têm sugerido que o óxido nítrico contribua para a manutenção da integridade da mucosa intestinal, possivelmente por aumentar o fluxo de sangue e nutrientes para tecidos lesados, além de proteger o intestino da agressão por mediadores inflamatórios. A inibição da síntese tem demonstrado aumentar a permeabilidade intestinal o que sugere que este possa regular a função e a barreira (CINTRA et al., 2008; SUKHORTINIK et al., 2005). No entanto, os mecanismos protetores do ON na mucosa intestinal ainda não estão totalmente elucidados (NADLER & FORD, 2000).

O ON previne danos na função e estrutura dos enterócitos provocados pelo trauma cirúrgico e isquemia/reperfusão (SAYAN et al., 2008; THOMAS et al. 2001; KHANNA et al., 2000; WARD et al., 2000). Estudo recente apontou que o óxido nítrico pode desempenhar dupla função, apresentando efeitos citotóxicos ou citoprotetores. O grupo de pesquisa verificou que o bloqueio moderado da produção do ON teve efeitos positivos, enquanto a inibição excessiva agravou o dano tecidual (LUIKING et al., 2009).

Em baixas concentrações, o óxido nítrico parece exercer função fisiológica protetora, porém tanto a ausência de produção quanto a produção excessiva podem acarretar efeitos prejudiciais sobre a barreira intestinal (NADLER & FORD, 2000; DEITCH et al., 2002).

As altas doses induzidas pelo estímulo inflamatório podem ocasionar efeitos tóxicos sobre as células do hospedeiro, porém os mecanismos pelos quais o ON exerce função prejudicial sobre a barreira intestinal ainda estão desconhecidos (DEITCH et al., 2002). Aparentemente, esses efeitos são creditados à produção excessiva de peroxinitrito, redução dos níveis de ATP celular e abertura das junções do tipo *tight* (XU et al., 2002).

2.3 MARCAÇÃO DA BACTÉRIA COM ISÓTOPO RADIOATIVO

O tecnécio-99m (^{99m}Tc) é o radionuclídeo mais utilizado em procedimentos clínicos de medicina nuclear e em pesquisas básicas. Baixo custo, alta disponibilidade, tempo de meia-vida curto, emissão de radiação gama e energia de radiação (140Kev), fizeram do ^{99m}Tc o isótopo de escolha para marcação de radiofármacos e constituintes biológicos (ARAUJO et al., 2002; ALENCAR et al., 2002).

A marcação ocorre pois o ^{99m}Tc é um metal deficiente em elétrons e que reage com grupos doadores de elétrons como tióis, aminas etc. No caso específico das bactérias, ocorre a reação com estruturas protéicas, que possuem grupos doadores de elétrons. Essa reação pode ocorrer com proteínas da parede celular das bactérias e/ou com as proteínas citoplasmáticas, uma vez que o tecnécio penetra na célula (DINIZ et al., 1999).

Estudo, realizado por DINIZ e cols. (1999) demonstrou que a marcação com ^{99m}Tc não modificou a viabilidade da bactéria.

O emprego de bactérias radiomarcadas para estudo da translocação bacteriana apresenta vantagens sobre o método convencional que se baseia em contagem de unidades formadoras de colônias (UFC). Além de não ser necessário trabalhar em ambiente estéril durante todo o processo, permite que produtos bacterianos e fragmentos sejam detectados em sítios extraintestinais sem considerar a viabilidade, propiciando maior sensibilidade na identificação da translocação bacteriana (WHITE et al., 2006).

CAPÍTULO I

ESTUDO DOS EFEITOS DO PRÉ-TRATAMENTO COM ARGININA SOBRE A MUCOSA INTESTINAL E TRANSLOCAÇÃO BACTERIANA

RESUMO

O trabalho avaliou os efeitos da arginina na integridade da mucosa intestinal e na translocação bacteriana (TB) em camundongos submetidos à obstrução intestinal. Os camundongos foram divididos em três grupos, o grupo ARG recebeu ração acrescida de 2% de arginina; o grupo OI (obstrução intestinal) e grupo *Sham*, ração convencional. Objetivando o estudo da permeabilidade intestinal, no oitavo dia todos os animais receberam por gavagem solução de ácido dietilenotriaminopentacético (DTPA) marcado com ^{99m}Tc . Os animais foram anestesiados, após 90 minutos, e o íleo terminal ligado. O grupo *Sham* foi submetido apenas à laparotomia. Após 4, 8 e 18 horas, o sangue foi coletado para determinação da radioatividade. Amostras do íleo foram coletadas 18 horas após a operação para análise histológica. Em outro grupo de animais, a TB foi avaliada. Após sete dias de tratamento, os animais receberam 10^8 UFC/mL de ^{99m}Tc -*E.coli* por gavagem e decorridos 90 minutos, foram submetidos ao procedimento cirúrgico descrito. TB foi determinada a partir da captura de ^{99m}Tc -*E.coli* no sangue, linfonodos mesentéricos, fígado, baço e pulmões, 18 horas após a operação. A suplementação com arginina reduziu permeabilidade intestinal e TB para níveis fisiológicos e preservou a mucosa do íleo em animais submetidos à obstrução intestinal.

Palavras-chave: Imunomodulação; arginina; translocação bacteriana; mucosa intestinal

ABSTRACT

This study has evaluated the effects of arginine on intestinal mucosa integrity and bacterial translocation in mice undergoing intestinal obstruction. Mice were divided into three groups, treated for seven days prior to surgical intervention. The ARG group received a diet containing 2% arginine, the IO (intestinal obstruction) and *Sham* groups, standard chow diet. On the 8th day of treatment, all animals received DTPA (diethylenetriamine pentaacetic acid) solution labeled with ^{99m}Technetium (^{99m}Tc-DTPA) by gavage for intestinal permeability analysis. After 90 minutes, the animals were anesthetized and the terminal ileum ligated. The *Sham* group only underwent laparotomy. After 4, 8 and 18 hours, blood was collected for radioactivity determination. Samples of ileum were collected 18 hours after surgery for histological analysis. In another set of animals, bacterial translocation was evaluated. After seven days of treatment, all animals received 10⁸ CFU/mL of ^{99m}Tc-*E.coli* by gavage; 90 min later they underwent surgical procedure as described above. Bacterial translocation (BT) was determined by the uptake of ^{99m}Tc-*E.coli* in blood, mesenteric lymph nodes, liver, spleen and lungs, assessed 18 hours after the operation. Arginine supplementation reduced intestinal permeability and bacterial translocation to physiologic levels and preserved the ileum mucosal of animals undergoing IO.

Key words: Immunomodulation; arginine; bacterial translocation; intestinal mucosa.

1. INTRODUÇÃO

O trato gastrointestinal desempenha inúmeras funções além da digestão. Dentre elas, a formação de barreira contra microorganismos vivos e antígenos presentes no interior do lúmen intestinal, a chamada função de barreira intestinal. A quebra desta barreira pode resultar na passagem de bactérias viáveis e respectivos subprodutos aos linfonodos mesentéricos e órgãos distantes, processo denominado translocação bacteriana (GATT et al., 2007).

Permeabilidade intestinal aumentada, dano da mucosa intestinal e translocação bacteriana (TB) estão associadas a doenças graves. A perda da barreira intestinal e subsequente translocação de bactérias contribuem para desenvolvimento de hipermetabolismo, injúria de órgãos distantes e sepse (DEITCH, 1990).

Os benefícios de fórmulas e nutrientes específicos com atividade imunomoduladora são demonstrados na melhoria da resposta imunológica do hospedeiro e na modulação da resposta inflamatória, balanço nitrogenado e síntese protéica após a injúria (ZULFIKAROGLU et al., 2003). Embora a maioria das fórmulas industrializadas contenha combinação de arginina, ácidos graxos ômega-3, glutamina, antioxidantes e ácido nucléico, a arginina tem despertado atenção especial (ZHOU & MARTINDALE, 2007).

A arginina é um aminoácido condicionalmente essencial com função no transporte, estoque, excreção de nitrogênio e remoção da amônia via ciclo da uréia. Em estados catabólicos tais como trauma e sepse, a arginina pode se tornar essencial devido às alterações no metabolismo (DUGGAN et al., 2002). Além de ser carreadora de nitrogênio e componente de proteínas, é precursora da síntese de moléculas com importantes funções biológicas incluindo ornitina, poliaminas, óxido nítrico, creatina, agmatina e outras (CHIARLA et al., 2006).

A suplementação com arginina é efetiva em melhorar a função de barreira intestinal e desenvolvimento vascular (WANG et al., 2008). O pré-tratamento com arginina aumenta a sobrevivência e a função de barreira intestinal após a isquemia mesentérica (SCHEIFFER et al., 1996). Além disso, dietas enriquecidas com arginina protegem a mucosa intestinal da enterite induzida por radiação, como indicado por capacidade de cicatrização acelerada, bem como previnem a translocação bacteriana (ERSIN et al., 2000).

Neste contexto, o propósito do presente estudo foi investigar os efeitos da arginina na integridade da mucosa intestinal e, conseqüentemente, na translocação

bacteriana, utilizando modelo experimental extremamente agressivo, a obstrução intestinal.

2.0 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Animais e Tratamento

Camundongos Swiss, machos, adultos, pesando entre 25 e 30 gramas foram utilizados. Os animais foram randomizados em três grupos, de acordo com cada experimento (determinação da permeabilidade intestinal e translocação bacteriana): (1) grupo ARG, que recebeu ração suplementada com arginina (2% das calorias totais da dieta) e os animais foram submetidos à obstrução intestinal; (2) grupo OI, tratado com ração convencional e também submetido à obstrução intestinal; e (3) grupo *Sham*, tratado com ração convencional e sem obstrução intestinal.

Os animais foram tratados nos sete dias anteriores à intervenção cirúrgica com rações isocalóricas e isoprotéicas e monitorados diariamente quanto à ingestão alimentar e ganho de peso. Todos os animais tiveram livre acesso à água ao longo do período experimental.

A ração suplementada com arginina foi preparada seguindo a composição da dieta descrita por QUIRINO et al. (2007). Os mesmos ingredientes, com algumas modificações nas quantidades, com o propósito de preparar a ração com a mesma composição de macronutrientes presentes na ração convencional, foram utilizados.

Este estudo foi aprovado pelo comitê de Ética para Experimentação Animal da Universidade Federal de Minas Gerais (CETEA/UFMG), sob o protocolo nº 109/2007.

2.2 Procedimento Cirúrgico

Os camundongos receberam anestesia intraperitoneal com solução de xilazina (8mg/kg) e ketamina (60 mg/kg). O abdomen foi aberto por incisão medial e o íleo terminal isolado e ligado. A incisão abdominal foi fechada em duas camadas. Os animais do grupo *Sham* passaram apenas por simulação da operação (laparotomia somente).

2.3 Estudo da Permeabilidade Intestinal

A avaliação da permeabilidade intestinal contemplou o uso de 45 camundongos, divididos em grupos de 15 animais e tratados como descrito no item 2.1. Após sete dias, todos os camundongos receberam por gavagem 0,1 mL de solução de ácido

dietilenotriaminopentacético (DTPA) marcada com 18,5 MBq de ^{99m}Tc . Após 90 minutos, a obstrução intestinal foi realizada em todos os camundongos, exceto nos do grupo *Sham*, por meio do procedimento descrito (item 2.2). Após 4, 8 e 18 horas, cinco animais por cada tempo investigado foram anestesiados e 500 μL de sangue foram coletados e colocados em tubos apropriados para a determinação da radioatividade. Os dados foram expressos como % dose, e calculados com base na seguinte equação:

$$\% \text{ da dose injetada no sangue} = \frac{\text{cpm no sangue}}{\text{cpm da dose administrada}} \times 100$$

cpm: contagens por minuto

2.4 Histologia do Íleo

Amostras do intestino delgado foram retiradas para análise histológica 18 horas após a operação. Um anel de 1 cm do íleo distal, adjacente à obstrução intestinal, foi ressecado, fixado em solução de formalina, desidratado, embebido em parafina, cortado em secções entre 4 e 5 μm , corado por hematoxilina e eosina (H&E), codificado e analisado qualitativamente em microscópio ótico, por patologista que desconhecia as condições experimentais de cada grupo.

2.5 Radiomarcagem da *E.coli*

Amostra de cultura de *E.coli* ATCC-10536, crescida “overnight” em ágar tripticaseína de soja, foi transferida para 10 mL de solução salina esterilizada. A concentração bacteriana foi ajustada em espectrofotômetro a 580 nm de comprimento de onda, a 31% de transmitância, a qual corresponde a aproximadamente 10^8 unidades formadoras de colônia (UFC)/mL. Alíquota da suspensão bacteriana (2mL) foi incubada em tubos contendo 1 mL de solução de cloreto estânico (580 μM , pH 7,0) a 37°C por 10 minutos. Após a incubação, 37,0 a 55,5 MBq de tecnécio-99m (^{99m}Tc), obtido por eluição em gerador esterilizado de $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$ (IPEN/Brasil) foram adicionados e a preparação foi mantida a 37°C por mais 10 minutos. Os tubos foram então centrifugados a 3000 g (força gravitacional) por 25 minutos. Este procedimento foi repetido por três vezes. A radioatividade do sobrenadante e do precipitado foi medida em calibrador de dose, após a última centrifugação (CRC® Dose Calibrator, Capintec, Ramsey, NJ, USA) e o percentual de ^{99m}Tc incorporado às células bacterianas foi determinado usando a seguinte equação (DINIZ et al., 1999):

$$\% \text{ de marcação} = \frac{\text{cpm do precipitado}}{\text{cpm do precipitado} + \text{cpm do sobrenadante}} \times 100$$

cpm: contagens por minuto

2.6 Translocação Bacteriana

Três grupos de sete animais cada foram utilizados como descrito no item 2.1. Após sete dias de tratamento, 0,1 mL de suspensão contendo 1.8 MBq de $^{99m}\text{Tc-E.coli}$, que corresponde a 10^7 UFC/mL, foi administrada por gavagem a todos os animais e decorridos 90 minutos, os camundongos foram operados como descrito. Após 18 horas do procedimento cirúrgico, os animais foram sacrificados e sangue, linfonodos mesentéricos (LNM), fígado, baço e pulmões foram removidos, pesados e acondicionados em tubos para avaliação da radioatividade. As amostras foram contadas em contador de radiação com cristal de NaI (ANSR-Abbot, Chicago, IL, USA). Os resultados foram expressos como contagem por minuto (cpm/g de tecido).

2.7 Análises estatísticas

Dados de ganho de peso, consumo diário de ração, ingestão calórica e nitrogenada foram comparados usando a análise de variância (ANOVA). Os dados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão (DP). Os dados de translocação bacteriana foram analisados utilizando o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis e *post hoc* de Dunn. A permeabilidade intestinal foi avaliada pelo teste t para duas amostras independentes. Foi considerado significativo o $p < 0,05$.

Todas as análises foram realizadas utilizando o programa BioEstat versão 3.0 (Sociedade Civil Mimirauá/MCT-CNPQ).

3.0 RESULTADOS

3.1 Ganho de peso, consumo diário de ração, ingestão calórica e nitrogenada

O ganho de peso, a ingestão diária de ração, a ingestão calórica e nitrogenada dos animais foram similares em todos os grupos (Tabela I.1).

Tabela I.1 - Ganho de peso, consumo diário de ração, ingestão calórica e nitrogenada

	Grupos		
	<i>Sham*</i>	<i>OI*</i>	<i>ARG*</i>
Ganho de peso (g)	2,64±0,50	2,87±0,23	2,21±0,32
Consumo de ração (g/dia)	4,96±0,38	4,82±0,63	4,34±0,41
Ingestão calórica (kcal/dia)	16,02±1,30	16,46±2,09	14,39±1,60
Ingestão de nitrogênio (g/dia)	0,14±0,02	0,15±0,01	0,15±0,01

*Dados expressos como média±DP (n=7)

3.2 Efeitos da arginina na permeabilidade intestinal

A permeabilidade intestinal foi significativamente maior no grupo *OI* quando comparada ao grupo *Sham* ($p<0,05$). Os camundongos que receberam a dieta suplementada com arginina tiveram a permeabilidade intestinal reduzida em todos os tempos investigados ($p<0,05$). Não houve diferença significativa entre o grupo *ARG* e o grupo *Sham* (Figura I.1).

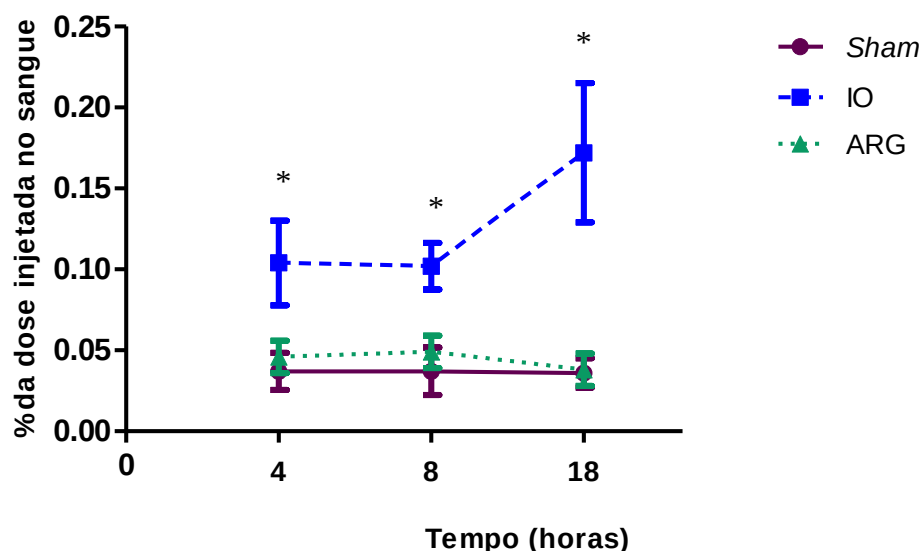


Figura I.1 – Efeitos da arginina na permeabilidade intestinal. As barras mostram o DP. Os dados são expressos em médias $\pm$ DP (n=5). * $p < 0,05$.

3.3 Efeitos da arginina na translocação bacteriana

Os dados apresentados na Tabela I.2 mostram maior captação de $^{99m}\text{Tc-E.coli}$ no sangue e órgãos investigados dos animais do grupo OI quando comparados aos do grupo *Sham* em todos os tempos investigados ($p < 0,05$). Os animais tratados com arginina tiveram captação da $^{99m}\text{Tc-E.coli}$ significativamente mais baixa do que as encontrado nos animais OI, no sangue e todos os órgãos investigados. Não houve diferença estatística entre os grupos ARG e *Sham*.

Tabela I.2 - Biodistribuição da *Escherichia coli* marcada com tecnécio-99m 18 horas após a obstrução intestinal em animais tratados com arginina

Órgão/Sangue	<i>Sham</i> (cpm/g)	OI (cpm/g)	ARG (cpm/g)
Sangue	41,30 ^a	175,79 ^b	60,60 ^a
Fígado	204,80 ^a	1154,49 ^b	556,52 ^a
Baço	109,09 ^a	1022,22 ^b	390,00 ^a
Pulmões	14,29 ^a	794,12 ^b	110,52 ^a
LNM	166,67 ^a	660,00 ^b	100,00 ^a

cpm/g, contagens por minutos/g de tecido; LNM, linfonodos mesentéricos.

Letras diferentes na mesma linha indicam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0.05$).

3.4 Histologia do Íleo

Os animais do grupo *Sham* não apresentaram alterações relevantes e foram usados como padrão de comparação (Figura 1.2A, B). Mudanças destrutivas foram observadas no grupo OI, incluindo intenso edema da barreira intestinal, principalmente na lâmina própria intestinal, bem como dilatação e congestão de vasos sanguíneos. Foi verificado ainda aumento discreto na celularidade da lâmina própria. Além disto, alterações epiteliais reativas, erosões superficiais, edema e alargamento das vilosidades intestinais foram observadas. Células caliciformes foram raramente visualizadas. (Figura 1.2C, D).

Os animais submetidos à obstrução intestinal e tratados com arginina apresentaram manutenção da integridade da estrutura tecidual. O epitélio das vilosidades foi preservado e apenas discreto edema e alargamento foram observados na lâmina própria. As células caliciformes estiveram normalmente presentes (Figura 1.2 E, F).

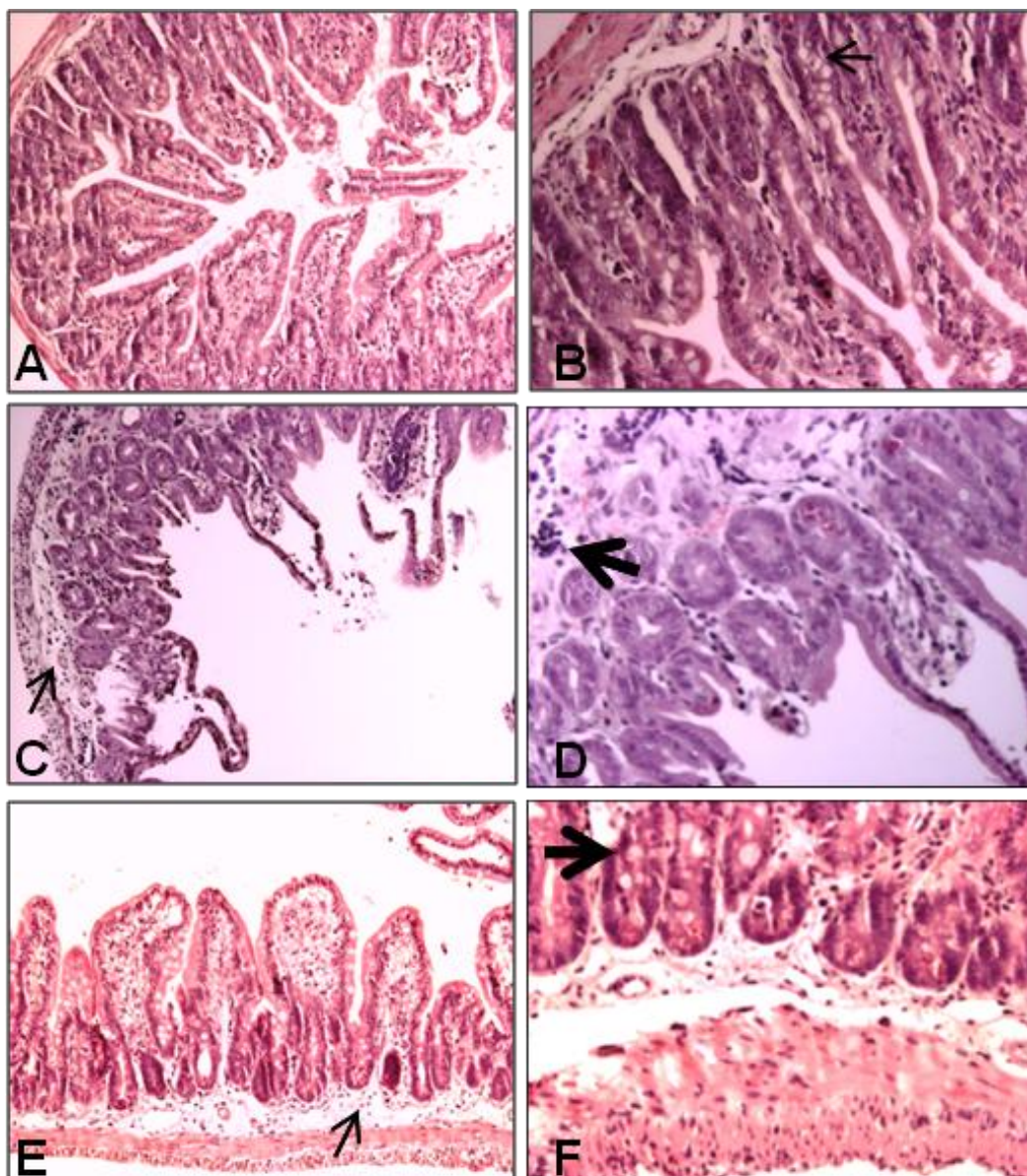


Figura 1.2 - Avaliação histológica do íleo distal. (A,B) grupo *Sham*, células caliciformes (seta fina); (C,D) grupo OI, infiltração de células mononucleares (seta larga) e edema (seta fina); (E,F) grupo ARG, preservação da estrutura intestinal, edema discreto (seta fina) e células caliciformes (setas largas). H&E. A,C,E: objetiva 10x; B,D,F: objetiva 20x.

4.0 DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

A arginina é um aminoácido dibásico com vários efeitos metabólicos e imunológicos especialmente em situações de estresse (GURBUZ et al., 1998). Assim, o propósito deste estudo foi avaliar a função da arginina na integridade da barreira intestinal e, conseqüentemente, na translocação bacteriana.

No presente estudo, os animais receberam dietas isocalóricas e isoprotéicas e tiveram ingestão alimentar e ganho de peso similares, o que nos permite inferir que os resultados dizem respeito de fato, à suplementação com arginina. Ingestão alimentar e ganho de peso semelhante entre os grupos são dados importantes, visto que estudos prévios em animais e humanos mostraram que a desnutrição induz a TB (WELSH et al., 1998; DEITCH et al., 1992). Além disso, foi observada a ingestão similar de nitrogênio entre os grupos estudados, mostrando que os efeitos da arginina não foram devido à alta ingestão nitrogenada, mas pela ação da arginina *per se*.

A falha na função de barreira intestinal, resultando em aumento da permeabilidade mucosa, tem sido hipotetizada como a maior promotora da TB (BERG et al., 1995). A permeabilidade pode ser estimada acuradamente por vários métodos. Tradicionalmente, a permeabilidade intestinal é investigada “in vivo” por medidas da concentração urinária ou sanguínea de grandes substâncias administradas oralmente (BJARNASON et al., 1995). O ^{99m}Tc -DTPA é uma macromolécula que raramente atravessa a barreira intestinal. Entretanto, quando a permeabilidade intestinal está aumentada devido à lesão da mucosa, a presença de DTPA na corrente sanguínea pode ser detectada (JORGENSEN et al., 2006).

Este método é simples de ser executado e no presente estudo foi possível mostrar a associação entre o dano intestinal (Figura 2) e permeabilidade intestinal aumentada (Figura 1) nos animais submetidos à obstrução.

A TB é a passagem de bactérias viáveis, partículas inertes e outras macromoléculas através da mucosa intestinal para os linfonodos mesentéricos e outros órgãos internos (GATT et al., 2007; MACFIE, 2004; KABAROUDIS et al., 2003; WOODCOCK et al., 2001). A translocação bacteriana tem sido estudada em animais submetidos a várias condições patológicas tais como choque hemorrágico (BAKER et al., 1988), desafio com endotoxinas (MISHIMA et al., 1999), trauma térmico (GUN et al., 2005), pancreatite aguda (SCHWARZ et al., 2000), isquemia e obstrução intestinal (SAMEL et al., 2002).

A obstrução intestinal, de acordo com diversos estudos, provoca ruptura do epitélio intestinal, com subsequente aumento da permeabilidade intestinal e então TB

(QUIRINO et al., 2007; OLIVEIRA et al., 2006; ; KABAROUDIS et al., 2003; SAMEL et al., 2002; ANTEQUERA et al., 2000). No entanto, a translocação bacteriana é um processo fisiológico e essencial para regulação da imunidade local e sistêmica (LICHTMAN, 2001; MACFIE et al., 2000). Neste trabalho, observou-se níveis mínimos de radioatividade (cpm) no grupo *Sham* (Tabela 2). Por outro lado, animais submetidos à obstrução apresentaram alta TB, exceto aqueles tratados com arginina. Estes resultados indicam que a suplementação de arginina foi capaz de reduzir a TB.

Outros autores também mostraram que a oferta de arginina reduziu a incidência de TB em ratos após injúria térmica (HORTON et al., 1998) e inibiu a TB induzida por endotoxinas em camundongos (ADJEL et al., 1995). Entretanto, nestes estudos a TB foi verificada por técnicas tradicionais de cultura sanguínea, que subestimam a quantidade de bactérias não-viáveis que também translocam do lúmen intestinal. A adição de marcadores radioisotópicos a cepas específicas de bactérias permite que os produtos bacterianos e fragmentos sejam detectados nos sítios extra intestinais, desconsiderando a viabilidade (WHITE et al., 2006).

Em concordância com os resultados obtidos no presente estudo, QUIRINO et al. (2007) mostraram que a suplementação de arginina reduziu a TB para níveis fisiológicos em ratos submetidos a obstrução intestinal. Porém, nesse estudo os animais não foram tratados com dietas isocalóricas e isoprotéicas.

No presente trabalho também foi utilizado o modelo de obstrução intestinal, um procedimento extremamente agressivo, o qual induz a importante dano intestinal e consequentemente TB. De acordo com MASSBERG et al. (1994), a falha na perfusão microvascular após o estresse cirúrgico pode ser responsável por alterada função intestinal.

A arginina é um aminoácido importante e versátil e os efeitos benéficos podem ser devido aos mais diversos fatores, dentre eles o fato de ser o único precursor para a síntese de óxido nítrico, uma molécula com função na melhoria da vasoconstrição e no fluxo sanguíneo do intestino delgado durante a bacteremia (SPAIN et al., 1994).

Assim, na presente investigação, verificou-se que a administração de arginina preveniu a ruptura do epitélio intestinal, reduzindo a permeabilidade intestinal e a TB. No entanto, os mecanismos precisos associados à função protetora da arginina em tais condições permanecem pouco claros e requerem novos estudos.

CAPÍTULO II

AVALIAÇÃO DA VIA DE AÇÃO DA ARGININA NA TRANSLOCAÇÃO BACTERIANA

RESUMO

Foi investigada a função do ON como possível mediador da ação da arginina na prevenção do dano intestinal em camundongos submetidos à obstrução intestinal e a ação da arginina e do óxido nítrico sobre a resposta imunológica sistêmica e local. Os camundongos foram divididos em quatro grupos. O Grupo ARG foi tratado com ração contendo arginina 2%, o grupo ARG+L-NAME, recebeu ração com 2% de arginina e L-NAME, por gavagem e grupos *Sham* e OI, foram tratados com ração convencional. Após sete dias, todos os animais receberam por gavagem, *E.coli* radiomarcada e após 90 minutos foram anestesiados e submetidos à OI, exceto aqueles do grupo *Sham*. Os camundongos foram submetidos à eutanásia, após 18 horas, e a TB foi avaliada para linfonodos mesentéricos, sangue, fígado, baço e pulmões. Em outro experimento, a injúria intestinal foi avaliada a partir da análise da permeabilidade intestinal e análises histológicas do íleo. Os níveis de IgA intestinal e citocinas séricas Th1 e Th2 (INF- γ e IL-10, respectivamente) foram determinados pelo método de ELISA. A suplementação com arginina reduziu a TB. Entretanto, nos animais que receberam o tratamento com ARG+L-NAME a TB foi significativamente maior à observada no grupo ARG ($p<0,05$). A permeabilidade intestinal foi similar para os grupos ARG e ARG+L-NAME e menor do que a observada no grupo OI ($p<0,05$). Análise histológica mostrou preservação da mucosa intestinal no grupo ARG+L-NAME, em relação ao grupo OI. O tratamento com arginina aumentou os níveis de IL-10 Em relação aos observados nos grupos *Sham* e OI ($p<0.05$). As concentrações de citocinas e sIgA foram similares nos grupos ARG+L-NAME e *Sham*. Pode-se inferir que a arginina reduziu a TB em camundongos submetidos à obstrução intestinal devido à produção de óxido nítrico e os efeitos deste na modulação das citocinas Th1/Th2 sistêmicas e aumento da produção de sIgA intestinal.

Palavras-chave: Arginina; óxido nítrico; resposta imunológica

ABSTRACT

The role of nitric oxide as a possible mediator of arginine role preventing bacterial translocation (BT) and gut damage in mice after intestinal obstruction (IO) was investigated, such as the effects of pretreatment with arginine on the systemic and local immunological response. Mice were divided into four groups. Group ARG received chow containing 2% arginine, group ARG+L-NAME received the same diet and L-NAME by gavage. IO and *Sham* groups were fed standard chow. After seven days, animals were gavaged with radiolabeled *E.coli*, anesthetized and underwent IO, except those in the *Sham* group. Animals were euthanased after eighteen hours, and BT was evaluated for mesenteric lymph nodes, blood, liver, spleen and lungs. In another experiment, the intestinal injury was evaluated regarding the intestinal permeability and ileum histological analyses. The intestinal IgA levels and serum Th1 and Th2 cytokines (INF- γ e IL-10, respectively) were studied by ELISA method. Arginine supplementation reduced BT ($p<0.05$). However, in the ARG+L-NAME treatment, BT was significantly higher than in the ARG animals ($p<0.05$). Intestinal permeability in groups ARG and ARG+L-NAME was similar decreased when compared with the IO group ($p<0.05$). Histology analysis showed preservation of the intestinal mucosa in ARG+L-NAME group when compared to IO group. Arginine treatment increased IL-10 and sIgA levels when compared with groups *Sham* e IO ($p<0.05$). The cytokines and sIgA concentrations were similar in the groups ARG+L-NAME and *Sham*. We can infer that arginine reduced TB in mice after IO due the nitric oxide production and this mediator effects in Th1/Th2 cytokines modulation and increased intestinal IgA production.

Key words: Arginine, nitric oxide, immune response

1. INTRODUÇÃO

Desordens locais ou sistêmicas, tais como isquemia e obstrução intestinal, choque ou sepse podem prejudicar a função de barreira intestinal, aumentar a permeabilidade da mucosa e, conseqüentemente, provocar a translocação bacteriana. Estas desordens agravam ainda mais o evento primário, podendo levar à falência múltipla de órgãos e à morte (DING et al., 2004; SAMEL et al., 2003).

Pesquisas prévias conduzidas pelo nosso grupo mostraram que a arginina preserva a integridade da barreira intestinal e previne a translocação bacteriana (TB) em camundongos e ratos após a obstrução intestinal (VIANA et al., 2010; QUIRINO et al., 2007). Entretanto, a via envolvida neste processo não está elucidada.

A arginina, importante substrato imunomodulador, tem ação principalmente via produtos do metabolismo, tais como a prolina, que é componente essencial na síntese de colágeno e poliaminas. Estas estão envolvidas na divisão e replicação celular e síntese protéica, processos essenciais para a manutenção da integridade intestinal (MUNDER, 2009; FLYN et al., 2002). Porém, a arginina tem recebido destaque especial por ser o único substrato para a síntese de óxido nítrico (ON), o principal vasodilatador não adrenérgico e não colinérgico do organismo (RHOADS & WU, 2009).

Evidências experimentais mostraram que a arginina possui importante papel na melhoria da função imunológica de animais sob estresse catabólico, principalmente por aumentar a citotoxicidade de macrófagos via produção de óxido nítrico e aumento da produção de células T *helper* (FAN et al., 2009; WILEY, 2007; HARDY et al., 2006; SHANG et al., 2005; OCHOA et al., 2001).

Estudos sugerem que a arginina dietética pode aumentar o número de linfócitos T CD4+, que atuam na síntese de citocinas (OCHOA, 2001; KUNG et al., 2001; KOBAYASHI et al., 1998). Além disso, a suplementação com arginina aumenta a expressão de RNA mensageiro para a produção de citocinas Th1 e Th2, sugerindo que a arginina atua tanto na resposta imunológica celular quanto na humoral (SHANG et al., 2005).

É notório o efeito da arginina sobre a mucosa intestinal. A suplementação com arginina pode melhorar o índice de proliferação de células intestinais, reduzir a injúria da mucosa intestinal e aumentar a produção de sIgA, atuando na barreira intestinal por mecanismos imunológicos e não imunológicos (CINTRA et al., 2008; SAYAN et al., 2008; QUIAO et al., 2005; SUKHORTINIK et al., 2005).

O óxido nítrico possui papel controverso no intestino. Apresenta potente ação bactericida contra grande variedade de microorganismos, incluindo os pertencentes à microbiota intestinal. Investigações sugerem o benefício da suplementação com arginina dietética sobre a barreira intestinal, confirmando a função protetora (SAMEL et al., 2003; NADLER et al., 2000). De forma adversa, a super produção que ocorre quando há estímulo à expressão da iNOS, não atua na resposta antimicrobiana. Essa parece funcionar como agente autotóxico nos enterócitos, eventualmente resultando em perda da integridade das junções do tipo *tight* e conseqüente aumento da permeabilidade da mucosa e da translocação bacteriana (SAMEL et al., 2003; DEMIRKIRAN et al., 2006). Como a L-arginina é o único substrato fisiológico para a formação de ON, não é conhecido se a administração deste aminoácido condicionalmente essencial possui efeito benéfico sobre a alterada função intestinal (THOMAS et al., 2001).

Assim, no presente estudo, os animais foram submetidos à obstrução intestinal, modelo extremamente agressivo e que induz à translocação bacteriana, a fim de avaliar a função do ON como possível mediador da ação da arginina na prevenção do dano intestinal em camundongos submetidos à obstrução intestinal. Além disso, verificou-se a ação da arginina e do óxido nítrico sobre a resposta imunológica sistêmica, pela avaliação do balanço de citocinas Th1 e Th2, e local, a partir da análise da sIgA no fluido intestinal, com o objetivo de elucidar se a modulação da resposta imunológica também é possível mecanismo pelo qual a arginina atua na prevenção da translocação bacteriana.

2.0 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Animais e Tratamento

Camundongos Swiss, adultos (5 semanas), machos, pesando entre 25 e 30 g foram usados neste estudo. Para cada experimento (avaliação da permeabilidade intestinal, TB, dosagem de citocinas e de slgA) os animais foram randomizados em quatro grupos:

- I. Grupo *Sham*, tratado com ração convencional (Labina®) e ausência de obstrução intestinal;
- II. Grupo OI, tratado com ração convencional (Labina®) e submetido à obstrução intestinal;
- III. Grupo ARG, que recebeu ração suplementada com arginina (2% das calorias totais) segundo a técnica proposta por QUIRINO et al, (2007); e passou pelo procedimento de indução da obstrução intestinal;
- IV. Grupo ARG + L-NAME, tratado com ração suplementada com arginina, além de ter recebido por gavagem o L-NAME, bloqueador não seletivo da enzima óxido nítrico sintase, na proporção de 0,3 mg/kg/dia.

Os animais foram tratados nos sete dias anteriores à intervenção cirúrgica, com dietas isocalóricas e isonitrogenadas. Todos os animais tiveram livre acesso à água ao longo de todo o período experimental.

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética e Experimentação Animal da Universidade Federal de Minas Gerais (CETEA/UFMG), protocolo 109/2007, de acordo com as normas do CONCEA – Conselho Nacional de Experimentação Animal.

2.2 Procedimento Cirúrgico

Os camundongos receberam anestesia intraperitoneal, com solução de xilazina (8 mg/Kg) e quetamina (60 mg/Kg). O abdômen foi aberto por incisão medial e o íleo terminal isolado e ligado. A parede abdominal foi suturada em duas camadas. Nos animais do grupo *Sham*, o procedimento restringiu-se à laparotomia com manipulação das alças intestinais.

2.3 Radiomarcagem da *E.coli*

Cultura de *E.coli* crescida “overnight”, em solução de ágar tripticaseína foi utilizada. Esta foi transferida para 10 mL de solução salina esterilizada, com o auxílio de alça de repique. A concentração bacteriana foi ajustada para 31% de transmitância em espectrofotômetro, considerando o comprimento de onda 580 nm, o que corresponde a aproximadamente 10^8 unidades formadoras de colônia (UFC)/mL. Alíquota da suspensão bacteriana (2 mL) foi incubada em tubos contendo 1 mL de solução de cloreto estânico (580 μ M, pH 7,0) a 37°C por mais 10 minutos. Os tubos foram centrifugados a 3000 g (força gravitacional) por 25 minutos, procedimento este repetido por três vezes.

A radioatividade do sobrenadante e do precipitado, após a última centrifugação, foi medida em calibrador de dose (Capintec/CRC®-25R Dose Calibrator) e o percentual de ^{99m}Tc incorporado às células bacterianas foi determinado a partir da seguinte equação:

$$\% \text{ de marcação} = \frac{\text{cpm do precipitado}}{\text{cpm do precipitado} + \text{cpm do sobrenadante}} \times 100$$

2.4 Translocação Bacteriana

Para estudo da translocação bacteriana foram utilizados 28 animais divididos em quatro grupos distintos, com sete animais cada. Após sete dias de tratamento, 0,1 mL de suspensão contendo 1,80 MBq de ^{99m}Tc -*E.coli*, correspondendo a 10^7 UFC/mL, foi administrada por gavagem a todos os animais. Decorridos 90 minutos, os camundongos foram operados e 18 horas após o procedimento cirúrgico, os animais foram submetidos à eutanásia e sangue, linfonodos mesentéricos (LNM), fígado, baço e pulmões foram removidos, pesados e colocados em tubos para medida da radioatividade. As amostras foram contadas em contador com cristal de NaI (TI) (ANSR-Abbott, Chicago, USA). Os resultados foram expressos como contagens por minutos (cpm)/g de tecido.

2.5 Permeabilidade Intestinal

A permeabilidade intestinal foi avaliada em 60 camundongos divididos em grupos de 15 animais e tratados como descrito no item 2.1. Após sete dias, todos os animais receberam por gavagem 0,1 mL de solução de ácido dietileno triamino pentacético (DTPA) marcada com 18,5 MBq de ^{99m}Tc e 90 minutos mais tarde, foram submetidos ao procedimento cirúrgico descrito (2.2). Nos tempos de 4, 8 e 18 horas, cinco animais por período foram anestesiados e 500 μL de sangue foi coletado e colocado em tubos para a determinação da radiatividade. Os dados foram expressos como % dose, usando a seguinte equação:

$$\% \text{ da dose injetada no sangue} = \frac{\text{cpm no sangue}}{\text{cpm da dose administrada}} \times 100$$

cpm: contagens por minuto

2.6 Histologia do íleo

Amostras do intestino delgado foram coletadas para análise histológica 18 horas após a operação. Um anel do íleo distal (1cm), adjacente à obstrução intestinal, foi removido, fixado em solução de formalina a 4%, desidratado, embebido em parafina, cortado em secções entre 4 e 5 μm de espessura e corados em hematoxilina e eosina (H&E). Posteriormente, esses segmentos foram codificados e analisados ao microscópio ótico por patologista que desconhecia as condições experimentais de cada grupo.

2.7 Dosagem das Citocinas

Dezoito horas após a operação, os animais (n=5) dos quatro grupos estudados foram submetidos ao procedimento de eutanásia. O sangue foi coletado do plexo axilar e centrifugado a 1000g por 10 minutos para separação do soro, que foi estocado a -70°C até o uso. Posteriormente, os níveis de IL-10 (citocina Th2) e INF- γ (citocina Th1) no soro foram avaliados pela técnica de ELISA, utilizando kits comerciais específicos (Biosource International, Camarillo, CA, USA). Os resultados foram expressos em pg/mL.

2.8 Dosagem da sIgA

Decorridas 18 horas da operação, os animais sofreram a eutanásia. O procedimento de coleta do conteúdo intestinal baseou-se no método descrito por LIM et al. (1981). O intestino delgado foi retirado pelo corte nas junções gastroduodenal e ileocecal. O conteúdo foi removido e recolhido em tubo *falcon* previamente pesado. Posteriormente, este foi diluído na proporção de 500 mg para 2.0 mL de PBS contendo 1% de inibidor de protease (Sigma, St Louis, MO, USA). Após centrifugação a 2000g por 30 minutos, o sobrenadante foi coletado e mantido congelado a -70°C até o uso.

Posteriormente, os níveis de sIgA no fluido intestinal foram avaliados pela técnica de ELISA, na qual o anticorpo de captura anti-IgA de camundongos foi pipetado na placa de ELISA e detectado com o anticorpo de detecção anti-IgA marcado com peroxidase. Os resultados obtidos foram expressos em mg/mL.

2.9 Análises estatísticas

A permeabilidade intestinal, os dados de citocinas e sIgA foram analisados utilizando o teste t para duas amostras independentes. A translocação bacteriana foi analisada usando o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis e *post hoc* de Dunn. Foi considerado significativo o $p < 0,05$. Todas as análises foram realizadas usando o programa BioEstat Versão 3.0 (Sociedade Civil Mamiará/MCT-CNPQ).

3.0 RESULTADOS

3.1 Influência do óxido nítrico na translocação bacteriana

Os níveis de ^{99m}Tc -*E.coli* foram significativamente maiores no grupo OI do que no grupo *Sham* e o tratamento com arginina reduziu a translocação bacteriana a níveis fisiológicos.

Os animais que receberam o tratamento combinado (ARG+L-NAME) apresentaram captação significativamente maior de ^{99m}Tc -*E.coli* nos linfonodos mesentéricos (LNM), sangue, fígado, pulmão e baço, quando comparados com o grupo ARG ($p < 0,05$). Além disso, a translocação bacteriana foi significativamente maior para sangue e fígado nos animais do grupo ARG+L-NAME, quando comparada a encontrada no grupo OI ($p < 0,05$) (Tabela II.1).

Tabela II.1: Efeito da inibição da enzima óxido nítrico sintase (NOS) na translocação bacteriana

Órgãos/Sangue	Grupos (cpm/g)			
	<i>Sham</i>	OI	ARG	ARG+L-NAME
LNM	166,67 ^a	660,00 ^b	100,00 ^a	1366,66 ^b
Sangue	41,30 ^a	175,79 ^b	60,60 ^a	583,67 ^c
Fígado	204,80 ^a	1154,49 ^b	556,52 ^a	2494,05 ^c
Pulmões	14,29 ^a	794,12 ^b	110,52 ^a	636,84 ^b
Baço	109,09 ^a	1022,22 ^b	390,00 ^a	912,50 ^b

Valores de mediana (n=7)

Letras diferentes na mesma linha indicam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

3.2 Influência do óxido nítrico na permeabilidade intestinal

A permeabilidade intestinal foi significativamente maior no grupo OI ($0,10 \pm 0,03$; $0,10 \pm 0,01$; $0,20 \pm 0,05$ nos tempos de 4, 8 e 18 horas, respectivamente) do que no grupo *Sham* ($0,04 \pm 0,01$ no tempo de 4 horas; $0,04 \pm 0,01$ no tempo de 8 horas e $0,03 \pm 0,01$ no tempo de 18 horas) ($p < 0,05$).

Os níveis sanguíneos de DTPA nos grupos ARG e ARG+L-NAME foram respectivamente, $0,05 \pm 0,02$ e $0,05 \pm 0,02$ após 4 horas; $0,05 \pm 0,02$ e $0,05 \pm 0,01$ após 8 horas; $0,04 \pm 0,01$ e $0,04 \pm 0,01$ após 18 horas. Estes valores foram estatisticamente similares em todos os tempos investigados ($p > 0,05$) e não houve diferença estatística entre estes grupos e o grupo *Sham* 4, 8 e 18 horas após a operação (Figura II.1).

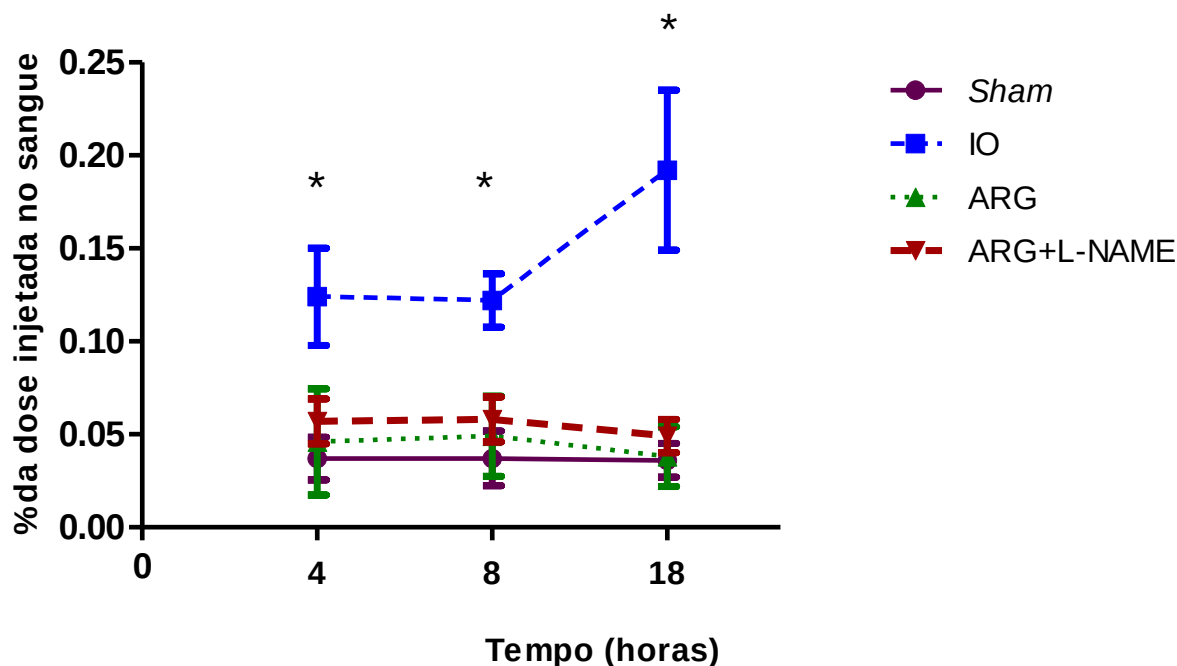


Figura II.1- Efeito da inibição da óxido nítrico sintase por L-NAME na permeabilidade intestinal. Barras de erro indicam o DP. Dados expressos em média±DP (n=5); *p<0,05.

3.3 Análises histológicas

O grupo IO (Figura II.2 B) apresentou alterações clássicas na lâmina própria e mucosa, descritas no capítulo anterior. Estas alterações compreendem mudanças isquêmicas tais como intenso edema no tecido conectivo, células e veias da lâmina própria, associadas a mudanças degenerativas e necrose em todas as camadas intestinais. O grupo tratado com arginina (Figura II.2 C) quando comparado ao grupo IO, apresentou preservação na estrutura e integridade da mucosa. No entanto, quando comparados aos animais do grupo *Sham*, aqueles tratados com arginina apresentaram vilosidades mais curtas e edema na lâmina própria (Figura II.2 A). O tratamento combinado com arginina e L-NAME não induziu a mudanças relevantes na estrutura dos tecidos. Neste grupo verificou-se preservação na vilosidade intestinal e ausência de isquemia, apresentando apenas edema discreto na lâmina própria (Figura II. 2D).

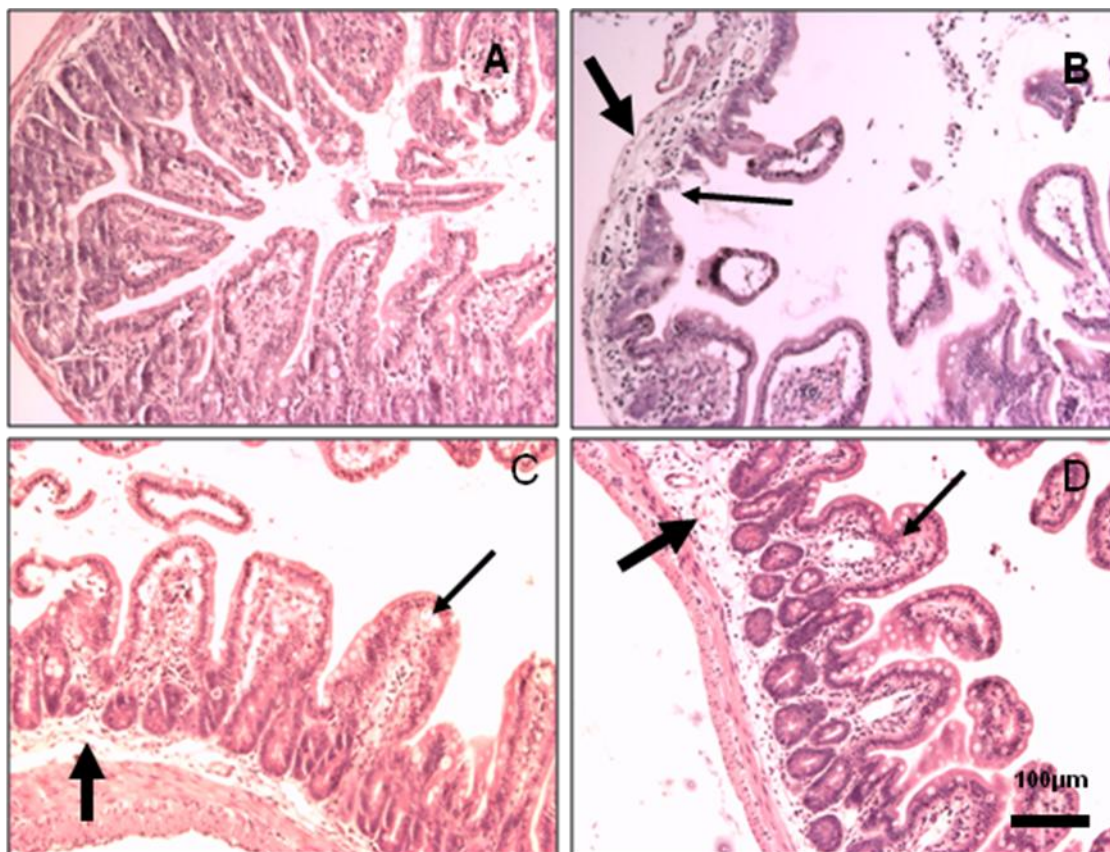


Figura II.2 - Histopatologia do íleo de animais do grupo ARG+L-NAME. Aspectos histológicos representativos dos grupos: *Sham* (A), IO (B), ARG (C) e ARG+L-NAME (D). Mudanças isquêmicas intensas na parede do íleo (seta larga, B), encurtamento de vilosidades e erosões mucosas (seta fina, B) Preservação parcial da integridade mucosa (seta fina) e edema de lâmina própria (seta larga) em (C) e (D). H&E, 10X objetiva, barra = 100µm.

3.4 Dosagem de Citocinas

Foram observados maiores níveis de INF- γ (120.1 ± 21.3 pg/mL) e IL-10 (50.7 ± 5.8 pg/mL) no grupo OI quando comparados ao grupo *Sham* (64.9 ± 7.0 pg/mL e 29.6 ± 8.6 pg/mL, respectivamente) ($p < 0.05$). Os animais tratados com arginina apresentaram níveis semelhantes de INF- γ (156.4 ± 38.1 pg/mL) em relação ao grupo OI ($p > 0.05$). No grupo tratado com arginina e L-NAME foram observados baixos níveis IL-10 e INF- γ (64.6 ± 12.7 pg/mL; 30.7 ± 8.2 pg/mL, respectivamente) que foram estatisticamente iguais àqueles do grupo *Sham* ($p > 0.05$) (Figura II.3).

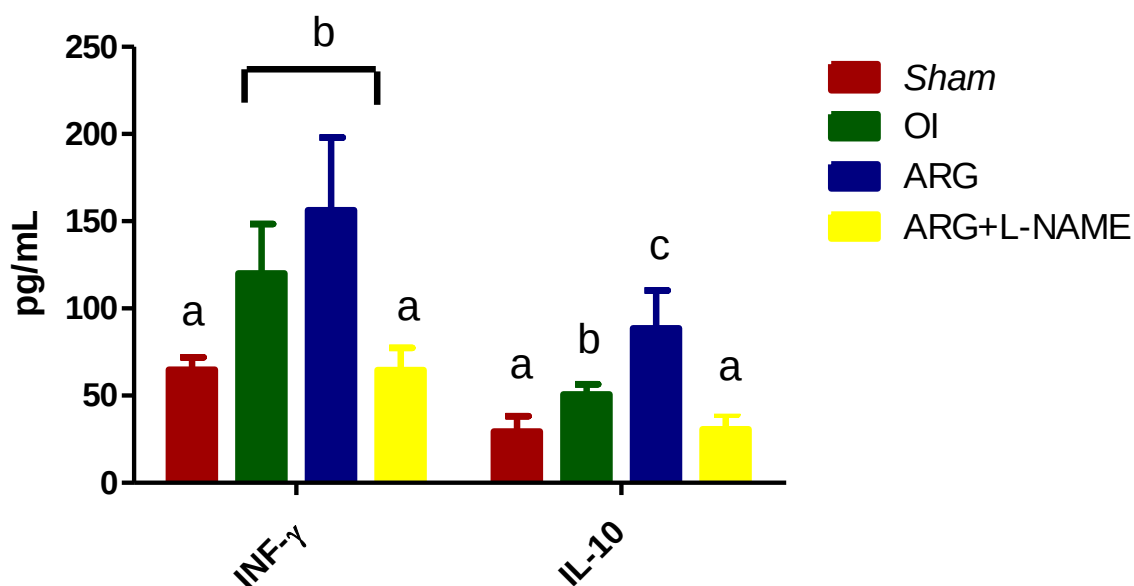


Figura II.3: Níveis das citocinas INF- γ e IL-10 no soro dos animais. Resultados expressos em média $\pm$ DP (n=5). Letras diferentes indicam diferença estatística, considerando cada uma das citocinas separadamente (p<0.05).

3.5 Concentração de sIgA no fluido intestinal

Os níveis de sIgA no fluido intestinal foram significativamente maiores no grupo OI (769.36 $\pm$ 171.47 mg/mL) quando comparados ao grupo *Sham* (474.24 $\pm$ 125.42 mg/mL) (p<0.05). O grupo tratado com arginina apresentou aumento significativo na concentração de sIgA (1049.00 $\pm$ 170.09 mg/mL) em relação aos grupos *Sham* e OI (p<0.05). No entanto, no grupo tratado com arginina em que houve o bloqueio da enzima óxido nítrico sintase, verificou-se que os níveis de sIgA (434.15 $\pm$ 187.07 mg/mL) foram semelhantes àqueles observados no grupo *Sham* (Figura II.4).

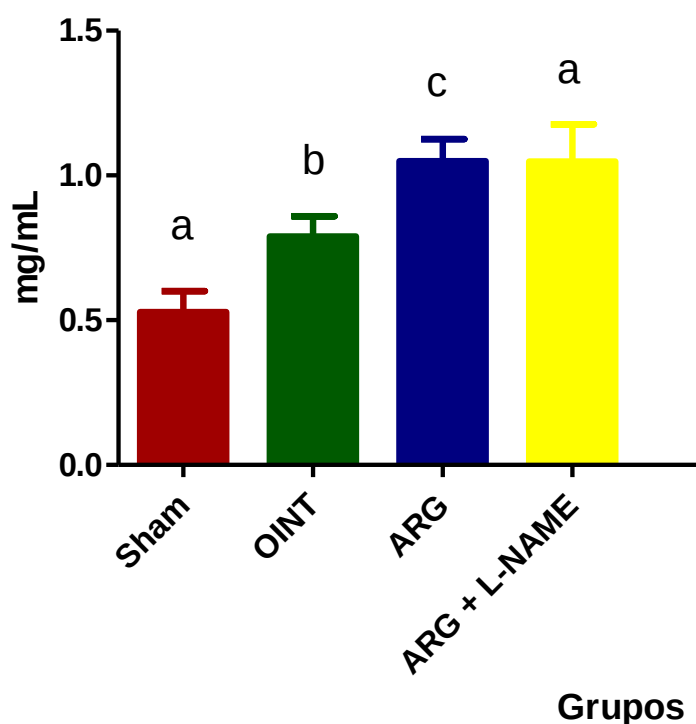


Figura II.4: Níveis de sIgA no fluido intestinal

4.0 DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

No presente trabalho foi proposta a investigação dos possíveis mecanismos e vias de ação da arginina na proteção da translocação bacteriana. Neste contexto, foram investigados os efeitos da via metabólica do óxido nítrico na manutenção da integridade da mucosa intestinal, bem como o papel da arginina e do óxido nítrico na modulação da resposta imunológica local e sistêmica em camundongos submetidos à obstrução intestinal.

Evidências experimentais sugerem que o ON possui tanto efeitos protetores quanto deletérios sobre a integridade intestinal e translocação bacteriana. O ON é mediador biológico com efeitos antimicrobianos diretos ou indiretos, por aumentar mecanismos antiinflamatórios locais. O ON é ainda potente mediador regulatório de vasodilatação e agente citotóxico (NADLER et al., 2000). Por outro lado, a aumentada produção de ON no intestino induz a injúria do epitélio intestinal devido à formação de peroxinitrito, molécula citotóxica capaz de iniciar a peroxidação lipídica e a formação de nitrosina, agravando a falha da barreira e conseqüentemente, a translocação bacteriana (KATADA et al., 2009; SAMEL et al., 2003). SALZMAN et al. (1995),

observaram que o ON dilatou reversivelmente as junções *tight* intercelulares em culturas de células epiteliais.

Nossos dados mostraram que camundongos tratados com L-NAME apresentaram aumento significativo da translocação bacteriana quando comparados aos animais que receberam apenas arginina. Neste caso específico, os níveis de TB foram similares aos encontrados nos animais do grupo OI com exceção do sangue e fígado, sugerindo que a proteção da L-arginina na translocação bacteriana foi mediada pela produção de ON. Resultados similares foram obtidos por DEMIRKIRAN e cols (2006), cujo estudo mostrou que a inibição do óxido nítrico aumentou a translocação bacteriana para os linfonodos mesentéricos.

Os resultados da presente investigação mostraram ainda que não houve aumento na permeabilidade intestinal ou lesão à estrutura tecidual devido à inibição da enzima NOS.

A permeabilidade intestinal é apenas um dos fatores que está envolvido na indução da translocação bacteriana e os efeitos do óxido nítrico na TB ainda não estão esclarecidos (TANAKA et al., 2001). O óxido nítrico possui diferentes funções na infecção e imunidade (COLEMAN et al., 2001). Evidências experimentais mostraram que a arginina possui importante papel na melhoria da função imunológica de animais sob estresse catabólico, principalmente por aumentar a citotoxicidade de macrófagos via produção de óxido nítrico (FAN et al., 2009; WILEY, 2007; HARDY et al., 2006; SHANG et al., 2005; OCHOA et al., 2001).

O óxido nítrico é componente da defesa não específica do hospedeiro mostrando-se efetivo contra parasitas intra e extracelulares. Essa citotoxicidade envolve a geração de peroxinitrito, produzido a partir da reação entre o óxido nítrico e o radical superóxido. O peroxinitrito interage com lipídeos, DNA e proteínas, promovendo injúria oxidativa e desta forma, o ON é capaz de mediar os efeitos citotóxicos dos macrófagos (WILEY et al., 2007; HARDY et al., 2006). Assim, postula-se que a inibição da produção do óxido nítrico poderia reduzir a citotoxicidade de macrófagos, ou seja, mesmo na presença de fagocitose, as reações oxidativas intracelulares se tornariam prejudicadas e conseqüentemente, o efeito letal sobre as bactérias, propiciando a translocação bacteriana.

TANAKA et al. (2001), verificaram que o bloqueio da produção de óxido nítrico pelo L-NAME aumentou a translocação bacteriana e causou decréscimo na produção de muco e fluido intestinal, sugerindo que a barreira física propiciada por estas substâncias fisiológicas pode ser um dos fatores que atuam na translocação

bacteriana. BERG e ITOH (1986) revisaram a relação entre translocação bacteriana e o estado imunológico e, verificaram que a translocação bacteriana é inibida em estados de imunoestimulação e aumentada em condições de imunodeficiência. Nesses casos, a translocação bacteriana pode ocorrer através de células especializadas, as células M, que atravessam o tecido linfóide e estão intercaladas entre os enterócitos. Estas células possuem função de apresentação de antígenos, especialização que parece ser explorada por patógenos para invasão do epitélio e disseminação pelo corpo, quando as defesas imunológicas do GALT falham em eliminar estes patógenos (BRAYDEN et al., 2005; WIEST & RATH, 2003).

O metabolismo da arginina é especialmente importante para células do sistema imunológico como macrófagos e linfócitos (POPOVIC et al., 2007). YEH, et al. (2002), em estudo conduzido em ratos sépticos com o objetivo de verificar os efeitos da infusão parenteral de arginina na população de células T, verificaram que a razão $CD4^+ : CD8^+$ foi significativamente maior no grupo infundido com arginina do que no grupo controle, que recebeu glicina, sugerindo que a imunidade foi aumentada no grupo tratado.

No presente estudo, foram avaliados o $INF-\gamma$ e a IL-10, a fim de elucidar o efeito da arginina sobre a resposta Th1/Th2 no modelo experimental investigado. Verificou-se que a arginina manteve a resposta Th1 e aumentou a resposta Th2 compensatória quando comparada ao grupo OI. Desta forma, verifica-se que a indução da resposta Th2, protege o hospedeiro dos efeitos prejudiciais da resposta inflamatória excessiva, uma vez que o $INF-\gamma$ produzido por linfócitos Th1 induz a ativação de macrófagos e estes, a produção de $TNF-\alpha$, com a finalidade de promover a resposta inflamatória. Estes dois mediadores influenciam a barreira epitelial por induzirem a contração da actina e miosina e posterior abertura das junções *tight*, o que leva a contínua perda da função de barreira, agravando ainda mais a infecção (CLAYBURGH et al., 2004; SHANAHAN, 2002).

Além disso, o efeito Th2 predominante resulta em ativação de linfócitos B e regulação da produção de anticorpos. Partindo desse pressuposto, as citocinas do tipo Th2 podem ter importante função no estímulo da secreção de IgA (SHANG et al., 2004).

O presente estudo indica ainda uma possível relação entre esses dois mediadores imunológicos, uma vez que o tratamento com arginina aumentou os níveis de IL-10 e também de sIgA. QUIAO et al. (2005) verificaram que o tratamento com arginina aumentou os níveis de sIgA nas fezes de ratos com pancreatite aguda. Em concordância com estes achados, SHANG et al. (2004), observaram que o tratamento

com arginina após a ligação e perfuração cecal, aumentou a concentração de IL-10 e a secreção sistêmica de IgA.

Dentre os diversos efeitos biológicos relatados para o óxido nítrico, a influência no sistema imunológico tem sido extensivamente estudada. No entanto, pouco é conhecido a respeito da função desta molécula sobre a proliferação e diferenciação de linfócitos T (BAUER et al., 1997). O óxido nítrico é gerado por células apresentadoras de antígeno durante o processo de apresentação de antígenos às células T. Segundo VAN der VEEN (2001), o ON inibe a proliferação de células T, porém sem inibir a produção de citocinas por estas células. Alguns estudos sugerem ainda que o ON pode promover aumento de citocinas Th2 como IL-10 e IL-4, acompanhado por declínio dos mediadores pró-inflamatórios como INF- γ e a IL-2 (MIKI et al, 2005; ROOZENDAAL et al. 1999; BENBERNOU et al., 1997).

No presente trabalho verificou-se que de fato o óxido nítrico desempenha importante função no balanço Th1/Th2. Quanto a via foi inibida pelo uso do L-NAME, não houve estímulo para a produção de INF- γ ou de IL-10 e, apesar dos animais deste grupo terem sido submetidos à obstrução intestinal, os níveis das citocinas sistêmicas e de sIgA intestinal foram iguais aos observados no grupo *Sham*, indicando possível imunossupressão devido ao bloqueio da enzima óxido nítrico sintase.

Em suma, no presente estudo verificou-se que a arginina reduz a translocação bacteriana em camundongos submetidos à obstrução intestinal devido à produção de óxido nítrico e os efeitos deste produto do metabolismo da arginina na modulação das citocinas Th1/Th2 sistêmicas e aumento da produção de sIgA intestinal.

3. CONCLUSÕES INTEGRADAS E PERSPECTIVAS

3.1 CONCLUSÕES INTEGRADAS

No presente estudo verificou-se que a suplementação com arginina em quantidade equivalente a 2% do VCT, reduz a translocação bacteriana em camundongos após a obstrução intestinal. Este efeito é mediado por mecanismos de preservação da mucosa intestinal e pela modulação da resposta imunológica sistêmica e local. Além disto, os resultados mostraram também que a arginina atua pela via do óxido nítrico.

3.2 PERSPECTIVAS

- Avaliar a resposta celular pela quantificação de macrófagos e linfócitos, no tecido intestinal, em animais controles, com obstrução intestinal, tratados com arginina e arginina+L-NAME;
- Avaliar o perfil de citocinas Th1 e Th2 na mucosa intestinal, com o objetivo de verificar a resposta imunológica local que ocorre na translocação bacteriana e os efeitos da arginina sobre a mesma;
- Investigar mecanismos pelo qual a arginina atua na redução da permeabilidade intestinal.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACHESON, D. W. K.; LUCCIOLI, S. Mucosal immune responses. *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* v.18, p.387-404, 2004.
- ADJEI, A.A.; YAMAUCHI, K.; NAKASONE, Y.; KONISHI, M.; YAMAMOTO, S. Arginine supplemented diets inhibit endotoxin-induced bacterial translocation. *Nutrition*, v.11, p. 371-374, 1995.
- ALENCAR, S. S. S.; MEDEIROS, A. C.; BRANDT, C.T.; AGUIAR, J. L. A.; ROCHA, K. B. F.; SILVA, M. P. Translocação de bactérias marcadas com Tc99 na icterícia obstrutiva em ratos. *Acta Cir. Bras.* v.17, p. 35-38, 2002.
- ANTEQUERA, R.; BRETANA, A.; BRITO, A.; ROMERA, M. A.; ZAPATA, R. Disruption of the intestinal barrier and bacterial translocation in an experimental model of intestinal obstruction. *Acta Cient. Venez.*, v. 51, p. 18-26, 2000.
- ARAUJO, J.G.V.C.; TOLEDO, V.P.C.P.; GUIMARÃES, T.M.P.D.; BERNARDO-FILHO, M.; SIMAL, C.J.R.; MOTA, L.G.; DINIZ, S.O.F.; CARDOSO, V.N. Technetium-99m labeling anti-amastigote polyclonal antibodies of *Leishmania amazonensis*. *Nucl. Med. Biol.* v.29, p.405-411, 2002.
- ARGAMAN, Z.; YOUNG, V.R.; NOVISKI, N.; CASTILLO-ROSAS, L.; LU, X.M.; ZURAKOWSKI, D.; COOPER, M.; DAVISON, C.; THARAKAN, J.F.; AJAMI, A.; CASTILLO, L. Arginine and nitric oxide metabolism in critically ill septic pediatric patients. *Crit. Care Med.* v.31, p. 591-597, 2003.
- ARRIETA, M. C.; BISTRITZ, L.; MEDDINGS, J. B. Alteration in intestinal permeability. *Gut.*, v.55, p.1512-1520, 2006.
- BAILEY, M. T.; ENGLER, H.; SHERIDAN, J. F. Stress induces the translocation of cutaneous and gastrointestinal microflora to secondary lymphoid organs of C57BL/6 mice. *J. Neuroimmunol.*, v.171, p.29-37, 2006.
- BAKER, J.W.; DEITCH, E.A.; LI, M.; BERG, R.D.; SPECIAN, R.D. Hemorrhagic shock induces bacterial translocation from the gut. *J. Trauma*, v.28, p. 896-906, 1988.
- BANSAL, V.; OCHOA, J. Arginine availability, arginase and the immune response. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care*, v.6, p. 223-228, 2003.
- BASTIAN, L.; WEIMANN, A. Immunonutrition in patients after multiple trauma. *Br. J. Nutr.*, v.87, p. 133-134, 2002.
- BAUER, C.; WALCHER, F.; KALWEIT, U.; LARSEN, R.; MARZI, I. Role of nitric oxide in the regulation of the hepatic microcirculation in vivo. *J Hepatol.*, v.27, p.1089-1095, 1997.

- BEALE, R.J.; BRYG, D.J.; BIHARI, D.J. Immunonutrition in the critically ill: A systematic review of clinical outcome. *Crit. Care Med.* v.27, n.12, p.2799-2805, 1999.
- BENBERNOU, N.; ESNAULT, S.; SHIN, H.C.; FEKKAR, H.; GUENOUNOU, M. Differential regulation of IFN-gamma, IL-10 and inducible nitric oxide synthase in human T cells by cyclic AMP-dependent signal transduction pathway. *Immunology*, v.91, p.361–368, 1997.
- BERG RD; ITOH, K. Bacterial translocation from the gastrointestinal tract - immunologic aspects. *Microecol Ther*, v.16, p. 131-145, 1986.
- BERG, R. D. Bacterial translocation from the gastrointestinal tract. *Trends Microbiol.* v.3, p.149-54, 1995.
- BERG, R. D. Mechanisms promoting bacterial translocation from the gastrointestinal tract. In: OLD HERBORN UNIVERSITY SEMINAR MONOGRAPH. Herborn-Diel: Departament of Microbiology and Immunology, 2001, p. 31-13.
- BESSELINK, M.G.; VAN SANTVOORT, H.C.; RENOOIJ, W.; DE SMET, M.B.; BOERMEESTER, M.A.; FISCHER, K.; TIMMERMAN, H.M.; AHMED, A.U.; CIRKEL G.A.; BOLLEN, T.L.; VAN RAMSHORST, B.; SCHAAPHERDER, A.F.; WITTEMAN, B.J.; PLOEG, R.J.; VAN GOOR, H.; VAN LAARHOVEN, C.J.; TAN, A.C.; BRINK, M.A.; VAN DER HARST, E.; WAHAB, P.J.; VAN EIJCK, C.H.; DEJONG, C.H.; VAN ERPECUM, K.J.; AKKERMANS, L.M.; GOOSZEN, H.G. Intestinal barrier dysfunction in a randomized trial of a specific probiotic composition in acute pancreatitis. *Ann. Surg.*, v. 250, p. 712-719, 2009.
- BJARNASON, I.; MACPHERSON, A.; HOLLANDER, D. Intestinal permeability: an overview. *Gastroenterology*, v.108, p. 1566-1581, 1995.
- BODGAN, C. Nitric oxide and the immune response. *Nat. Immunol.*, v.2, p. 907-916, 2001.
- BRAYDEN, D.J.; JEPSON, M.A.; BAIRD, A.W. Intestinal Peyer's patch M cells and oral vaccine targeting. *Drug Discov Today*, v. 10, p. 1145-1157, 2005.
- CINTRA, A.E.S.U.; MARTINS, S.L.; PATRICIO, F.R.S.; HIGA, E.M.S.; MONTERO, E.F.S. Nitric Oxide Levels in the Intestines of Mice Submitted to Ischemia and Reperfusion: L-Arginine Effects. *Transplant. Proc.*, v.40, p. 830–835, 2008.
- CLAYBURGH, D.R.; SHEN, L.; TURNER, J.R. A porous defense: the leaky epithelial barrier in intestinal disease. *Lab. Invest.*, v.84, p.282–291, 2004.
- COLEMAN, J.W. Nitric oxide in immunity and inflammation. *Int Immunopharmacol*, v.1, p. 1397-1406, 2001.

- CRENN, P.; CYNOBER, L. Effect of intestinal resections on arginine metabolism: practical implications for nutrition support. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, v. 13, p. 65-69, 2010.
- CYNOBER, L.; BOUCHER, J.L.; VASSON, M. P. Arginine Metabolism in Mammals. *J. Nutr. Biochem.*, v.6, p.402-403, 1995.
- CHANG, J. X.; CHEN, S.; MA, L. P.; JIANG, L. Y.; CHEN, J. W.; CHANG, R. M.; WEN, L. Q.; WU, W.; JIANG, Z. P.; HUANG, Z. T. Functional and morphological changes of the gut barrier during the restitution process after hemorrhagic shock. *World J. Gastroenterol.* v.11, p.5485-5491, 2005.
- CHIARLA, C.; GIOVANNINI, I.; SIEGEL, J.H. Plasma arginina and correlations in trauma and sepsis. *Amino Acids.*,v.30, p.81-86, 2006.
- CHOI, B.S.; MARTINEZ-FALERO, I.C.; CORSET, C.; MUNDER, M.; MODOLELL, M.; MULLER, I.; KROPF, P. Differential impact of L-arginine deprivation on the activation and effector functions of T cells and macrophages. *J. Leukoc. Biol.*, v.85, p. 268-277, 2009.
- DEITCH, E. A.; SHORSHEIN, A.; HOUGHTON, J.; LU, Q.; XU, D. Inducible nitric oxide synthase knockout mice are resistant to diet-induced loss of gut barrier function and intestinal injury. *J. Gastrointest. Surg.*, v.6, p. 599-605, 2002.
- DEITCH, E.A. Bacterial translocation of the gut flora. *J. Trauma*, v.30, p.184-188, 1990.
- DEITCH, E.A.; DAZHONG, X.; LU, Q.; SPECIAN, R.D.; BERG, R.D. Protein malnutrition alone and in combination with endotoxin impairs systemic and gut-associated immunity. *JPEN J Parenter Enteral Nutr*, v. 16, p. 25-31, 1992.
- DEMIRKIRAN, A.E.; BALKAYA, M.; TUNCYUREK, P.; CEVIKEL, M.H.; CULHACI, N.; IYIGOR, M.; OZGUN, H.; AYDIN, N.; BOYLU, S. The Effects of Nitric Oxide Supplementation and Inhibition on Bacterial Translocation in Bile Duct Ligated Rats. *Acta Chir Belg*, v.106, p. 202-05, 2006.
- DING, L.; LI, J.; LI Y, ZHU, N.; LIU, F.; TAN, L. Intestinal barrier damage caused by trauma and lipopolysaccharide. *World J. Gastroenterol*, v.10, p.2313-2378, 2004.
- DING, L.A.; LI, J.S. Effects of glutamine on intestinal permeability and bacterial translocation in TPN-rats with endotoxemia. *World J. Gastroenterol.*, v.9, p.1327-1332, 2003.
- DINIZ, S. O. F.; RESENDE, B. M.; NUNAN, E. A.; SIMAL, C. J. R.; CARDOSO, V. N. ^{99m}Techetium labelled *Escherichia coli*. *Appl. Radiat. Isot.* v. 51, p. 33-36, 1999.
- DUGGAN, C.; GANNON, J.; WALKER, W.A. Protective nutrients and functional foods for the gastrointestinal tract. *Am.J. Clin. Nutr.*, v. 75, p. 789-808, 2002.

- ELLIS, M. Preventing microbial translocation in haematological malignancy. *Br. J. Haematol.*, v. 125, p. 282-293, 2004.
- ERSIN, S.; TUNCYUREK, P.; ESASSOLAK, M.; ALKANAT, M.; BUKE, C.; YILMAZ, M.; TELEFONCU, A.; KOSE, T. The prophylactic and therapeutic effects of glutamine and arginine-enriched diets on radiation induced enteritis in rats. *J. Surg. Res.*, v. 89, p. 121-125, 2000.
- EVANS, R.W.; FERNSTROM, J.D.; THOMPSON, J.; MORRIS, S.M.; KULLER, L.H. Biochemical responses of healthy subjects during dietary supplementation with L-arginine. *J. Nutr. Biochem.*, v.15, p. 534-539, 2004.
- FAN, J.; MENG, Q.; GUO, G.; XIE, Y.; LI, X.; XIU, Y.; LI, T.; MA, L. Effects of early enteral nutrition supplemented with arginine on intestinal mucosal immunity in severely burned mice. *Clin Nutr.* In press, 2009.
- FILHO, R.F.; ZILBERSTEIN, B. Óxido Nítrico: o simples mensageiro percorrendo a complexidade. Metabolismo, síntese e funções. *Rev. Assoc. Med. Bras.*, v.46, p. 265-271, 2000.
- FLYNN, N.E.; MEININGER, C.J.; HAYNES, T.E.; WU, G. The metabolic basis of arginine nutrition and pharmacotherapy. *Biomed. Pharmacother.*, v. 56, p. 427-438, 2002.
- FUKATSU, K.; SAKAMOTO, S.; HARA, E.; UENO, C.; MAESHIMA, Y.; MATSUMOTO, I.; MOCHIZUKI, H.; HIRADE, H. Gut ischemia-reperfusion affects gut mucosal immunity: a possible mechanism for infectious complications after severe surgical insults. *Crit. Care Med.*, v.34, p. 182-187, 2006.
- GAREAU, M.G.; SILVA, M.A.; PERDUE, M.H. Pathophysiological mechanisms of stress-induced intestinal damage. *Curr. Mol. Med.*, v.8, p. 274-81, 2008.
- GATT, M.; REDDY, B.S.; MACFIE, J. Review article: bacterial translocation in the critically ill – evidence and methods of prevention. *Aliment. Pharmacol. Ther.*, v.25, p.741-757, 2007.
- GUN, F.; SALMAN, T.; GURLER, N.; OLGAC, V. Effect of probiotic supplementation on bacterial translocation in thermal injury. *Surg. Today*, v.35, p. 760-764, 2005.
- GURBUZ, A.T.; KUNZELMAN, J.; RATZER, E.E. Supplemental dietary arginine accelerates intestinal mucosal regeneration and enhances bacterial clearance following radiation enteritis in rats. *J. Surg. Res.*, v.74, p. 149-54, 1998.
- HALLEMEESCH, M.M.; LAMERS, W.H.; DEUTZ, N.E.P. Reduced arginine availability and nitric oxide production. *Clin. Nutr.*, v.21, p.273-279, 2002.

- HARDY, I.; ALANY, R.; RUSSELL, B.; HARDY, G. Antimicrobial effects of arginine and nitrogen oxides and their potential role in sepsis. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care.* v.9, p.225-232, 2006.
- HESSE, M.; MODOLELL, M.; LA FLAMME, A.C.; SCHITO, M.; FUENTES, J.M.; CHEEVER, A.W.; PEARCE, E.J.; WYNN, T.A. Differential regulation of nitric oxide synthase-2 and arginase-1 by type1/type2 cytokines in vivo: granulomatous pathology is shaped by the pattern of L-arginine metabolism. *J. Immunol.*, v. 167, p. 6533–6544, 2001.
- HORTON, J.W.; WHITE, J.; MAASS, D.; SANDERS, B. Arginine in burn injury improves cardiac performance and prevents bacterial translocation. *J Appl Physiol*, v. 84, p. 695-702, 1998.
- HUA, T.C.; MOOCHHALA, S.M. Role of nitric oxide in hemorrhagic shock-induced bacterial translocation. *J. Surg. Res.*, v. 93, p. 247-256, 2000.
- JORGENSEN, V.L.; NIELSEN, S.L.; ESPERSEN, K.; PERNER, A. Increased colorectal permeability in patients with severe sepsis and septic shock. *Intensive Care Med.*, v. 32, p. 1790-1796, 2006.
- KABAROUDIS, A.; PAPAIOGAS, B.; KOUTELIDAKIS, I.; KYPARISSI-KANELAKI, M.; KOUZI-KOLIAKOU, K.; PAPAIOGAS, T. Disruption of the small-intestine mucosal barrier after intestinal occlusion: a study with light and electron microscopy. *J Invest Surg*, v. 16, p. 23-28, 2003.
- KATADA, K.; BIHARI, A.; BADHWAR, A.; YOSHIDA, N.; YOSHIKAWA, T.; POTTER, R.F.; CEPINSKAS, G. Hindlimb ischemia/reperfusion-induced remote injury to the small intestine: role of inducible nitric-oxide synthase-derived nitric oxide. *J Pharmacol Exp Ther*, v. 329, p. 919-927, 2009.
- KATOZIAN, F.; SBLATTERO, D.; NOT, T.; TOMMASINI, A.; GIUSTO, E.; MEIACCO D, STEBEL M, MARZARI R, FASANO A, VENTURA A. Dual sugar gut-permeability testing on blood drop in animal models. *Cin Chim Acta.*, v. 352, p. 191-197, 2005.
- KHANNA, A.; ROSSMAN, J.E.; FUNG, H.L.; CATY, M.G. Attenuated nitric oxide synthase activity and protein expression accompany intestinal ischemia/reperfusion injury in rats. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v. 269, p. 160-164, 2000.
- KOBAYASHI, T.; YAMAMOTO, M.; HIROI, T.; MCGHEE, J.; TAKESHITA, Y.; KIYONO, H. Arginine enhances induction of T helper 1 and T helper 2 cytokine synthesis by Peyer's patch alpha beta T cells and antigen-specific mucosal immune response. *Biosci Biotechnol Biochem.*, v.62, p.2334-2340, 1998.

- KUNG S.P.; WU, C.W.; LUI, W.Y. Arginine modulated cyclosporine-induced immune suppression in rats transplanted with gastric cancer cells. *In Vivo*, v.15, p.39-44, 2001.
- LI, Y.T.; WANG, L.; CHEN, Y.; CHEN, Y.B.; WANG, H.Y.; WU, Z.W.; LI, L.J. Effects of gut microflora on hepatic damage after acute liver injury in rats. *J Trauma*, v.68, p. 76-83, 2010.
- LICHTMAN, S.M. Bacterial [correction of bacterial] translocation in humans. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.*, v.33, p.1-10, 2001.
- LIM, T.S.; MESSIHA, N.; WATSON, R.R. Immune components of the intestinal mucosae of ageing and protein deficient mice. *Immunology.*, v. 43, p. 401-407, 1981.
- LOSER, C.; EISEL, A.; HARMS, D.; FOLSCH, U.R. Dietary polyamines are essential luminal growth factor for small intestinal and colonic mucosal growth and development. *Gut.*, v.44, p.12-16, 1999
- LUIKING, Y.C.; ENGELEN, M.P.K.J.; DEUTZ, N.E.P. Regulation of nitric oxide production in health and disease. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, v.13, p. 97–104, 2010.
- LUIKING, Y.C.; POEZE, M.; RAMSAY, G.; DEUTZ, N.E. Reduced citrulline production in sepsis is related to diminished de novo arginine and nitric oxide production. *Am J Clin Nutr.*, v. 89, p.142-152, 2009.
- LUIKING, Y.V.; DEUTZ, N.E.P. Isotopic investigation of nitric oxide metabolism in disease. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care*, v.6, p.103-108, 2003.
- MACFIE, J. Current status of bacterial translocation as a cause of surgical sepsis. *Br. Med. Bull.* v.71, p.1-11, 2004.
- MACFIE, J.; O'BOYLE, C.J.; MITCHELL, C.J.; BUCLEY, P.M.; JOHNSTONE, D.; SUDWORTH, P. Gut origin of sepsis: a prospective study investigating associations between bacterial translocation, gastric microflora, and septic morbidity. *Gut.*, v.45, p.223-228, 1999.
- MACFIE, J.; WOODCOCK, N.P.; PALMER, M.D.; WALKER, A.; TOWNSEND, S.; MITCHELL, C.J. Oral dietary supplements in pre- and postoperative surgical patients: a prospective and randomized clinical trial. *Nutrition*, v.16, p. 723-728, 2000.
- MASSBERG, S.; GONZALEZ, A.P.; MENDER, M.D.; MESSMER, K. Analysis of microvascular perfusion of small intestine after heterotopic transplantation in the rat [abstract]. *Br J Surg*, v.81, p. 122, 1994.

- MIKI, S.; TAKEYAMA, N.; TANAKA, T.; NAKATANI, T. Immune dysfunction in endotoxemia: Role of nitric oxide produced by inducible nitric oxide synthase. *Crit Care Med.*, v.33, p.716–720, 2005.
- MISHIMA, S.; XU, D.; DEITCH, E.A. Increase in endotoxin-induced mucosal permeability is related to increased nitric oxide synthase activity using the Ussing chamber. *Crit. Care Med.*, v. 27, p.880-886, 1999.
- MOINARD, C.; CYNOBER, L.; BANDT, J.P. Polyamines: metabolism and implications in human diseases. *Clin. Nutr.*, v.24, p.184-197, 2005.
- MUNDER, M.; CHOI, B.S.; ROGERS, M.; KROP, P. L-Arginine deprivation impairs Leishmania major-specific T-cell responses. *Eur. J. Immunol.*, v.39, p.2161–2172, 2009.
- MURPHY, G.M. Polyamines in the human gut. *Eur J Gastroenterol Hepatol.*, v.13, p. 1011-1014, 2001.
- NAABER, P.; SMIDT, I.; TAMME, K.; LIIGANT, A.; TAPFER, H.; MIKELSAAR, M.; TALVIK, R. Translocation of indigenous microflora in an experimental model of sepsis. *J. Med. Microbiol.* v.49, p.431-439, 2000.
- NADLER, E.P.; FORD, H.R. Regulation of bacterial translocation by nitric oxide. *Pediatr. Surg. Int.*, v.16, p.165-168, 2000.
- NEURATH, M.F.; FINOTTO, S.; GLIMCHER, L.H. The role of Th1/Th2 polarization in mucosal immunity. *Nat. Med.*, v.8, p. 567-573, 2002.
- O'BOYLE, C. J.; MACFIE, J.; JOHNSTONE, M.; SAGAR, P. M.; SEDMAN, P.C. Microbiology of bacterial translocation in humans. *Gut.*, v.42, p. 29-35, 1998.
- O'HARA, A.M.; SHANAHAN, F. The gut flora as a forgotten organ. *EMBO Rep.*, v.7, p. 688-693, 2006.
- OCHOA, J.B.; STRANGE, J.; KEARNEY, P.; GELLIN, G.; ENDEAN, E.; FITZPATRICK, E. Effects of L-arginine on the proliferation of T lymphocyte subpopulations. *JPEN J. Parenter. Enteral Nutr.*; v.25, p.23-29, 2001.
- OLIVEIRA, M.A.; LEMOS, D.S.; DINIZ, S.O.; COELHO, J.V.; CARDOSO VN. Prevention of bacterial translocation using glutamine: a new strategy of investigation. *Nutrition*, v.22, p.419–424, 2006.
- OSMAN, N.E.; WESTROM, B.; WANG, Q.; PERSON, Q.; KARLSSON, B. Spermine affects intestinal in vitro permeability to different-sized molecules in rat. *Comp. Biochem. Physiol. C Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.*, v.120, p.211-216, 1998.

- PAN, M.; CHOUDRY, H.A.; EPLER, M.J.; MENG, Q.H.; KARINCH, A, LIN, C.M.; SOUBA, W. Arginine Transport in Catabolic Disease States. *J. Nutr.*, v.134, p.2826-2829, 2004.
- POPOVIC, P.J.; ZEH, H.J.; OCHOA, J.B. Arginine and immunity. *J. Nutr.* v.137, p. 1681-1686, 2007.
- QUIAO, S.F.; LU, T.J.; SUN, J.B.; LI, F. Alterations of intestinal immune function and regulatory effects of L-arginine in experimental severe acute pancreatitis rats. *World J. Gastroenterol.*, v.11, p.6216-6218, 2005.
- QUIRINO, I.E.P.; CORREIA, M.I.T.D.; CARDOSO, V.N. The impact of arginine on bacterial translocation in an intestinal obstruction model in rats. *Clin. Nutr.*, v. 26, p.335-340, 2007.
- RHOADS, J.M.; WU, G. Glutamine, arginine and leucine signaling in the intestine. *Amino Acids*, v. 37, p. 111–122, 2009.
- ROOZENDAAL, R.; VELLENGA, E.; POSTMA, D.S.; DE MONCHY, J.G.; KAUFFMAN, H.F. Nitric oxide selectively decreases interferon gamma expression by activated human T lymphocytes via a cGMP independent mechanism. *Immunology*, v.98, p.393–399, 1999.
- SALZMAN, A.L.; MENCONI, M.J.; UNNO, N.; EZZELL, R.M.; CASEY, D.M.; GONZALEZ, P.K.; FINK, M.P. Nitric oxide dilates tight junctions and tight junctions and depletes ATP in cultured Caco-2BBE intestinal monolayers. *Am J Physiol*, v. 268, p. 361-373, 1995.
- SAMEL, S.; KEESE, M.; KLECZKA, M.; LANING, S.; GRETZ, N.; HAFNER, M.; STURM, J.; POST, S. Microscopy of bacterial translocation during small bowel obstruction and ischemia in vivo – a new animal model. *BMC Surg.*, v.2, 2002.
- SAMEL, S.; KEESE, M.; LANING, S.; KLECZKA, M.; GRETZ, N.; HAFNER, M.; STURM, J.; POST, S. Supplementation and inhibition of nitric oxide synthesis influences bacterial transit time during bacterial translocation in rats. *Shock*, v.19, p. 378-382, 2003.
- SAYAN, H.; OZACMAK, V.H.; ALTANER, S.; AKTAS, R.G.; ARSLAN, S.O. Protective effects of L-arginine on rat terminal ileum subjected to ischemia/reperfusion. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.*, v.46, p. 29-35, 2008.
- SCHLEIFFER, R.; RAUL, F. Prophylactic administration of L-arginine improves the intestinal barrier function after mesenteric ischaemia. *Gut*, v. 39, p. 194-198, 1996.

- SCHWARZ, M.; THOMSEN, J.; MEYER, H.; BUCHLER, M.W.; BEGER, H.G. Frequency and time course of pancreatic and extrapancreatic bacterial infection in experimental acute pancreatitis in rats. *Surgery*, v.127, p. 427-432, 2000.
- SHANAHAN, F. The host-microbe interface within the gut. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.*, v.16, p.915-931, 2002.
- SHANG, H.F.; HSU, C.S.; YEH, C.L.; PAI, M.H.; YEH, S.L. Effects of arginine supplementation on splenocyte cytokine mRNA expression in rats with gut-derived sepsis.. *World J. Gastroenterol*, v.11, p. 7091-7096, 2005.
- SHANG, H.F.; WANG, Y.Y.; LAI, Y.N.; CHIU, W.C.; YEH, S.L. Effects of arginine supplementation on mucosal immunity in rats with septic peritonitis. *Clin Nutr.*, v.23, p.561-569, 2004.
- SPAIN, D.A.; WILSON, M.A.; BAR-NATAN, M.F.; GARRISON, R.N. Role of nitric oxide in the small intestinal microcirculation during bacteremia. *Shock*, v. 2, p. 41-46, 1994.
- STECHMILLER, B.C.; CHILDRESS, B.; PORTER, T. Arginine immunonutrition in critically ill patients: a clinical dilemma. *Am. J. Crit. Care.*, v. 13, p.17-23, 2004.
- SUCHNER, U.; HEYLAND, D.K.; PETER, K. Immune-modulatory actions of arginine in the critically ill. *Br. J. Nutr.*, v.87, p.121-132, 2002.
- SUKHOTNIK, I.; HELOU, H.; MOGILNER, J. LURIE, M.; BERNSTEYN, A.; CORAN, A.; SHILONI, E. Oral arginine improves intestinal recovery following ischemia-reperfusion injury in rat. *Pediatr. Surg. Int.*, v.21, p.191-196, 2005.
- SUN, S.L.; WU, S.D.; ZHANG, X.B. Oral 99mTc-DTPA simultaneous determination of duodenobiliary reflux and intestinal permeability in patients after choledocholithotomy plus T-tube drainage. *Hepatobiliary Pancreat. Dis. Int.*, v.15, p. 593-596, 2005.
- SUN, Z.; WANG, X.; WALLEN, R.; DENG, X.; DU, X.; HALLBERG, E.; ANDERSSON, R. The influence of apoptosis on intestinal barrier integrity in rats. *Scand. J. Gastroenterology*, v.33, p. 425-422, 1998.
- TANAKA, A.; MIZOGUCHI, H.; KUNIKATA, T.; MIYAZAWA, T.; TAKEUCHI, K. Protection by constitutively formed nitric oxide of intestinal damage induced by indomethacin in rats. *J. Physiol.*, v.95, p. 35-41, 2001.
- TAPIERO, H.; MATHÉ, G.; COUVREUR, P.; TEW, K.D. Arginine. *Biomed. Pharmacother.*, v.56, p. 439-445, 2002.

- THOMAS, S.; RAMACHANDRAN, A.; PATRA, S.; VIDYASAGAR, S.;
BALASUBRAMANIAN, K. A. Nitric oxide protects the intestine from the damage induced by laparotomy and gut manipulation. *J. Surg. Res.*, v.99, p.25-32, 2001.
- TSUEI, B.J.; BERNARD, A.C.; BARKSDALE, A.R.; ROCKICH, A.K.; MEIER, C.; KEARNEY, P.A. Supplemental enteral arginine is metabolized to ornithine in injured patients. *J. Surg. Res.* v.123, p. 17-24, 2005.
- VAN der VEEN, R. Nitric oxide and T helper cell immunity. *Int. Immunopharmacol.*, v.1, p. 1491-1500, 2001.
- VIANA, M.L.; SANTOS, R.G.; GENEROSO, S.V.; ARANTES, R.M.; CORREIA, M.I.; CARDOSO, V.N. Pretreatment with arginine preserves intestinal barrier integrity and reduces bacterial translocation in mice. *Nutrition*, v.26, p.218–223, 2010.
- WANG W.W.; QIAO, S.Y.; LI, D.F. Amino acids and gut function. *Amino Acids*, v.37, p. 105-110, 2008.
- WARD, D.T.; LAWSON, S.A.; GALLAGHER, C.M.; CONNER, W.C.; SHEA-DNOHUE, T. Sustained nitric oxide production via L-arginine administration ameliorates effects of intestinal ischemia-reperfusion. *J. Surg. Res.*, v. 89, p. 13-19, 2000.
- WELSH, F.K.S.; FARMERY, S.M.; MACLENNAN, K.; SHERIDAN, M.B.; BARCLAY, G.R.; GUILLOU, P.J.; REYNOLDS, J.V. Gut barrier function in mal-nourished patients. *Gut*, v.48, p. 396-401, 1998.
- WHITE, J. S.; HOPER, M.; PARKS, R. W.; CLEMENTS, W. D. B.; DIAMOND, T. Patterns of bacterial translocation in experimental biliary obstruction. *J. Surg. Res.*, v. 132, p.80-84, 2006.
- WUEST, R.; RATCH, H.C. Bacterial translocation in the gut. *Best. Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* v.17, p.397-425, 2003.
- WILEY, J.W. The many faces of nitric oxide: cytotoxic, cytoprotective or both. *Neurogastroenterol. Motil.*, v. 19, p. 541-544, 2007.
- WILMORE, D. Enteral and parenteral arginine supplementation to improve medical outcomes in hospitalized patients. *J. Nutr.*, v.134, p.2863-2867, 2004.
- WOODCOCK NP, ROBERTSON J, MORGAN DR, GREGG KL, MITCHELL CJ, MACFIE J. Bacterial translocation and immunohistochemical measurement of gut immune function. *J. Clin. Pathol.*, v.54, p. 619-623, 2001.
- WU, G.; BAZER, F.W.; DAVIS, T.A.; KIM, S.W.; LI, P.; RHOADS, J.M.; SATEERFIELD, M.C.; SMITH, S.B.; SPENCER, T.E.; YIN, Y. Arginine metabolism and nutrition in growth, health and disease. *Amino Acids.*, v.37, p. 153-168, 2009.

- WU, G.; MEININGER, C.J.; KNABE, D.A.; BAZER, F.W., RHOADS, J.M. Arginine nutrition in development, health and disease. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care*, v.3, p.59-66, 2000.
- WU, G.; MORRIS, S.M. Arginine Metabolism: nitric oxide and beyond. *Biochem. J.*, v.336, p.1-17, 1998.
- XU, D.Z.; LU, Q.; DEITCH, E.A. Nitric oxide directly impairs intestinal barrier function. *Shock*, v.17, p. 139–145, 2002.
- YEH, C.L.; YEH, S.L.; LIN, M.T.; CHEN, W.J. Effects of arginine-enriched total parenteral nutrition on inflammatory- related mediator and T-cell population in septic rats. *Nutrition*. v.18, p.631-635, 2002.
- YERAMIAN, A.; MARTIN, L.; ARPA, L.; BERTRAN, J.; SOLER, C.; MCLEOD, C.; MODOLELL, M.; PALACÍN, M.; LLOBERAS, J.; CELADA, A. Macrophages require distinct arginine catabolism and transport systems for proliferation and for activation. *Eur. J. Immunol.*, v.36, p.1516-26, 2006.
- ZALOGA, G.P.; SIDDIQUI, R.; TERRY C.; MARIK, P.E. Arginine: mediator or modulator of sepsis? *Nutr. Clin. Pract.*, v. 19, p. 201-215, 2004.
- ZEA, A.H.; RODRIGUEZ, P.C.; CULOTTAC, K.S.; HERNANDEZ, C.P.; DESALVO, J.; OCHOA, J.B.; PARK, H.J.; ZABALETA, J.; OCHOA, A.C. L-Arginine modulates CD3_ expression and T cell function in activated human T lymphocytes. *Cell. Immunol.*, v.232, p. 21–31, 2004.
- ZHANG, X.; OKUTSU, M.; KANEMI, O.; GAMETCHU, B.; NAGATOMI, R. Repeated stress suppresses interferon-gamma production by murine intestinal intraepithelial lymphocytes. *Tohoku J Exp Med.*, v. 206, p. 203-212, 2005.
- ZHANG, Y.; LI, M.; MENG, M.; QIN, C. Effect of ethyl pyruvate on physical and immunological barriers of the small intestine in a rat model of sepsis. *J. Trauma*, v.66, p. 1355-1364, 2009.
- ZHOU, M.; MARTINDALE, R.G. Arginine in the critical care setting. *J. Nutr.*, v. 137, p. 1687-1692, 2007.
- ZULFIKAROGLU, B.; ZULFIKAROGLU, E.; OZMEN, M.M.; BERKEM, R.; ERDOGAN, S.; BESLER, H.T.; KOC, M.; KORKMAZ, A. The effect of immunonutrition on bacterial translocation, and intestinal villus atrophy in experimental obstructive jaundice. *Clin. Nutr.* v.22, p.277-281, 2003.

5. ANEXOS