

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPT°. DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA
TESE DE TITULAR EM FARMACOLOGIA

GLUTAMINA E ALANIL-GLUTAMIL-GLUTAMINA: SÍNTESE
QUÍMICA, EFEITO NO TRANSPORTE DE ÁGUA, ELETRÓLITOS
E PERMEABILIDADE INTESTINAL

ALDO ÂNGELO MOREIRA LIMA

FORTALEZA-CE

1998

C 559288
R 1152637
02/02/99

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPT°. DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA
TESE DE TITULAR EM FARMACOLOGIA

GLUTAMINA E ALANIL-GLUTAMIL-GLUTAMINA: SÍNTESE
QUÍMICA, EFEITO NO TRANSPORTE DE ÁGUA, ELETRÓLITOS
E PERMEABILIDADE INTESTINAL

ALDO ÂNGELO MOREIRA LIMA

Tese apresentada para o Concurso de
Professor Titular do Departamento de
Fisiologia e Farmacologia da Faculdade de
Medicina da Universidade Federal do Ceará.

FORTALEZA-CE

1998

FC-00006302-4

TESE
616.3427
L 6969
1998



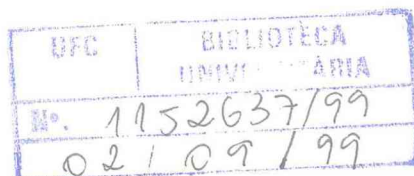
L696g Lima, Aldo Ângelo Moreira
Glutamina e alanil-glutamil-glutamina:
síntese química, efeito no transporte de água,
eletrólitos e permeabilidade intestinal –
Fortaleza, 1998.

237.: il

Tese (Professor Titular). Universidade
Federal do Ceará. Departamento de Fisiologia
e Farmacologia.

1. Glutamina. I. Título

CDD 616.3427



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPTº. DE FISILOGIA E FARMACOLOGIA
TESE DE TITULAR EM FARMACOLOGIA

Esta tese foi submetida como parte dos requisitos necessários para admissão à classe de Professor Titular em Farmacologia, outorgado pela Universidade Federal do Ceará, e encontra-se à disposição dos interessados, na Biblioteca da Faculdade de Medicina da referida Instituição.

Aldo Ângelo Moreira Lima

Banca Examinadora:

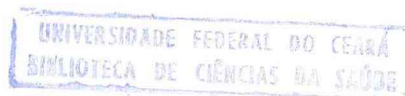
Prof. Dr. Krishnamurti M. Carvalho

Prof. Dr. Manassés C. Fonteles

Prof. Dr. João B. Calixto

Prof. Dr. Aprígio M. Filho

Prof. Dr. José Henrique L. Cardoso



“EM QUESTÕES DE ESTILO,
NADE A FAVOR DA CORRENTE;
EM QUESTÕES DE PRINCÍPIOS,
PERMANEÇA FIRME COMO
UMA ROCHA.”

THOMAS JEFFERSON

AGRADECIMENTOS

A Deus pelo presente da vida.

Aos meu pais, Marcelo Barbosa Lima e Maria Moreira Lima, pelos ensinamentos de conduta moral, honestidade e amor à vida.

A minha família, Noélia Leal Lima (esposa), Bruna Leal Lima, Breno Leal Lima e Adam Leal Lima, pela alegria e amor que me transmitem a todo momento.

Aos meus mentores, Manassés Claudino Fonteles e Richard L. Guerrant, pelos primeiros passos na carreira científico-acadêmica, colaboração e amizade de princípios e conceitos morais.

Aos ex-orientandos de doutorado e mestrado, Alberto Melo Soares e Ângela Maria Rodrigues Gifoni, pela colaboração nos experimentos de câmaras de Üssing e ensaios clínicos com pacientes HIV⁺, muitos deles falecidos.

A Jay W. Fox, Yongde Bao, Terezinha do Menino Jesus da Silva e Manuel Sales Barboza, Jr, pelo apoio e colaboração na montagem e desenvolvimento do método de cromatografia líquida de alta pressão.

Ao Prof. Timothy L. MacDonald, químico da Universidade de Virginia, que ajudou na síntese do composto alanil-glutamil-glutamina.

A Alessandra C. Silva, Messias S. Santos-Neto e Patrícia M. Carvalho, pela colaboração nos experimentos de perfusão intestinal.

A Domingos Barreto de Oliveira, Maria do Carmo N. de Pinho e Maria Isabel L. McAuliffe, pela efetiva ajuda nas dosagens bioquímicas e estudos microbiológicos.

A Sayonara S. B. de Alencar, Maria Luzia F. Melo e Rosania M. de Paula Silva, enfermeira e agentes de saúde, pela amizade e colaboração intensa e eficiente nos ensaios clínicos com glutamina na comunidade.

À comunidade Gonçalves Dias, especialmente as mães e crianças, pela recepção ao nosso trabalho e motivo maior deste estudo.

Aos funcionários da Unidade de Pesquisas Clínicas, Terezinha F. França, Bento F. de Oliveira e Jociê A. da Silva, pela ajuda no laboratório e biotério.

À administração e apoio técnico da Unidade de Pesquisas Clínicas, nas pessoas de Kátia Maria L. Nogueira, Fabiana Nascimento e José Amadeus Sousa, pela ajuda na confecção e publicação deste trabalho.

Aos colegas do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da UFC, que direta e indiretamente contribuíram para realização deste trabalho.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS.....	I
LISTA DE TABELAS.....	V
RESUMO.....	VIII
ABSTRACT.....	X
1 INTRODUÇÃO.....	2
1.1 Glutamina e Derivados Dipeptídeos.....	2
1.1.1 Histórico.....	2
1.1.2 Estrutura Química.....	4
1.1.3 Bioquímica, Fisiologia e Metabolismo.....	4
1.1.4 Características e Modulação do Transporte Intestinal de Glutamina	12
1.1.5 Metabolismo Intestinal de Glutamina.....	15
1.1.6 Requerimento Nutricional e Impacto de Glutamina na Mucosa e Sistema Imune Gastrointestinal.....	20
1.1.7 Toxicidade da Glutamina.....	22
1.2 Integridade e Permeabilidade do Epitélio Intestinal	24

1.2.1	Conceito de Permeabilidade Intestinal.....	24
1.2.2	Perspectiva Histórica dos Marcadores para os Testes de Permeabilidade Intestinal.....	26
1.2.3	Epitélio Intestinal: Permeação Paracelular e Transcelular.....	30
1.2.4	Métodos Utilizados para Medida da Permeabilidade Intestinal.....	34
1.2.5	Fatores que Alteram a Integridade e Permeabilidade do Epitélio Gastrintestinal.....	42
1.3	Mecanismos de Doenças que Alteram a Permeabilidade Intestinal.....	44
2	JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS.....	49
2.1	Justificativa.....	50
2.2	Objetivos.....	52
2.2.1	Desenvolver e sintetizar um derivado estável da glutamina, denominado alanil-glutamil-glutamina.....	52
2.2.2	Caracterizar o papel da glutamina e derivados no transporte intestinal de eletrólitos e água.....	52
2.2.3	Determinar a sensibilidade e acurácia do método de permeabilidade intestinal com lactulose e manitol, bem como validá-lo nos pacientes com diarreia.....	52

2.2.4	Avaliar o impacto de glutamina na integridade e permeabilidade do epitélio intestinal.....	53
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	54
3.1	Origem e Síntese de Alanil-Glutamil-Glutamina.....	55
3.2	Câmaras de Üssing.....	57
3.2.1	Animal Experimental e Procedimento Cirúrgico.....	57
3.2.2	Soluções Perfusoras.....	59
3.2.3	Aquecimento e Aeração.....	60
3.2.4	Sistema Elétrico.....	60
3.2.5	Protocolo Experimental.....	63
3.2.6	Análise dos Dados.....	64
3.3	Modelo da Alça Intestinal Ligada.....	65
3.3.1	Animal Experimental.....	65
3.3.2	Protocolo Experimental e Dosagens Bioquímicas.....	66
3.3.3	Análise dos Dados.....	66
3.4	Modelo da Perfusão Intestinal.....	67
3.4.1	Animal Experimental.....	67
3.4.2	Protocolo Experimental e Dosagens Bioquímicas.....	67
3.4.3	Análise dos Dados.....	71

3.5	Cromatografia Líquida de Alta Pressão para Detecção de Monossacarídeos e Dissacarídeos.....	71
3.5.1	Açúcares e Reagentes.....	71
3.5.2	Equipamentos.....	72
3.5.3	Preparação das Amostras.....	72
3.5.4	Validação do Teste de Permeabilidade.....	74
3.5.5	Condições Cromatográficas para Análise.....	77
3.5.6	Análise dos Dados.....	77
3.6	Impacto de Glutamina na Integridade e Permeabilidade Intestinal.....	78
3.6.1	Comunidade Urbana Gonçalves Dias.....	78
3.6.2	População para o Ensaio Clínico.....	79
3.6.3	Plano Experimental e Tamanho da Amostra.....	81
3.6.4	Comissão de Ética.....	82
3.6.5	Critérios de Inclusão e Exclusão.....	82
3.6.6	Questionários e Teste de Permeabilidade.....	84
3.6.7	Análise dos Dados.....	85
4	RESULTADOS.....	86
4.1	Estrutura Química e Estabilidade da Glutamina, Alanil-Glutamina	

	e Alanil-Glutamil-Glutamina.....	87
4.2	Sensibilidade e Eficácia <i>In Vitro</i> do Cotransporte Intestinal de Sódio com Glutamina, Alanina e Glicose.....	91
4.3	Efeito <i>In Vitro</i> da Toxina da Cólera no Cotransporte Intestinal de Sódio com Glutamina, Alanina e Glicose.....	97
4.4	Efeito <i>In Vitro</i> de Alanil-Glutamina e Alanil-Glutamil-Glutamina no Cotransporte Intestinal de Sódio.....	97
4.5	Eficácia <i>In Vivo</i> da Solução de Reidratação Oral à Base de Glutamina na Absorção de Eletrólitos e Água.....	103
4.6	Eficácia <i>In Vivo</i> das Soluções de Reidratações Oraís à Base de Alanil-Glutamina e Alanil-Glutamil-Glutamina na Absorção de Eletrólitos e Água.....	110
4.7	Sensibilidade e Acurácia do Método de Cromatografia Líquida de Alta Resolução para Medida de Monossacarídeos e Dissacarídeos..	117
4.8	Validação do Teste Diferencial com Duplos Açúcares, Lactulose e Manitol, em Voluntários Sadios e Pacientes com Diarréia.....	126
4.9	Efeito de Glutamina na Integridade e Permeabilidade do Epitélio Intestinal em Crianças com Diarréia Aguda.....	139
4.10	Efeito de Glutamina na Integridade e Permeabilidade do Epitélio Intestinal em Crianças de Alto Risco para Doenças Diarréicas e/ou	

	Desnutrição.....	148
5	DISCUSSÃO.....	157
5.1	Desenvolvimento e Síntese de Alanil-Glutamil-Glutamina.....	158
5.2	Glutamina e Derivados no Transporte Intestinal de Eletrólitos e Água.....	162
5.3	Caracterização e Importância do Teste de Permeabilidade com Lactulose e Manitol.....	167
5.4	Impacto da Glutamina na Integridade e Permeabilidade Intestinal...	175
6	CONCLUSÕES.....	179
7	REFERÊNCIAS.....	182
8	ANEXOS.....	221

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1 Estrutura química da glutamina e glutamato.....	6
Figura 2 Concentração no sangue de aminoácidos.....	7
Figura 3 Funções e metabolismo da glutamina.....	9
Figura 4 Síntese e catabolismo da glutamina.....	11
Figura 5 Metabolismo oxidativo da glutamina.....	17
Figura 6 Vias transcelular e paracelular.....	31
Figura 7 Alanil-glutamil-glutamina.....	56
Figura 8 Câmaras de Üssing.....	61
Figura 9 Sistema de perfusão intestinal.....	69
Figura 10 Cromatografia líquida de alta pressão.....	73
Figura 11 Teste de permeabilidade intestinal.....	76
Figura 12 Mecanismo de estabilidade química da glutamina.....	88
Figura 13 Degradação ácida da glutamina.....	89
Figura 14 Degradação de glutamina e derivados.....	90
Figura 15 Curvas dose-respostas cumulativas de glutamina, alanina e glicose.....	92
Figura 16 Curva dose-resposta cumulativa de glutamina na ausência de	

	sódio.....	93
Figura 17	Curva dose-resposta cumulativa de alanina na ausência de sódio.....	94
Figura 18	Curva dose-resposta cumulativa de glicose na ausência de sódio.....	95
Figura 19	Coeficientes de Hill para glutamina, alanina e glicose.....	96
Figura 20	Efeito secretório de toxina da cólera.....	98
Figura 21	Efeito de glutamina no intestino pré-tratado com toxina da cólera.....	99
Figura 22	Efeito de alanina no intestino pré-tratado com toxina da cólera	
Figura 23	Efeito de glicose no intestino pré-tratado com toxina da cólera.	
Figura 24	Transporte eletrogênico intestinal de glicosilaminoácidos e peptídeos.....	102
Figura 25	Secreção de água e sódio induzida pela toxina da cólera na perfusão intestinal do íleo de coelho.....	106
Figura 26	Efeito no transporte de sódio da solução com glutamina no modelo de diarreia secretória induzido pela toxina da cólera.....	107
Figura 27	Efeito no transporte de água da solução com glutamina no modelo de diarreia secretória induzido pela toxina da cólera.....	108
Figura 28	Curva dose-efeito da toxina da cólera em alça intestinal isolada	

	de rato.....	115
Figura 29	Curva tempo-efeito da toxina da cólera em alça intestinal isolada de rato.....	116
Figura 30	Cromatograma das amostras de açúcares-padrões.....	122
Figura 31	Curvas dos açúcares-padrões medidos por cromatografia líquida de alta pressão.....	123
Figura 32	Cromatograma típico de uma criança sadia e de uma criança com diarreia.....	128
Figura 33	Excreção urinária de lactulose em crianças com e sem diarreia.	130
Figura 34	Taxa de lactulose/manitol em crianças com e sem diarreia.....	131
Figura 35	Excreção urinária de manitol em crianças com e sem diarreia...	132
Figura 36	Cromatografia típica de paciente HIV ⁺ com e sem diarreia.....	133
Figura 37	Excreção de lactulose em voluntários sadios e pacientes HIV ⁺ com e sem diarreia.....	136
Figura 38	Excreção de manitol em voluntários sadios e pacientes HIV ⁺ com e sem diarreia.....	137
Figura 39	Taxa de lactulose/manitol em voluntários sadios e pacientes HIV ⁺ com e sem diarreia.....	138
Figura 40	Taxa de lactulose/manitol em pacientes HIV ⁺ com e sem <i>Cryptosporidium</i> spp.....	140

Figura 41	Excreção de manitol em pacientes HIV ⁺ com e sem Cryptosporidium spp.....	141
Figura 42	Excreção de lactulose em pacientes HIV ⁺ com e sem Cryptosporidium spp.....	142
Figura 43	Protocolo experimental para o ensaio clínico de glutamina.....	147
Figura 44	Efeito de glutamina na taxa de lactulose/manitol em crianças com diarreia.....	150
Figura 45	Efeito de glutamina na excreção de lactulose em crianças com diarreia.....	151
Figura 46	Efeito de glutamina na excreção de manitol em crianças com diarreia.....	152
Figura 47	Efeito de glutamina na taxa de excreção de lactulose / manitol em crianças de alto risco.....	154
Figura 48	Efeito de glutamina na excreção de lactulose em crianças de alto risco.....	155
Figura 49	Efeito de glutamina na excreção de manitol em crianças de alto risco.....	156

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1 Sistemas de transportes de glutamina acoplados com sódio em diferentes células.....	14
Tabela 2 Taxas de permeabilidade intestinal e recuperação de vários marcadores moleculares em indivíduos normais.....	36
Tabela 3 Composição da solução de reidratação oral à base de glutamina e da solução-padrão recomendada pela Organização Mundial de Saúde para o tratamento de diarreia.	83
Tabela 4 Composição química da solução de Ringer modificada, solução de reidratação oral recomendada pela Organização Mundial de Saúde e solução de reidratação à base de glutamina.....	104
Tabela 5 Efeito da solução de Ringer modificada, solução de reidratação oral recomendada pela Organização Mundial de Saúde e solução de reidratação oral à base de glutamina no transporte de cloro, potássio, osmolalidade e pH, utilizando o modelo de diarreia secretória induzido pela toxina da cólera.....	111

Tabela 6	Composição química da solução de Ringer, solução com glutamina, solução com alanil-glutamina, solução com alanil-alanina e solução com alanil-glutamil-glutamina.....	112
Tabela 7	Efeito de glutamina, alanil-glutamina, alanil-alanina e alanil-glutamil-glutamina na absorção intestinal de eletrólitos e água.....	113
Tabela 8	Efeitos das soluções de Ringer, glicose, glutamina e alanil-glutamina na absorção intestinal de eletrólitos e água.....	117
Tabela 9	Determinação por cromatografia líquida de alta pressão com detecção amperométrica da variação intra-experimental e percentual de recuperação das amostras de açúcares-padrões..	119
Tabela 10	Determinação da variação intra-experimental dos tempos de retenções dos açúcares-padrões medidos por cromatografia líquida de alta pressão com detecção amperométrica.....	120
Tabela 11	Determinação por cromatografia líquida de alta pressão com detecção amperométrica da variação inter-experimental e percentual de recuperação das amostras de açúcares-padrões..	124
Tabela 12	Determinação da variação inter-experimental dos tempos de retenções dos açúcares-padrões medidos por cromatografia líquida de alta pressão com detecção amperométrica.....	125

Tabela 13	Total de crianças com diarreia que participaram do ensaio clínico da solução de reidratação oral com glutamina.....	144
Tabela 14	Idade, peso e grau de desidratação das crianças com diarreia submetidas ao ensaio clínico com glutamina.....	145
Tabela 15	Evolução clínica das crianças com diarreia e em tratamento com solução de reidratação oral com glutamina.....	146
Tabela 16	Idade, sexo, peso e ingesta de solução das crianças consideradas de alto risco submetidas ao ensaio clínico com glutamina.....	153

RESUMO

A glutamina (Gln) é a principal fonte energética e de precursores para síntese de nucleotídeos e proteínas no epitélio intestinal. Entretanto, Gln é instável em pH ácido, dificultando seu uso no tratamento de diarreias e desnutrição. Os objetivos deste estudo foram o desenvolvimento e síntese química de um derivado estável da Gln, bem como a avaliação do impacto da Gln e alanil-glutamil-glutamina (AGG) no transporte de água, eletrólitos e permeabilidade do epitélio intestinal. O método químico da reação de fase sólida foi utilizado para síntese de AGG. O acoplamento de alanina (Ala) e Gln na molécula original de Gln previne completamente a degradação ácida (pH = 1) da mesma, incubada por 375 h. Gln e Ala tiveram eficácia maior do que a glicose (Gli) no cotransporte com Na^+ , medido em íleo de coelho montado em câmaras de Üssing. Nesse modelo, a AGG e alanil-glutamina (Ala-Gln) induziram significativo aumento no transporte eletrogênico. Estes substratos também causaram aumento significativo no transporte de água e eletrólitos no modelo *in vivo* de perfusão intestinal de rato. A solução de reidratação oral com glutamina (SRO-Gln) foi capaz de reverter a secreção intestinal de água e eletrólitos no modelo de diarreia secretória induzido pela toxina da cólera (TC = 84 kDa; 1 $\mu\text{g/ml}$). Para avaliar o impacto de Gln na

permeabilidade intestinal em crianças, desenvolvemos e utilizamos o teste com lactulose (L) e manitol (M). Trinta e oito crianças com diarreia aguda foram selecionadas para participar no estudo caso-controle, aleatório e duplo-cego. Diferente do grupo controle, as crianças que tomaram por 5 dias a SRO-Gln e completaram o estudo mostraram redução da lesão intestinal (Teste L/M: $0,1510 \pm 0,0974$ vs. $0,0741 \pm 0,0457$, N = 9 pares, p = 0,056). Trinta crianças consideradas de alto risco para terem novos episódios de diarreia e/ou desnutrição foram também selecionadas para participar do mesmo tipo de estudo. Diferente, também, do controle, as crianças que tomaram SRO-Gln mostraram uma redução significativa na lesão intestinal (Teste L/M: $0,06569 \pm 0,01821$ vs. $0,04350 \pm 0,00803$; N = 13; p = 0,03). Estes resultados demonstram a melhor eficácia da Gln e Ala comparadas com Gli no transporte intestinal de Na^+ . A SRO-Gln foi mais eficaz do que a SRO-controle na diarreia secretória induzida pela TC. AGG mostrou-se estável em pH ácido e aumentou o transporte intestinal de água e eletrólitos. A SRO-Gln diminuiu a lesão intestinal observada em crianças de alto risco ou com diarreia.

Palavras-chaves: Glutamina, alanil-glutamina, alanil-glutamil-glutamina, cotransporte com sódio, permeabilidade intestinal, diarreia, desnutrição.

ABSTRACT

Glutamine (Gln) is the principal source of energy and precursors for protein and nucleotide synthesis in the intestinal epithelial cells. However, Gln is unstable in acidic conditions, which make it difficult to use for diarrhea and malnutrition treatment. The objectives of this study were to develop and synthesize a stable Gln derivative, and to evaluate the impact of Gln and alanyl-glutamyl-glutamine (AGG) on water and electrolytes transport and on intestinal epithelial permeability. The chemical method used to synthesize AGG employed a solid phase reaction. The addition of alanine (Ala) and Gln to the original molecule of Gln completely prevents its degradation in acidic conditions (pH = 1) when incubated for 375 h. Gln and Ala were more efficient than glucose (Glu) in the intestinal cotransport of Na^+ , measured in isolated ileum mounted in Ussing chambers. In the same model, AGG and alanyl-glutamine (Ala-Gln) induced a significant increase in the electrogenic transport. These substrates caused also a significant increase in the water and electrolytes transport, using the in vivo rat intestinal perfusion. The oral rehydration solution with glutamine (ORS-Gln) completely reversed the intestinal secretion of water and electrolytes in the

secretory model induced by cholera toxin (CT = 84 kDa; 1 μ g/ml). To evaluate the impact of Gln in the intestinal permeability of children, we developed and utilized the lactulose (L)/mannitol (M) test. Thirty eight children with acute diarrhea were selected to participate in a case-control study that was randomized and double-blind. In contrast to untreated controls, children who took ORS-Gln and completed the study, showed a borderline significant reduction in intestinal damage (by L/M test: : 0.1510 ± 0.0974 vs. 0.0741 ± 0.0457 , N = 9 pairs, p = 0.056). Thirty high risk children for more diarrheal episodes and/or malnutrition were also selected to participate in a similar study design. Again, in contrast to controls, children in the ORS-Gln group showed a significant reduction in the intestinal damage (L/M test: 0.06569 ± 0.01821 vs. 0.04350 ± 0.00803 ; N = 13; p = 0,03). These results demonstrate that Gln and Ala had a better efficacy than Glu in the intestinal Na⁺ transport. The ORS-Gln was more efficient than ORS-control in the secretory diarrhea induced by cholera toxin. AGG was stable in acidic conditions and was able to increase intestinal water and electrolyte transport. ORS-Gln was able to decrease intestinal damage in high risk children or children with diarrhea.

Key-words: Glutamine, alanyl-glutamine, alanyl-glutamyl-glutamine, sodium cotransport, intestinal permeability, diarrhea and malnutrition.

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

1.1 Glutamina e Derivados Dipeptídeos

1.1.1 Histórico

Na década de 1930, o metabolismo da glutamina era pouco conhecido, quando foi demonstrado pela primeira vez, por KREBS, que o rim era capaz de sintetizar e metabolizar esse substrato (KREBS, 1935). A partir desses achados, foi evidenciado que a glutamina é ativamente transportada e metabolizada em quase todos os tecidos. Em adição, é bem conhecido que este aminoácido é o mais abundante na circulação e o mais concentrado no interior das células. A taxa de troca desse aminoácido entre os órgãos excede àquelas dos outros aminoácidos e, por conseguinte, a glutamina é considerada o principal veículo de transferência de nitrogênio entre os tecidos. Apesar da enorme capacidade do organismo de repor glutamina, estocada principalmente no músculo esquelético, esse aminoácido pode ser depletado no curso de estados catabólicos, tais como, traumatismo e infecção. A modulação desta depleção e a consequente queda da concentração de glutamina nos tecidos e no sangue continua sendo um alvo para estudo e novas aplicações terapêuticas.

ROSE, em 1938, mostrou que glutamina é um aminoácido não essencial, já que é sintetizada *de novo* no organismo (ROSE, 1938). A principal enzima responsável pela síntese desse aminoácido é a glutamina sintetase, encontrada em altas concentrações em muitos órgãos, como, músculo esquelético, pulmão, cérebro e fígado. Em condições fisiológicas, o organismo tem a capacidade de sintetizar quantidades adequadas de glutamina. Desta forma, a glutamina pode não ser essencial na dieta. Entretanto, está bem estabelecido que algumas células do corpo apresentam grande habilidade de captação e metabolismo desse aminoácido, sugere que, em determinadas circunstâncias, a glutamina é requerida como suplemento na dieta.

Especialmente em estados catabólicos, como traumatismo e infecção, a glutamina é considerada um aminoácido fundamental. Em geral, a glutamina se compõe de 4-8% do resíduo de aminoácidos presentes nas proteínas normais da dieta, o que equivale a menos de 10 gramas/dia na dieta de uma pessoa adulta normal. Por outro lado, em pacientes com traumatismo ou infecção, a necessidade de glutamina na dieta atinge níveis entre 20-40 gramas/dia, mostrando, assim, sua necessidade para manutenção da homeostase após um estímulo catabólico.

1.1.2 Estrutura Química

A glutamina é um aminoácido neutro com peso molecular de 146,1 Da (**Figura 1**). É glicogênico, isto é, sua estrutura de carbono pode ser convertida em glicose no fígado; diferente dos outros aminoácidos, apresenta dois grupos de nitrogênio: o grupo α -amino e o grupo amida (KREBS, 1935). Neste caso, 19% do peso molecular de glutamina são provenientes do nitrogênio. Por conta desses dois grupos de nitrogênio, a glutamina é também classificada como aminoácido amida, assim como, a histidina e a asparagina. Essa última classificação tem importância porque aminoácidos com estruturas semelhantes competem pelo mesmo carreador protéico para entrada nas células.

1.1.3 Bioquímica, Fisiologia e Metabolismo

A glutamina circula no sangue de mamíferos na concentração de 0,5-0,8 mM (**Figura 2**). Nessa concentração, é considerada o mais abundante aminoácido circulante, seguido da alanina, com a concentração de aproximadamente 0,35 mM. Essa observação, juntamente com o fato de que a glutamina apresenta dois grupos de nitrogênios na sua molécula, explica por que esta é considerada o principal aminoácido para o transporte de nitrogênio no sangue. Nesse caso, a glutamina é responsável pelo transporte

de amônia, de uma forma não tóxica, dos tecidos periféricos para os órgãos onde a amônia pode ser excretada como *amonium* no rins ou convertida em uréia no fígado. É estimado que aproximadamente 50% de nitrogênio excretado na urina, como amonium ou uréia, são provenientes da glutamina.

A concentração, no sangue, de glutamina é mantida quase constante e essa modulação é dependente das taxas de captação e liberação da glutamina pelos tecidos e órgãos do corpo. Apesar da variação entre diferentes espécies, é aceito na literatura que o intestino delgado é o principal órgão de captação da glutamina, considerando o estado basal do organismo, isto é, após o período de digestão das refeições (WINDMUELLER, 1982; WINDMUELLER e SPAETH, 1975; WINDMUELLER e SPAETH, 1980; WINDMUELLER e SPAETH, 1974; SOUBA e cols., 1990; HANSON e PARSON, 1977). Por outro lado, após uma refeição rica em glutamina, o fígado é o principal consumidor, agindo assim, como um órgão para homeostase de glutamina no organismo. O rim também faz a captação de glutamina no estado basal, porém, o consumo é

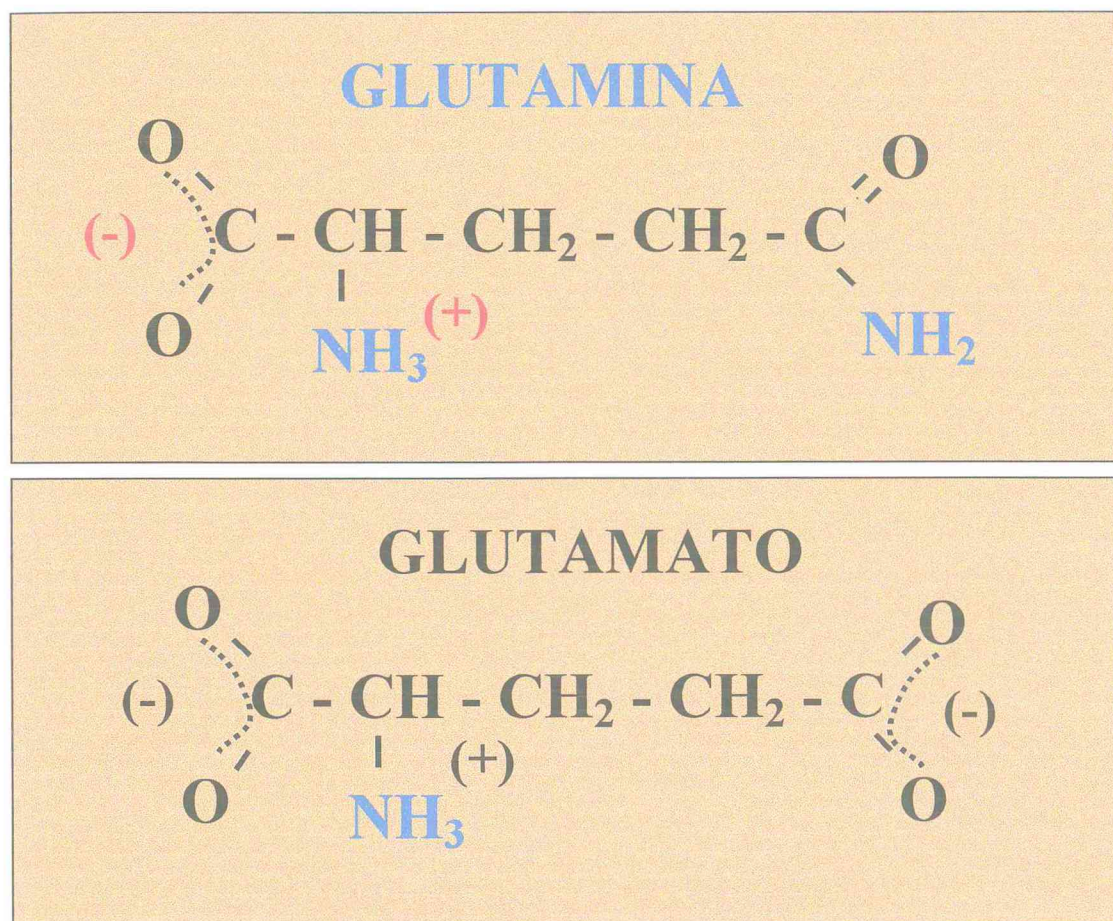


Figura 1 - Estrutura química da glutamina e glutamato. A glutamina (141.1 Da) é um aminoácido neutro e tem na sua estrutura dois grupos de nitrogênio. O catabolismo da glutamina pela ação da glutaminase resulta na formação de glutamato e amônia.

Concentração de aminoácidos no sangue

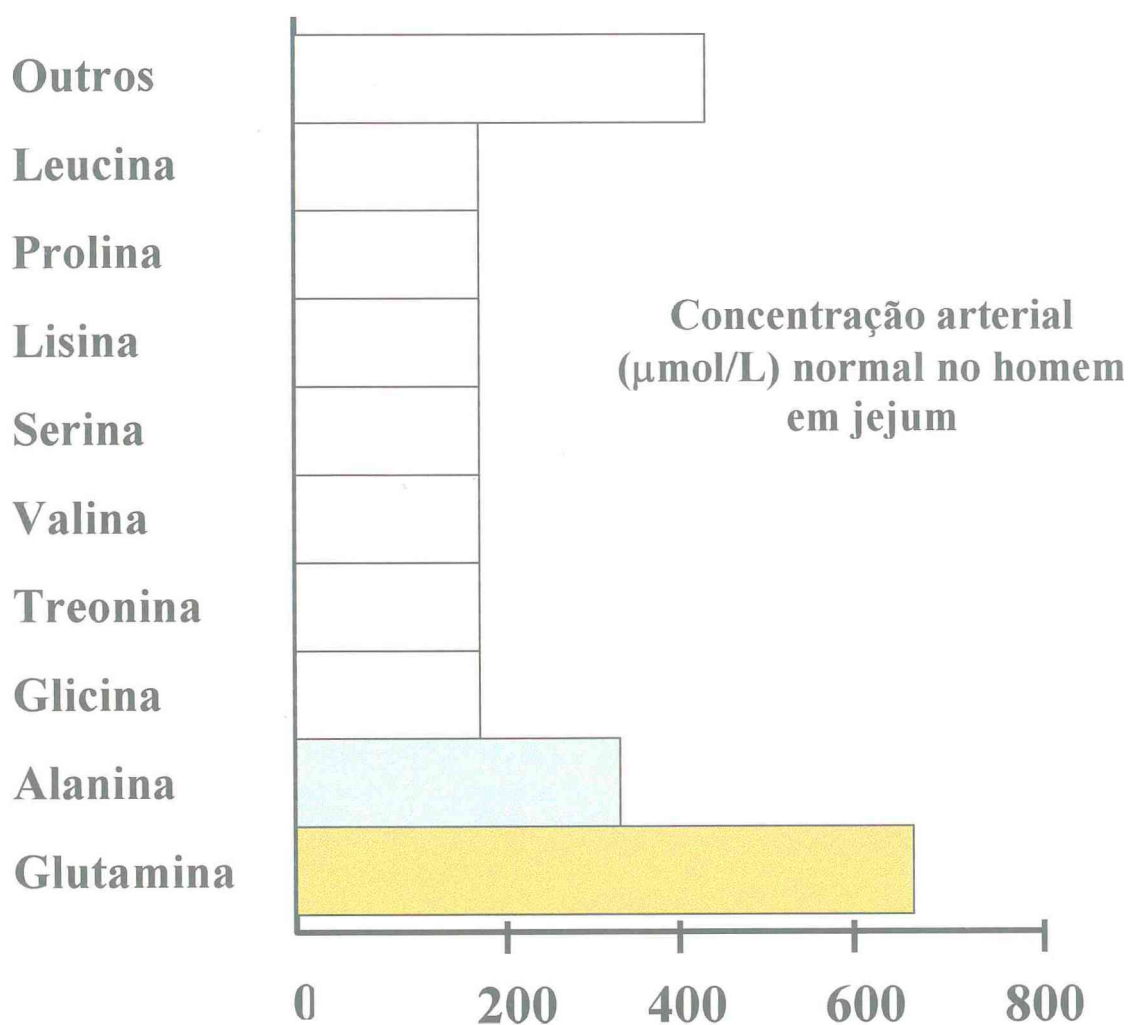


Figura 2 – Concentração normal no sangue humano de vários aminoácidos, incluindo a glutamina. Modificado de SOUBA, 1992.

mais significativo no estado de acidose, quando uma quantidade adicional de glutamina é necessária para suprir a aminoagênese renal. O músculo esquelético e pulmões normalmente são capazes de liberar para o sangue a glutamina, porque suas capacidades sintetizam novamente esse aminoácido, a partir de glutamato e amônia (PLUMLEY e cols., 1990).

A glutamina participa de importantes vias metabólicas no organismo (**Figura 3**). Numa revisão de 1935, EAGLE descreve sua importância para células de mamíferos em cultura, enfatizando-a, assim, como nutriente (EAGLE, 1935). Na década de 1980, KREBS chama a atenção, novamente, para o papel desse aminoácido no metabolismo de nitrogênio (KREBS, 1980). Assim, glutamina é encontrada em alta concentração nas células dos mamíferos, onde é utilizada para retirada de amônia, de uma forma não tóxica, do organismo, síntese de proteínas e fonte de nitrogênio para síntese de compostos essenciais, como nucleotídios e outros aminoácidos. Esse aminoácido é considerado ainda o principal substrato para aminoagênese renal e como principal substrato energético para algumas células. No fígado, o metabolismo da glutamina está relacionado com a síntese de uréia e amônia, e, no fibroblasto, parece importante na proliferação e no processo de cicatrização tecidual.

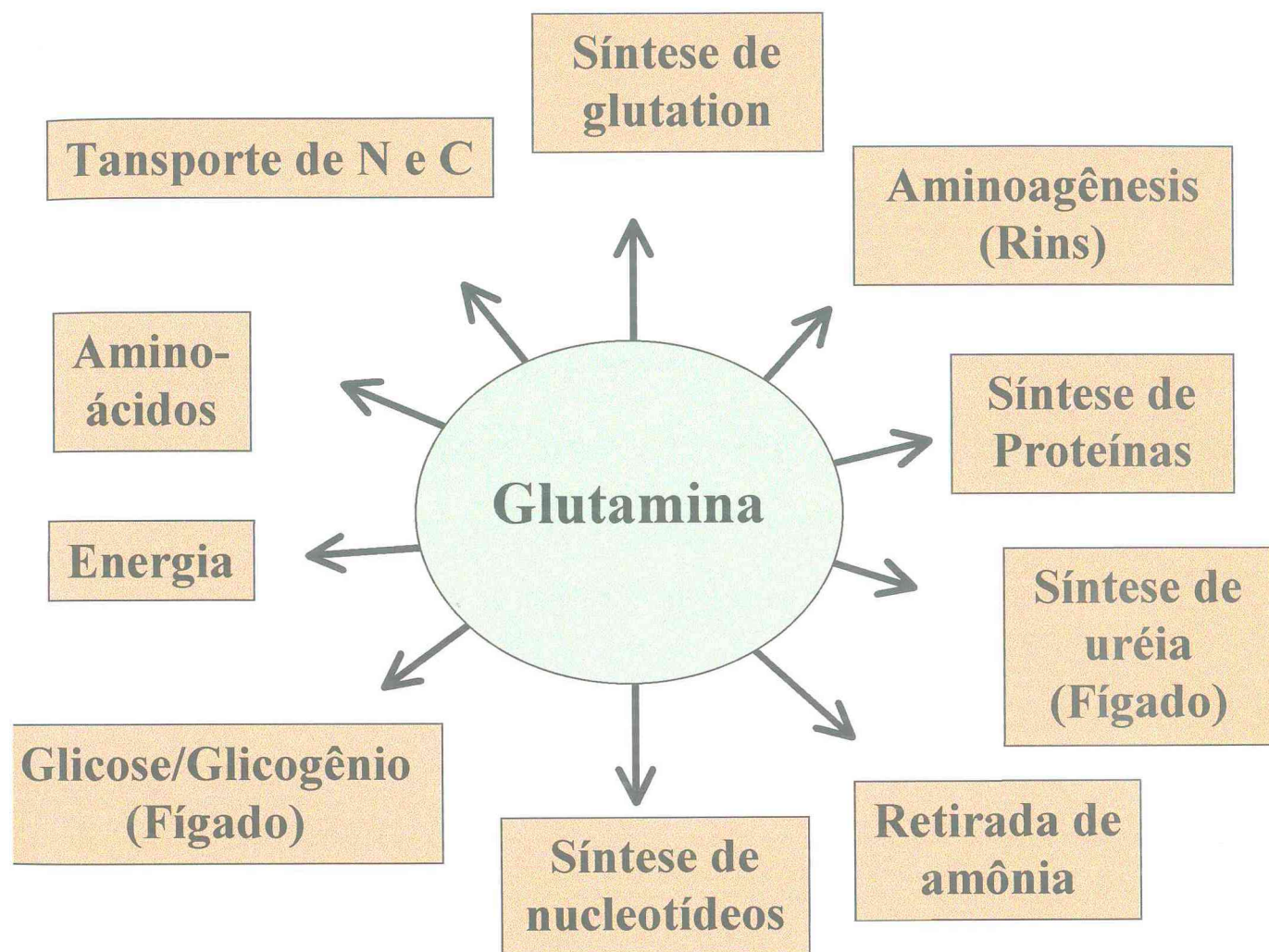


Figura 3 – A glutamina participa de algumas funções e importantes vias metabólicas no organismo.

Existem duas enzimas que regulam a síntese e o catabolismo da glutamina (SOUBA e cols., 1985). A glutaminase cataliza a hidrólise de glutamina em glutamato e amônia, e a glutamina sintetase cataliza a síntese de novo de glutamina a partir de glutamato e amônia (**Figura 4**). Algumas células são consideradas consumidoras de glutamina e possuem concentrações relativamente altas de glutaminase, como: células da mucosa intestinal, linfócitos e células do túbulo renal. Outras células são produtoras de glutamina e, por conseguinte, possuem alta atividade de glutamina sintetase, como o músculo esquelético, neurônios e algumas células dos pulmões. O fígado constitui uma exceção, o qual pode produzir ou consumir glutamina, dependendo da necessidade de outros órgãos. Em células de mamíferos, a glutamina sintetase localiza-se no citoplasma, enquanto a glutaminase encontra-se dentro da mitocôndria (SOUBA e cols., 1985).

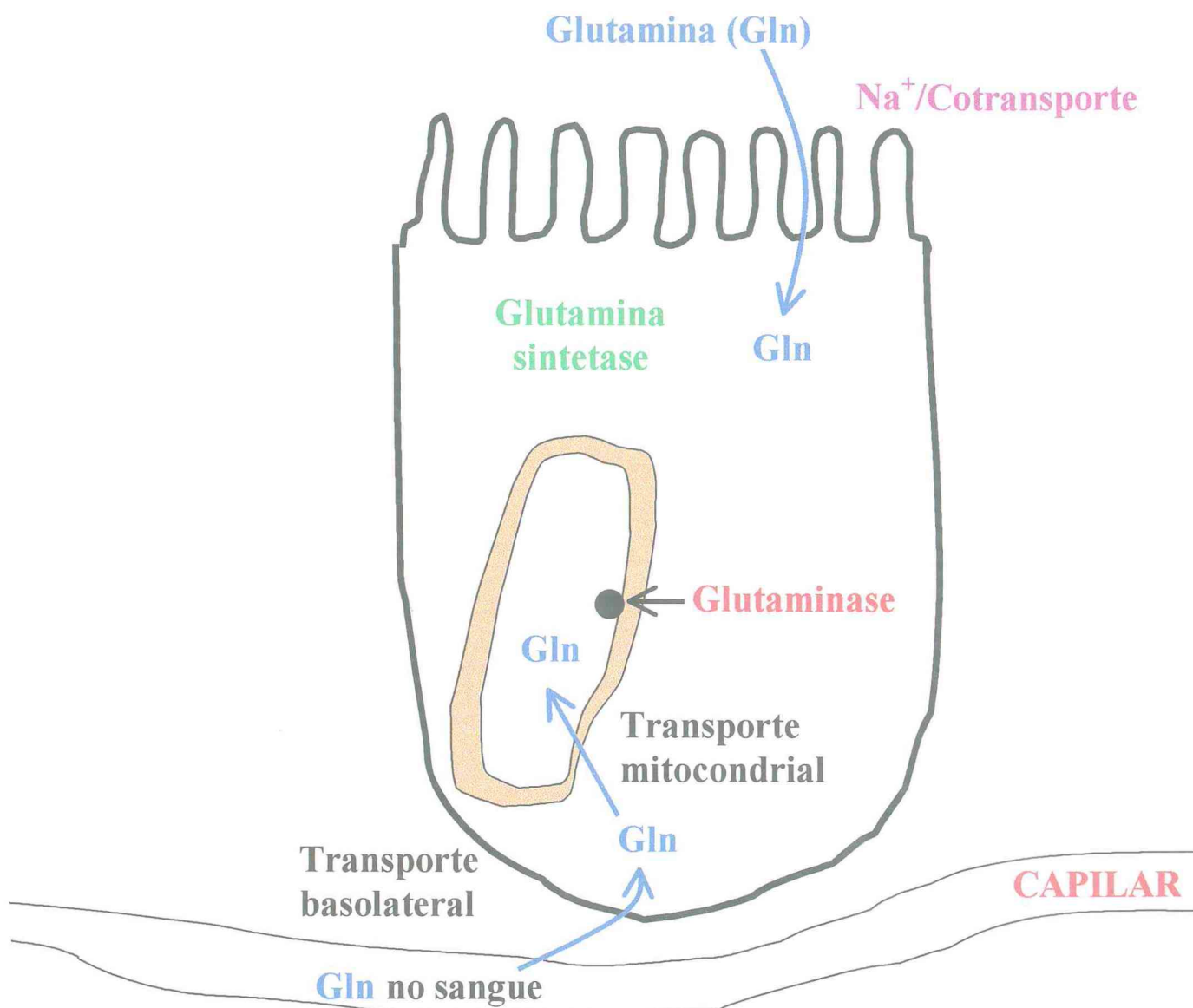


Figura 4 - Síntese e catabolismo da glutamina nas células do epitélio intestinal. A glutaminase cataliza a hidrólise de glutamina em glutamato e amônia, e a glutamina sintetase faz a síntese de novo de glutamina a partir de glutamato e amônia.

1.1.4 Características e Modulação do Transporte Intestinal de

Glutamina

O transporte de glutamina do espaço extracelular para o espaço intracelular é mediado por um transportador, o qual se liga ao substrato através do sítio ativo presente na proteína transportadora (CHRISTENSEN, 1990; SHOTWELL e cols., 1983; STEVENS e cols., 1990; BODE e cols., 1990; STEVENS e WRIGHT, 1987). Não existe um transportador específico para glutamina, mas sistemas de transportadores que se ligam com a glutamina e aminoácidos estruturalmente relacionados. Cada sistema de proteína transportadora se liga com uma classe de aminoácidos (aa), tais como: neutros, catiônicos, aromáticos e amidas.

O transporte de glutamina para o citoplasma da célula é um processo ativo que envolve a ligação do aa com o sítio ativo da proteína transportadora, que, por sua vez, apresenta vários domínios na membrana celular. A maioria desses transportadores requer a presença de íons sódio para sua atividade máxima e, assim, o aa é transportado acoplado com o íon sódio para dentro da célula. O gradiente de sódio do espaço extracelular para o espaço intracelular, bem como a diferença de potencial, negativa no espaço

intracelular, facilitam a permeação da glutamina para o citoplasma celular. A ligação do sódio com o transportador aumenta sua afinidade para com a glutamina do lado externo da membrana, facilitando assim, a formação do complexo sódio/glutamina transportador. A mudança estrutural do complexo protéico resulta na entrada de sódio e glutamina no citoplasma (STEVENS e WRIGHT, 1987).

Os diferentes sistemas de transportadores de glutamina dependentes de sódio encontrados em membranas de células diferentes são mostrados na **Tabela 1**. Como citado, estes sistemas não são específicos para glutamina, mas transportam vários aminoácidos. O transportador N é identificado somente na membrana do hepatócito (KILBERG e cols., 1980) e é denominado assim porque apresenta seletividade para aa com grupos aminos na cadeia lateral, como a glutamina, histidina e asparagina. Esse transportador apresenta características diferentes de dois outros transportadores para aa dependentes de sódio, denominados sistemas A e ASC, encontrados em hepatócitos de ratos. O transportador encontrado no músculo esquelético é chamado de N^m e é ativado por sódio ou lítio (AHMED e cols., 1990).

O epitélio intestinal possui transportador de glutamina, o qual é encontrado somente nesse tecido. O sistema B, carreador de aa neutros, é

sódio dependente, transporta glutamina e a maioria dos aa dipolares. Tal sistema é semelhante ao encontrado em blastocistos e oócitos. Esse sistema está presente em células do epitélio intestinal como Caco-2 (SOUBA e cols., 1992), intestino de coelho (STEVENS e cols., 1984; STEVENS e cols., 1982) e intestino humano (SAID e cols., 1989).

Tabela 1 – Sistemas de transportes de glutamina acoplados com sódio em diferentes células

Células	Sistemas de Transportes	Regulação
Hepatócitos	N e A	Insulina, glucagon corticóides, ? IL-6 *
Céls. Endoteliais	ASC	LPS, citocinas
Céls. Alveolares	A e ASC	-
Fibroblastos	A e ASC	TNF
Enterócitos	B	EGF, IFN- γ
Céls. Musculares	N ^m	Corticóides
Linfócitos	ASC	-

* Ainda não definido na literatura.

Hormônios e citocinas são importantes para a modulação do transporte ou captação de glutamina pelas células, tanto no estado normal como catabólicos. O sistema A de transporte é um dos mais sensíveis à modulação de hormônios como: glicocorticóides, glucagon e insulina (CHRISTENSEN, 1990). A resposta nesse sistema é rápida (3-4 horas) e a atividade do transportador aumenta significativamente. O sistema N, presente nos hepatócitos, também responde tardiamente (18-30 horas) à ação de hormônios como dexametasona, insulina ou glucagon (GEBHARDT e KLEEMANN, 1987). Endotoxina e citocinas como - interleucina-1 (IL-1) e fator de necrose tumoral (TNF) também estimulam o transporte de glutamina no endotélio pulmonar (HERSKOWITZ e cols., 1991). Fatores de crescimento como – fator de crescimento de epiderme (EGF) e hormônio do crescimento (GH) são potencialmente indicados para acelerar a recuperação e estimular cicatrização tecidual. O tratamento de ratos com o fator de crescimento de epiderme resulta no aumento significativo do cotransporte de sódio com glutamina no jejuno (SALLOUM e cols., 1993).

1.1.5 Metabolismo Intestinal de Glutamina

Os conhecimentos nesta área são creditados principalmente aos trabalhos pioneiros de WINDMEULLER e SPAETH (WINDMEULLER e

SPAETH, 1974; WINDMUELLER e SPAETH, 1975; WINDMUELLER, 1982; WINDMUELLER e SPAETH, 1980). O intestino delgado e enterócitos isolados (ASHY e ARDAWI, 1988) possuem enorme capacidade de captação e metabolismo da glutamina. O intestino delgado é responsável pelo consumo de aproximadamente 40% do total de glutamina presente no rato experimental. A maior parte do consumo ocorre no epitélio intestinal, o qual exibe uma intensa atividade proliferativa e de renovação, previsível pela enorme quantidade e atividade de glutaminase (PINKUS e WINDMUELLER, 1977).

A oxidação da glutamina pelo epitélio intestinal mantém o aporte energético para mucosa e fornece os precursores para ureagênese e gliconeogênese no fígado (**Figura 5**). Outro estudo sugere que a glutamina faz parte de um dos nutrientes necessários na dieta para recuperação e manutenção da integridade da mucosa intestinal (KLIMBERG e cols., 1990). Essa importância da glutamina talvez seja verdadeira, porquanto este aminoácido é essencial para a síntese de ácidos nucléicos e para a síntese de compostos intermediários importantes na proliferação celular (NEWSHOLME e cols. 1988; NEWSHOLME e PARRY-BILLINGS, 1990). Esse fato pode ser especialmente importante durante doenças severas, nas quais o intestino geralmente apresenta alterações de permeabilidade e

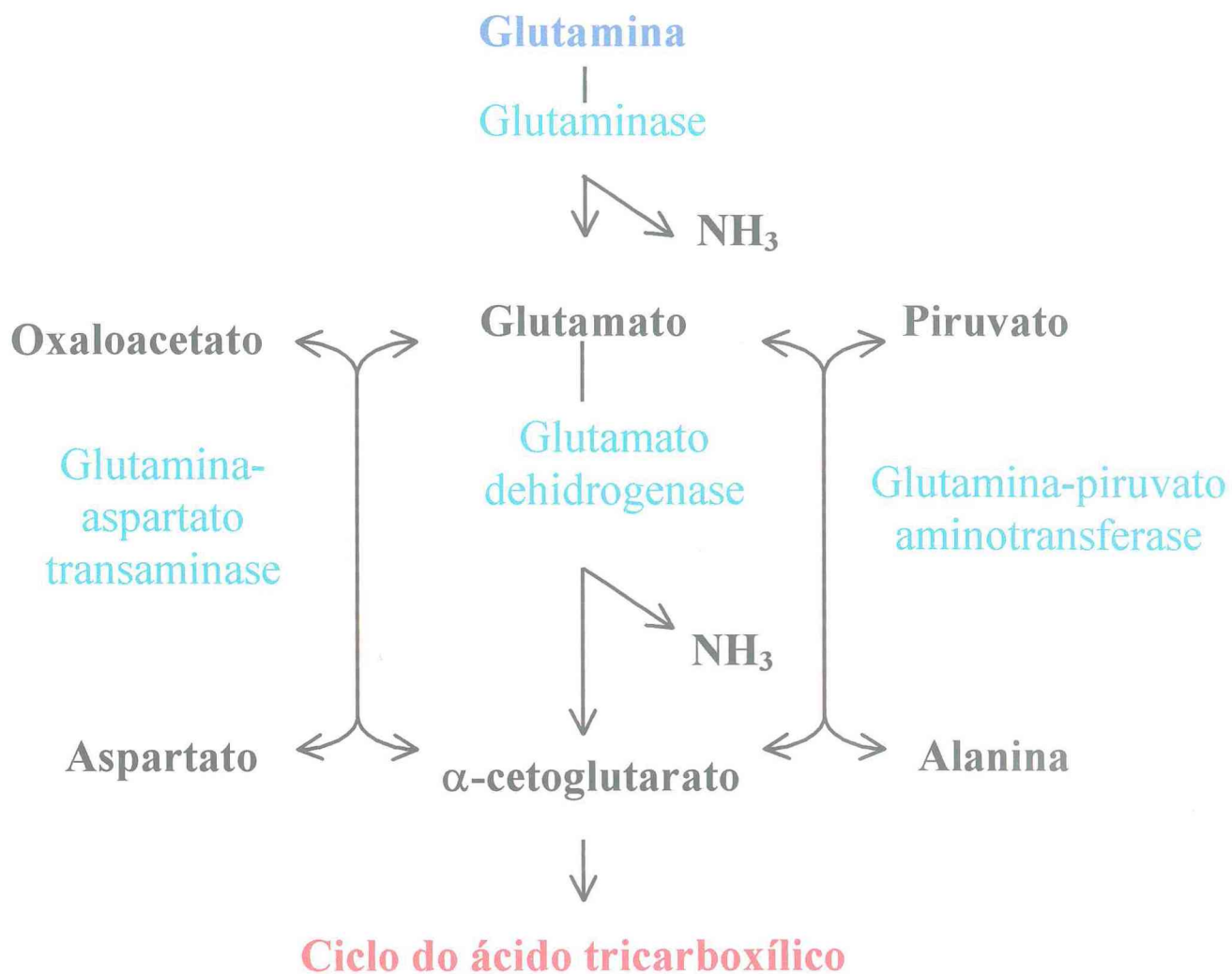


Figura 5 - O metabolismo oxidativo da glutamina pelo epitélio intestinal mantém o aporte energético para mucosa e fornece os precursores para ureagênese e gliconeogênese no fígado.

lesões do epitélio. As implicações terapêuticas dessas questões são enormes, haja vista que as soluções de aminoácidos, normalmente utilizadas ou comercialmente disponíveis para nutrição enteral ou parenteral, não contêm ou apresentam quantidades inadequadas de glutamina. Estudos realizados com ratos (WINDMEULLER e SPAETH, 1974; WINDMUELLER e SPAETH, 1975; WINDMUELLER, 1982; WINDMUELLER e SPAETH, 1980; FOX e cols., 1988; AUSTGEN e cols., 1991; HANSON e PARSON, 1977; SARANTOS e cols., 1992; SOUBA e cols, 1990; ANDERSON e cols., 1976; GHISHAM e cols., 1989), carneiros (HEITMAN e BERGMANN, 1978), cachorros (CERSOSIMO e cols., 1986; SOUBA e cols., 1985; SOUBA e WILMORE, 1983; SOUBA e cols., 1985; BULUS e cols., 1989) e humanos (SOUBA e cols., 1990; SALLOUM e cols., 1991; HERSKOWITZ e cols., 1990; DARMAUN e cols., 1991; SAID e cols., 1989) confirmam a importância central que ocupa o intestino no metabolismo da glutamina. No intervalo entre as alimentações, o lúmen intestinal está relativamente vazio, o trato gastrintestinal de um rato adulto (250 g) consome o equivalente a 60-80 $\mu\text{mol/hora}$ de glutamina presente no plasmato.

GRISHAN e cols. (1989) demonstraram que a captação da glutamina através da membrana basolateral do epitélio intestinal ocorre

mediada via cotransporte com sódio e por um processo independente de sódio. Em ambos os casos, os processos apresentam uma cinética de saturação e são inibidos por aminoácidos neutros. Apesar da avidéz de captação intestinal de glutamina, sua concentração intracelular é baixa, comparada com amostras de glutamina livre presente nas células musculares e hepatócitos. Essa baixa concentração é consistente com o rápido transporte mitocondrial e degradação da glutamina via glutaminase dependente de fosfato (**Figura 4**). A atividade dessa enzima, a qual está ligada com a membrana interna mitocondrial, é modulada por fatores tais como dieta (SALLOUM e cols., 1991; KLIMBERG e cols., 1989), glicocorticóides (SARANTOS e cols., 1992) e citocinas (AUSTGEN e cols., 1992).

Na autoperfusão do intestino, aproximadamente 64% da glutamina são oxidados a dióxido de carbono, o qual representa a maior parte do dióxido de carbono produzido pelo intestino delgado (WINDMUELLER e SPAETH, 1974; WINDMUELLER, 1982). Colonócitos também utilizam glutamina, mas sua principal fonte energética é o n-butirato (ROEDIGER, 1982; ARDAWI, 1986).

1.1.6 Requerimento Nutricional e Impacto de Glutamina na Mucosa e Sistema Imune Gastrintestinal

A dificuldade de acesso à veia porta *in vivo* torna difícil o estudo da captação e metabolismo da glutamina no trato gastrintestinal humano. No entanto, em pacientes saudáveis submetidos a cirurgia e estudados durante o período operatório, foi mostrado que a extração de glutamina, medida pela drenagem portal do trato gastrintestinal, é de 12-13% (SALLOUM e cols., 1991; HERSKOWITZ e cols., 1990) comparada com 7% em cachorros (SOUBA e WILMORE, 1983; SOUBA e cols., 1985) e 18-20% em ratos (AUSTGEN e cols., 1991; SALOUM e cols., 1991). Isso pode ser expresso como taxa de consumo de glutamina igual a 1200 nmol/kg de peso/min, isto é, aproximadamente 18-20 g/dia de glutamina são consumidos pelo trato gastrintestinal. A média de ingestão de glutamina por dia na dieta é entre 5-8 g.

HWANG e cols. (1987) demonstram que soluções para nutrição parenteral total com glutamina causam aumento do peso da mucosa jejunal e do conteúdo de ácido desoxirribonucléico (ADN), e que a suplementação com esse aa previne a atrofia da mucosa. KLIMBERG e cols. (1989) demonstram também que a suplementação dessas soluções com glutamina aumentam a atividade de glutaminase e a utilização intestinal de glutamina.

A glutamina, quando dada por via enteral ou parenteral, aumenta seu transporte na mucosa jejunal (SALLOUM e cols., 1990; SALLOUM e cols., 1990). Vários investigadores têm demonstrado que dietas, tanto enteral como parenteral, contendo glutamina aumentam a altura da vilosidade intestinal e o conteúdo de nitrogênio na mucosa, bem como estimulam o crescimento da mucosa após período de inanição (GRANT, 1988; BARBER e cols., 1990; SALLOUM e cols., 1989).

O uso de soluções para nutrição parenteral total contendo glutamina é relacionado com a diminuição de translocação bacteriana intestinal (BURKE e cols., 1989). Essa diminuição de translocação bacteriana é associada com a normalização da secreção de imunoglobulina A, denominada IgA secretória. Essa terapia de suplementação com glutamina resulta também na manutenção de populações de células B e T na lâmina própria do íleo (ALVERDY e cols., 1992). Outros investigadores mostram que a lesão da mucosa intestinal induzida por quimioterapia e radioterapia, em ratos, cicatriza rapidamente e essa lesão é prevenida com o uso de glutamina na dieta. FOX e cols. (1988) mostram que a adição de glutamina em nutrição enteral reduz a severidade da mucosite intestinal induzida pelo metotrexato, avaliado com medidas morfométricas no jejuno e cólon de ratos. Efeitos semelhantes foram observados com o uso de 5-

fluorouracil (JACOBS e cols., 1987). O'DWYER e cols. (1987) também demonstram que ratos, após o tratamento com 5-fluorouracil, e mantidos em dietas com glutamina, apresentam melhora na celularidade e aumento no conteúdo de ADN da mucosa, bem como aumento da altura das vilosidades intestinais. Em adição, observa-se diminuição na mortalidade dos animais mantidos em dieta suplementada com glutamina.

A glutamina é potencialmente útil no tratamento de diarréias. Em um raro estudo na área, NATH e cols. (1992) observaram que coelhos infectados com *Escherichia coli* enteropatogênica aumentam a absorção intestinal de sódio quando tratados com solução contendo glutamina. Esse e outros achados nos levam a postular que a glutamina possa ser útil na reidratação oral e na indução da cicatrização intestinal resultante de doenças diarréicas.

1.1.7 Toxicidade da Glutamina

Estudos realizados com nutrição parenteral contendo glutamina não demonstram nenhuma toxicidade da glutamina (LOWE e cols., 1989; ZIEGLER e cols., 1990). Existe um temor quando da infusão de glutamina, porque está relacionada com o metabolismo e formação de amônia. Entretanto, elevação de amônia no sangue não é detectada, até o momento,

com os estudos realizados. Em pacientes com insuficiência hepática pode ser contra-indicado o uso de glutamina.

O glutamato é resultante do metabolismo da glutamina e está diretamente relacionado com a síntese do neurotransmissor ácido γ -aminobutírico. No entanto, nenhuma toxicidade é detectada para o sistema nervoso central.

A glutamina em solução é hidrolizada num tempo relativamente curto, mas esse processo é reduzido quando se ajustam o pH da solução e a temperatura. A hidrólise também é reduzida quando a glutamina é misturada à solução, pouco antes da sua administração. Em todo caso, as soluções contendo dipetídeos derivados da glutamina parecem mais estáveis do que aquelas contendo glutamina (STEHLE e cols., 1989). Assim, nesse estudo, postulamos e desenvolvemos um derivado tripeptídeo da glutamina, o qual bloqueia seu processo de degradação, bem como provê o intestino com as quantidades adequadas desse aminoácido, sem alterar a osmolalidade fisiológica da solução e do conteúdo no lúmen intestinal.

1.2 Integridade e Permeabilidade do Epitélio Gastrintestinal

1.2.1 Conceito de Permeabilidade Intestinal

O intestino delgado é um segmento do trato gastrintestinal essencial para sustentação e manutenção da vida. Em circunstâncias normais, o estado nutricional é principalmente mantido através da absorção de nutrientes provenientes da dieta no intestino delgado. A alteração no balanço entre a fisiologia do intestino delgado e o estado nutricional é bem documentada em condições patológicas, tais como doença celíaca (BRUNSER e cols., 1966), doença de Crohn (FARMER e MICHENER, 1979), linfangiectasia intestinal (VARDY e cols., 1975) e as doenças diarréicas (SNYDER e MARSON, 1982; BERN e cols., 1992; SCHORLING e cols., 1990; SCHORLING e cols., 1990; LIMA e GUERRANT, 1992).

O epitélio intestinal apresenta duas propriedades: uma de barreira para proteção contra diversos agentes presentes no lúmen; e a propriedade funcional de transporte de moléculas importantes para a vida. A permeabilidade intestinal refere-se à barreira funcional e a permeação de marcadores é geralmente utilizada para medir essa permeabilidade (MENZIES, 1984; TRAVIS e MENZIES, 1992). Assim, define-se

permeabilidade como um fluxo de solutos através de uma unidade de área de membrana num certo tempo. A permeação, por sua vez, depende essencialmente do relacionamento estreito da substância em questão com os constituintes da membrana a ser cruzada. Por conseguinte, a permeação depende fundamentalmente do tamanho molecular da substância de que se trata, em relação aos poros hidrofílicos da membrana. A permeabilidade, em outras palavras, se refere à facilidade com que a superfície da mucosa intestinal pode ser penetrada por substâncias e marcadores por difusão sem intermediadores de constituintes específicos. A difusão não facilitada, utilizada nesse contexto, significa a passagem de moléculas dependente de um gradiente de concentração; por conseguinte, sem a assistência passiva ou ativa de um sistema bioquímico de transporte. Com efeito, a difusão obedece a lei de Graham, segundo a qual a difusão é inversamente proporcional à raiz quadrada do peso molecular da substância em questão (TRAVIS e MENZIES, 1992).

Em um contexto clínico-terapêutico, a permeabilidade intestinal normalmente é aplicada para permeação de moléculas com massa maior do que 150 Daltons, em vez de íons como sódio ou cloreto, para os quais a expressão permeabilidade de membrana é normalmente aplicada. Como citado, a permeabilidade intestinal pode ser afetada por doenças, drogas,

dieta, citocinas, hormônios ou o próprio ambiente, mas não parece ser influenciada pela idade, raça ou fatores hereditários (TRAVIS e MENZIES, 1992). As conseqüências nas alterações da permeabilidade intestinal resultantes de infecções como doenças diarréicas, alergias intestinais, e o potencial para o acesso não invasivo na avaliação e diagnóstico de doenças e potencial uso como parâmetro terapêutico, são algumas razões para o alto interesse na avaliação e uso dos testes de permeabilidade intestinal. Nesse trabalho, abordamos o transporte de aminoácidos e derivados di- e tripeptídeos, e permeabilidade do intestino delgado nas doenças diarréicas. Em adição, estudamos o impacto de aminoácidos e derivados na permeabilidade intestinal de pacientes com diarréia.

1.2.2 Perspectiva Histórica dos Marcadores para os Testes de Permeabilidade Intestinal

O conceito do uso de marcadores para avaliar a passagem de substâncias através da parede intestinal é bastante antigo; data de 1673, quando LISTER introduz no intestino de cachorro um corante azul com massa de 262 Daltons, numa tentativa de mostrar sua passagem através da parede intestinal (LISTER , 1673). É somente com os trabalhos de WAYMOUTH REID, em 1892, que ocorre o reconhecimento da

importância de se manter idênticos gradientes osmóticos e de pressões hidrostáticas para investigação *in vitro* das alterações de permeabilidade e transportes intestinais (REID, 1892). REID utiliza o fluxo retrógrado de cloreto de sódio para o banho no lado mucoso, o qual ocorre quando a mucosa é lesada ou apresenta alterações de permeabilidade (REID, 1902).

Em 1901, foi sugerido que o molibdato (P.M. = 180 Da) era absorvido por via intercelular (HOBER, 1901), e em 1912, OSTERHOUT demonstra que substâncias antagonistas alteram determinados processos, os quais controlam a permeabilidade intercelular em membranas biológicas (OSTERHOUT, 1912). Em outras palavras, a permeabilidade é uma propriedade dinâmica das membranas biológicas.

Os primeiros estudos com marcadores como ramnose, xilose e arabinose, são realizados por McCANCE & MADDERS, em 1930, e já em 1937, a taxa de absorção de uma variedade de substâncias em ratos é determinada, sendo que estas dependem do peso molecular e da lipossolubilidade (HOBER E HOBER, 1937). É observado que moléculas com massa acima de 180 Da apresentavam dificuldade para absorção, e o raio estimado para essas substâncias é de aproximadamente 0,4 nanômetros (nm) (SCHULTZ e SOLOMON, 1961). Por outro lado, o critério do peso molecular isoladamente não é um parâmetro seguro para avaliar difusão de

substâncias através de um gradiente de concentração em membranas biológicas (HOLLANDER e cols., 1988). Utilizando modelos matemáticos em computação, que levam em consideração vários parâmetros, como, composição molecular, massa, geometria da molécula, conformação óptica e raio de Van der Waals, os autores sugerem que as moléculas devem ter o tamanho bem menor do que anteriormente estimado (HOLLANDER e cols., 1988).

FORDTRAN e cols. (1965) são os pioneiros nos estudos de permeabilidade no trato gastrintestinal humano. Esses estudos utilizando um marcador não absorvível, como o polietileno glicol (PEG)-4000 e solutos de diferentes massas, são capazes de sugerir a presença de poros hidrofílicos na membrana apical do enterócito, os quais variam de 0,8 nm para o jejuno e 0,3 nm no íleo distal. Essa diferença da permeabilidade intestinal entre o jejuno e íleo é confirmada posteriormente com estudos de marcadores para fluxos unidirecionais (DAVIS e cols., 1982).

A década de 1960 é importante para definição, por fisiologistas e microscopistas eletrônicos, das propriedades da barreira epitelial funcional. Trabalhos de FARQUHAR e PALADE, em 1963, são decisivos para descoberta das zonas de adesões observadas nas conexões entre as células de vários epitélios. Essas zonas de adesões são hoje conhecidas como zônulas

de oclusões ou “tight junctions”. Estudos de USSING e WINDHAGER, utilizando microeletrodos na pele de sapos, observam a importância da via paracelular para a transferência de íons, postulando assim que esta via não está obstruída (USSING e WINDHAGER, 1964). Subseqüentemente, FROMTER e DIAMOND introduzem os termos em inglês “tight” e “leaky” para caracterizar diferenças na permeabilidade, indicados por alterações paracelulares na resistência elétrica de membranas biológicas (FROMTER e DIAMOND, 1972). Por conseguinte, o intestino delgado humano é considerado “leaky” por apresentar uma resistência total do tecido < 1000 ohm/cm². Por outro lado, o intestino grosso é caracterizado como “tight” ou moderadamente “tight” por apresentar resistência alta, dificultando a passagem de substâncias polares.

A base para o uso de testes não invasivos para determinar a permeabilidade intestinal vem de observações em pacientes com doença celíaca. Nesses pacientes, postula-se que havia alterações na permeabilidade intestinal, porque eles apresentam dissacaridúria (GRYBOSKI e cols., 1963; WESER e SLEISENGER, 1965). Ao mesmo tempo existe, na época, um grande interesse no estudo do modo como o intestino absorvia proteínas tóxicas e antigênicas (WALKER e ISSELBACHER, 1974). Assim, no início da década de 1970, são utilizados vários marcadores como dextran marcado

com fluoresceína isolada ou em combinação com lactulose (342 Da), rafinose (504 Da) e estachiose (666 Da) para testes não invasivos de permeabilidade intestinal (WHEELER e cols., 1978). No final da década de 1970, são introduzidos testes diferenciais utilizando a combinação de dissacarídeos / monossacarídeos, tais como celobiose/manitol (COBDEN e cols., 1978) e lactulose/L-ramnose (MENZIES e cols., 1979). Os testes de permeabilidade utilizando polietilenos glicóis (CHADWICK e cols., 1977) e ⁵¹Cr-EDTA (ácido etilenodiaminotetracético) (BJARNASON e cols., 1983) são introduzidos no final da década de 1970 e início de 1980. Diferente dos carboidratos utilizados como marcadores, esses últimos não são degradados pelas bactérias e são teoricamente bem indicados para o intestino, onde existe uma intensa proliferação bacteriana.

1.2.3 Epitélio Intestinal: Permeação Paracelular e Transcelular

Duas vias de permeação encontram-se disponíveis no epitélio intestinal normal: através da célula (transcelular) e entre as células (paracelular) (**Figura 5**). Utilizando marcadores moleculares de tamanhos diferentes e aplicando gradiente osmótico na mucosa ou serosa, é possível identificar poros eletroneutros largos (6,5 nm) e poros seletivos para cátions pequenos (0,7 nm), provavelmente localizados entre as células (**Figura 6**)

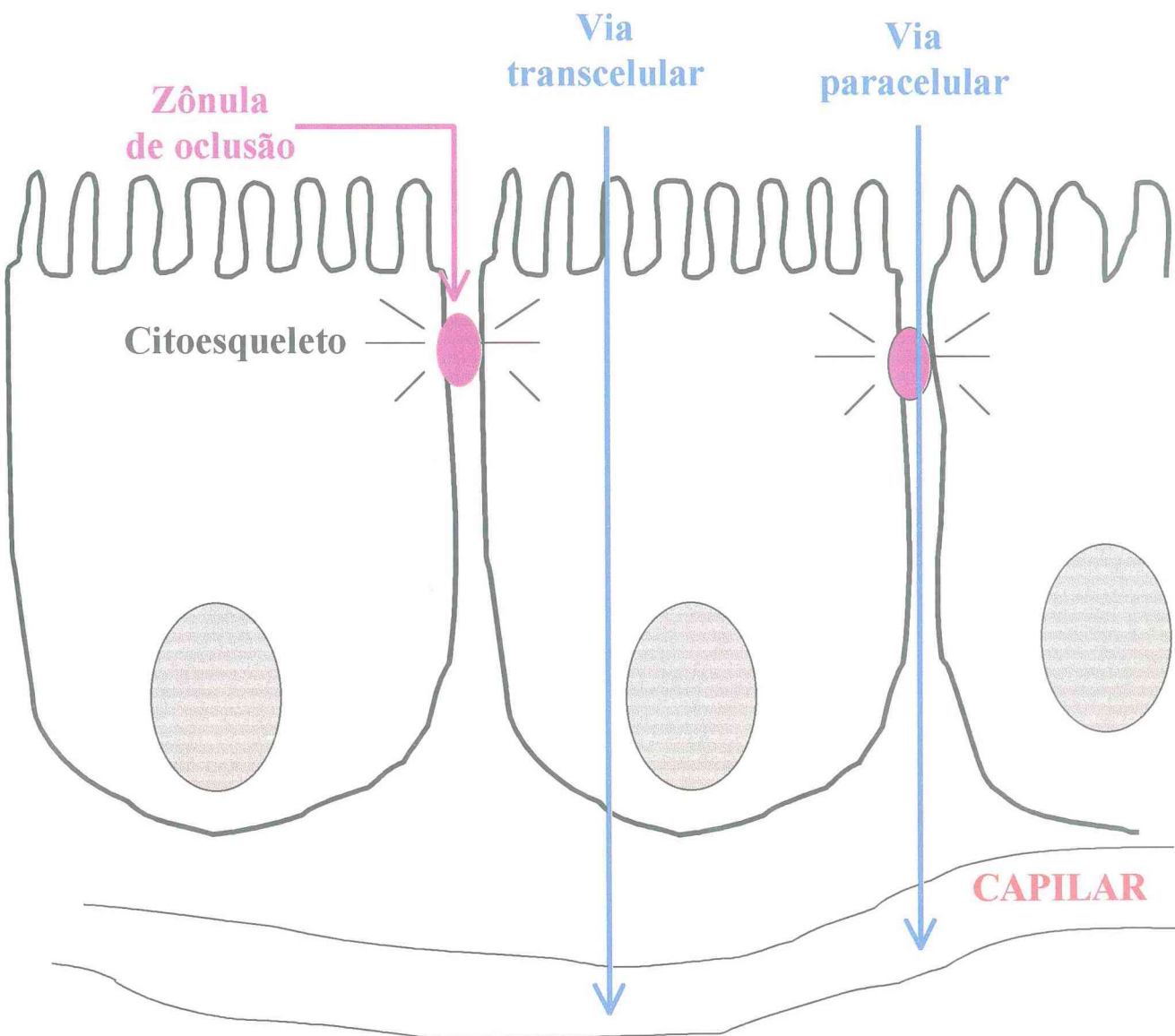


figura 6 – Epitélio intestinal mostrando a via paracelular e transcelular. Moléculas como lactulose, celobiose, rafinose e $^{51}\text{Cr-EDTA}$ passam através da via paracelular, e moléculas menores como manitol e rhamnose permeam a via transcelular.

(PAPPENHEIMER e cols., 1951). Os poros eletroneutros pequenos (0,4 nm) também são identificados, por exemplo, na membrana apical do íleo de coelhos (NAFTALIN e TRIPATHI, 1985).

A via paracelular constitui as zônulas de oclusões, o espaço intercelular, as zonas de extrusões resultantes da morte de células e áreas de ulcerações. Existem várias razões para se acreditar que essa via é normalmente utilizada por moléculas de massa superiores a 180 Da, tais como lactulose, celobiose, EDTA, rafinose ou dextran. Essas moléculas normalmente permanecem no espaço extra-celular quando administradas intravenosamente, sugerindo que as moléculas não atravessam as membranas celulares. As junções paracelulares ocupam menos de 5% da área total do epitélio intestinal, o que está de acordo com a localização de pequenas quantidades de poros considerados largos (MARCIAL e cols., 1984). Além do mais, poros seletivos para cátions estão localizados na junção intercelular, o que limita adicionalmente a permeação de moléculas maiores com cargas negativas, como oligossacarídeos e EDTA (NAFTALIN e TRIPATHI, 1985).

As zônulas de oclusões (ZO) são estruturas que circundam as células epiteliais na porção apical, conectando uma célula à outra, mantendo assim, a polaridade apical e basolateral da membrana celular (CEREIJIDO e

cols., 1988). As ZOs são formadas de fibras protéicas (cingulin e ZO-1) as quais estão conectadas com o citoesqueleto das células adjacentes (CITI e cols., 1988; STEVENSON e cols., 1986; MADARA, 1987). Essa estrutura, por sua vez, é regulada por mediadores intracelulares como AMPc (adenosina monofosfato cíclico) e Ca^{2+} (DUFFEY e cols., 1981; PALANT e cols., 1983), os quais aumentam a resistência, e proteína cinase C, ativada por vários ésteres de forbóis, a qual diminui a resistência nas ZOs (MULLIN e O'BRIEN, 1986).

Os espaços intercelulares são relativamente estreitos e tortuosos, os quais podem dificultar a passagem de solutos maiores. Por outro lado, é possível que moléculas maiores passem através da extrusão de células ou ulcerações do epitélio intestinal (CLARKSON, 1967; MOORE e cols., 1989).

A via transcelular envolve a passagem de solutos através da membrana celular. Monossacarídeos, como ramnose e moléculas pequenas de PEGs, são capazes de penetrar no eritrócito, e podem passar através da membrana do enterócito (TRAVIS e MENZIES, 1992). Estudos realizados por NAFTALIN e TRIPATHI (1985) sugerem a presença de poros pequenos eletroneutros (0,4 nm), na membrana do enterócito do íleo de coelho, os quais permitem a passagem de solutos como manitol, ramnose e PEGs de

baixo peso molecular. A natureza desses poros é ainda desconhecida, mas supõe-se que esses poros sejam formados por moléculas de proteínas inseridas na membrana, como os canais aquosos (VERKMAN, 1989). Além desses poros, existem pelo menos outros três mecanismos pelos quais moléculas podem passar através das membranas celulares. Primeiro, alguns solutos apresentam determinado grau de solubilidade lipídica, os quais podem passar por difusão na membrana. Moléculas de PEGs de baixo peso, como o PEG-400, apresentam essa característica, permitindo, assim, sua passagem utilizando esse mecanismo; segundo, a lesão mecânica ou abrasão da membrana celular pode permitir a passagem de substâncias através do epitélio (McNEIL e ITO, 1989); terceiro, através da transcitose, é possível a passagem de proteínas e antígenos, de uma maneira rápida e eficiente, através do epitélio intestinal (SCHAERER e cols., 1991).

1.2.4 Métodos Utilizados para Medida da Permeabilidade Intestinal

Os testes para medida de permeabilidade intestinal são classificados em três tipos: aqueles que utilizam (a) açúcares, (b) isótopos e (c) PEGs como marcadores. A seleção de um desses testes envolve o conhecimento das propriedades dos marcadores e avaliação de fatores outros,

diferentes da permeabilidade, os quais podem alterar ou induzir erros na medida do teste.

A molécula de prova ideal para o teste de permeabilidade intestinal deve ser biologicamente inerte, hidrossolúvel e atravessar o epitélio intestinal obedecendo à lei de difusão de Graham. Esses marcadores são normalmente excretados e medidos nas amostras de urinas, após ingestão por via oral. A excreção urinária do marcador deve ser através da filtração glomerular e esta não deve ser secretada ou reabsorvida nos túbulos renais. É importante nesses casos determinar a quantidade de recuperação do marcador, após administração intravenosa. É imprescindível também que os testes com os marcadores escolhidos apresentem alta sensibilidade, precisão e acurácia, bem como sejam facilmente exequíveis nos fluidos biológicos, como a urina.

A Tabela 2 resume as taxas de permeabilidade intestinal, bem como o percentual de recuperação após injeção intravenosa de vários marcadores moleculares utilizados.

Tabela 2. Taxas de permeabilidade intestinal e recuperação de vários marcadores moleculares em indivíduos normais

Marcador	Peso Mol. (Da)	Permeação	Permeação	Recuperação*
		(% excreção urinária/5h) Iso-osmolar [¶]	(% excreção urinária/5h) Hiperosmolar [¶]	(% excreção após dose i.v.)
L-Arabinose [†]	150	17,5	-	73
L-Ramnose	164	10,1	11,7	72
D-Manitol	182	16,8	20,6	79
Lactulose	342	0,25	0,41	97
Celobiose	342	-	0,38	92
⁵¹ Cr-EDTA	359 [‡]	0,64	0,70	96
Rafinose	504	0,26	-	97
PEG-400	194-502	18,2	20,3	41
^{99m} Tc-DTPA	549	2,8	-	-
Dextran	3000	0,04	0,12	96

Modificado de TRAVIS e MENZIES (1992).

[¶] Iso-osmolar = 200-300 mosmol/kg e hiperosmolar = 1350-1500 mosmol/kg.

* Média de urina coletada por 12 h.

[†] Parte através de transporte mediado por carreador.

[‡] Peso molecular do ligante.

(a) Testes diferenciais utilizando açúcares

A variação individual na permeação dos marcadores depende de fatores, tais como o esvaziamento gástrico, trânsito intestinal e diluição no lúmen intestinal. Esses fatores podem ser minimizados com a utilização dos testes diferenciais de permeabilidade. A combinação de um marcador maior, como lactulose, celobiose ou EDTA, com um menor, tal como L-ramnose ou manitol, permite o cálculo da razão marcador maior / marcador menor, o qual reduz a variação individual e aumenta a acurácia na avaliação da permeabilidade intestinal (MENZIES, 1974). Por motivos descritos anteriormente, acredita-se que L-ramnose ou manitol atravessa o epitélio intestinal através das vias transcelular e paracelular, permitindo, assim, no teste diferencial, um denominador comum para ajuste da área individual de absorção. Por outro lado, a lactulose, celobiose ou EDTA atravessa quase que exclusivamente pela via paracelular, medindo assim o grau de lesão e/ou alterações nas zônulas ocludentes do epitélio intestinal.

Os testes diferenciais com duplo açúcar (dissacarídeo / monossacarídeo) apresentam apenas pequenas diferenças quando comparados entre si, e algumas vezes são associados com outros açúcares para determinar malabsorção de carboidratos ou deficiência na atividade de dissacaridasas (MAXTON e cols., 1990; NOONE e cols., 1986).

As combinações de celobiose/manitol (COBDEN e cols., 1985; JUBY e cols., 1989; COBDEN e cols., 1980) e lactulose/manitol (UKABAM e COOPER, 1984; JUBY e cols., 1989; ANDRE e cols., 1988) são consideradas os melhores testes com duplos açúcares hoje utilizados para medida da permeabilidade intestinal. Alguma possibilidade de erro na avaliação pode ocorrer e está normalmente relacionada com o metabolismo e análise dos açúcares. Apesar da lactulose não ser metabolizada por nenhuma dissacaridase humana, a celobiose é hidrolisada pela lactase intestinal (DALQVIST, 1964). Entretanto, a afinidade da lactase para com a celobiose é suficientemente baixa para não interferir na medida de permeabilidade. Em animais experimentais, como ratos e cachorros, o manitol pode ser degradado em cerca de 15% do total ingerido, provavelmente via ação da enzima sorbitol desidrogenase (PAPPENHEIMER, 1990). Por outro lado, o percentual de recuperação do manitol nos pacientes é de aproximadamente 70% (COBDEN e cols., 1985).

Outras combinações de açúcares são também utilizadas, tais como lactulose/L-ramnose e celobiose/L-ramnose. A lactulose normalmente é recuperada quase que totalmente na urina, ao passo que a L-ramnose é recuperada cerca de 75% na urina após injeção intravenosa (MAXTON e cols., 1986; ELIA e cols., 1987).

A atividade de dissacaridase ou transporte mediado por sistemas de transportadores intestinais pode ser associada com os testes diferenciais de permeabilidade, que utilizam o princípio comum dos marcadores já descritos. Por exemplo, a combinação do teste de lactulose/L-rhamnose com lactose, sucrose e palatinose em uma solução iso-osmolar permite a avaliação simultânea da atividade de lactase, sucrase e isomaltase, bem como de permeabilidade (MAXTON e cols., 1990). Nesse teste, é possível fazer distinção entre deficiência primária e secundária de dissacaridasas (MENZIES, 1974; NOONE e cols, 1986; MAXTON e cols., 1990). A D-xilose e 3-O-metil-D-glicose atravessam o epitélio intestinal por difusão e mediado por transportador protéico, respectivamente. Nesse caso, a combinação simultânea de lactulose e L-ramnose com D-xilose e 3-O-metil-D-glicose pode ser utilizada para avaliar permeabilidade e transportes intestinais por difusão e mediado por transportadores (COOK e MENZIES, 1986). Esse teste é bem melhor e específico do que o teste utilizando a D-xilose isoladamente para avaliar a função intestinal em condições patológicas, tais como doença celíaca e doenças diarréicas (TRAVIS e cols., 1989).

(b) Testes utilizando isotópos

Marcadores com isotópos são mais fáceis de medir, em comparação com outros marcadores, porém apresentam as desvantagens de serem marcadores únicos e utilizarem radioatividade.

O $^{51}\text{Cr-EDTA}$ tem sido utilizado para medida do ritmo de filtração glomerular renal e é utilizado também para medida de permeabilidade intestinal (BJARMASON e cols., 1983; MAXTON e cols., 1986; JENKINS e cols., 1988). Diferente dos marcadores com açúcares, o $^{51}\text{Cr-EDTA}$ não é degradado pelas bactérias e pode, assim, servir para medir permeabilidade no cólon. A combinação de $^{51}\text{Cr-EDTA}$ com lactulose é utilizada com esse propósito, isto é, a lactulose provê a correção da permeabilidade no intestino delgado (JENKINS e cols., 1991). As principais desvantagens do uso do $^{51}\text{Cr-EDTA}$ como marcador reside na significativa variação dos valores de excreção urinária após administração e na meia-vida relativamente curta, 27 dias, para testes em localizações distantes do local de medida (AINSWORTH e cols., 1989; PELED e cols., 1985; AABAKKEN, 1989). Esse teste é menos sensível e acurado do que os testes com duplo açúcar para avaliação, por exemplo, da permeabilidade na doença celíaca (MARTINES e cols., 1988). O $^{99\text{m}}\text{Tc-acetato}$ de dietilenotriaminopenta ($^{99\text{m}}\text{Tc-DTPA}$; P.M. = 549 Da) tem sido indicado para medida de

permeabilidade colônica. Entretanto, não tem mostrado melhor sensibilidade e acurácia do que o $^{51}\text{Cr-EDTA}$ para essa medida (CASELLAS e cols., 1986).

(c) Testes utilizando polímeros de polietileno glicóis (PEGs)

Os polímeros de PEGs são comercializados com diferentes tamanhos como PEG-400, PEG-600, PEG-900, PEG-1000 e PEG-4000. O PEG-400, por exemplo, é composto de tamanhos diferentes de moléculas, variando de 194 a 502 Da (MAXTON e cols., 1986), os quais podem ser separados e medidos por cromatografia líquida-gasosa ou cromatografia líquida de alta pressão (DELAHUNTY e HOLLANDER, 1986).

O uso desses marcadores, especialmente os de baixo peso molecular como o PEG-400, são hoje recomendados com reservas para medida de permeabilidade intestinal. A variação no tamanho molecular desses compostos torna sua excreção, quando administrado por via oral, bastante variável para medida de permeabilidade (MA e cols., 1990; PHILIPSEN e cols., 1988). Essa variação também é observada quando esses marcadores são injetados por via intravenosa (MAXTON e cols., 1986). As opiniões divergem quando os marcadores são empregados para medida de

permeabilidade em doenças do intestino delgado (CHADWICK e cols., 1977; JENKINS e cols., 1986; HOLLANDER e cols., 1986). Acerca da via de permeação desses compostos, há, também controvérsias, dificultando a interpretação de possíveis mecanismos envolvidos nas alterações da permeabilidade intestinal (MA e cols., 1990).

1.2.5 Fatores que Alteram a Integridade e Permeabilidade do Epitélio Gastrintestinal

As alterações de permeabilidade ocorrem em várias situações, porém os mecanismos são ainda pouco conhecidos e alguns deles serão descritos no item seguinte. A permeação das vias transcelular e paracelular, medida através dos marcadores aqui descritos, é alterada por fatores físicos, *stress* cirúrgico, drogas, doenças e mediadores intracelulares, como citocinas e outros.

O *stress* hiperosmolar com soluções acima de 1500 mosmol/kg, é suficiente para aumentar a permeabilidade, no intestino normal, a marcadores polares com raios superiores a 0,5 nm (MENZIES, 1972; LAKER e MENZIES, 1977; WHEELER e cols., 1978; MAXTON e cols., 1986). É estabelecido que soluções com osmolalidades menores são capazes de aumentar a permeabilidade intestinal em situações de *stress* cirúrgico e

doenças. Solutos pouco absorvíveis, como lactulose, manitol, raffinose, sulfato de magnésio, causam diluição porque retêm líquidos no lúmen intestinal, resultando no aumento do peristaltismo intestinal, e alterações na medida de permeabilidade (MENZIES e cols., 1990; FORDTRAN, 1975).

Drogas como antiinflamatórios não esteroidais (DAINEs) e quimioterápicos são conhecidas por alterarem a permeabilidade intestinal. As DAINEs causam aumento na permeabilidade (NELL e cols., 1977; BJARNASON e cols., 1986)., o que nos faz defender a idéia de que esteja relacionado com a potência e seletividade de ação das mesmas na inibição da ciclooxigenase induzida e/ou constitutiva. Quimioterápicos como 5-fluorouracil (SIBER e cols., 1980) ou metotrexato (LIFSCHITZ e MAHONEY, 1989), e radioterapia (COLTAR e cols., 1988) são capazes de alterar a integridade e permeabilidade intestinal. A terapia com glutamina, por exemplo, tem mostrado um efeito protetor e de recuperação rápida dessas alterações (SOUBA e cols., 1990; KLIMBERG e cols., 1990a, KLIMBERG e cols., 1990b; FOX e cols., 1988; JACOBS e cols., 1987; O'DWYER e cols., 1987). Esses achados nos fazem postular a hipótese de que a glutamina também possa proteger e causar uma recuperação rápida da mucosa intestinal alterada por doenças diarréicas, tão comuns no nosso meio.

1.3 Mecanismos de Doenças que Alteram a Permeabilidade

Intestinal

Várias doenças que acometem o homem, como doenças diarréicas, celíaca, de Crohn e colite ulcerativa, estão freqüentemente associadas com alterações na integridade e permeabilidade intestinal.

Recentemente, temos dado ênfase no estudo dos efeitos de doenças diarréicas na infância e diarréia associada com a síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS), na função e alterações da integridade e permeabilidade intestinal (LIMA e cols., 1997). Crianças com diarréia aguda (≤ 14 dias de duração) apresentam diminuição na área de absorção e aumento na permeabilidade intestinal quando medidas pelo teste diferencial de permeabilidade combinando lactulose/manitol. Esses parâmetros se tornam mais severos quando são analisados naquelas crianças com diarréia persistente (> 14 dias de duração) e/ou associadas com etiologia por *Cryptosporidium* spp., um protozoário freqüentemente associado com a etiologia dessa doença. Em pacientes adultos com diarréia associada à AIDS, temos documentado que a infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) está associado com alterações na função e lesão da mucosa, mesmo naqueles pacientes sem o sintoma de diarréia. Por outro lado,

naqueles com diarreia, e especialmente com *Cryptosporidium* spp. ou *Microsporidium* spp, as alterações de permeabilidade e lesão são ainda mais severas, com potencial conseqüência para o estado nutricional desses pacientes (LIMA e cols., 1997). Entretanto, os mecanismos envolvidos nessas alterações são complexos e ainda pouco conhecidos.

Na doença celíaca, existe um aumento da permeabilidade intestinal bem documentada (MENZIES, 1972; WHEELER e cols., 1978; COBDEN e cols., 1978), a qual é associada com alteração da via paracelular. A diminuição na resistência transepitelial e alterações morfológicas das zônulas de oclusões, observadas em biopsias jejunais de pacientes com doença celíaca, confirmam os achados anteriores (SCHULZKE e SCHULZKE, 1991). Os testes diferenciais com duplo açúcar são também utilizados para detecção de pacientes suspeitos de ter doença celíaca (COBDEN e cols., 1980). Entretanto, o diagnóstico definitivo só é feito com a biopsia jejunal acompanhado de exame histopatológico e/ou dieta isenta de glúten para o diagnóstico e terapia da doença.

Nas doenças de Crohn e colite ulcerativa, são bem documentados as alterações na permeabilidade intestinal (BJARMASON e cols., 1983; PEARSON e cols., 1982; UKABAM e cols., 1983; JENKINS e cols., 1988). Em ambos os casos, existe aumento da permeabilidade medida com

marcadores de carboidratos ou $^{51}\text{Cr-EDTA}$. Assim como na doença celíaca, os testes diferenciais com duplo açúcar são recomendados para detecção dos suspeitos dessas doenças (WYATT e cols., 1993). O diagnóstico definitivo fica na dependência da biopse intestinal e exame histopatológico.

Outras doenças relacionadas com o trato gastrintestinal, tais como hipercolonização bacteriana (PIGNATA e cols., 1990), infecção pelo *Clostridium difficile* (RYBOLT e cols., 1989), gastroenterite viral (NOONE e cols., 1986), enteropatia tropical (COOK e MENZIES, 1986), inanição (MAXTON e cols., 1989), diarréia dos diabéticos (COOPER e cols., 1987), e alergias associadas com proteínas do leite e alimentos (SCHRANDER e cols., 1990; JACKSON e cols., 1981), têm sido também associadas com aumento na permeabilidade.

As zônulas de oclusões possuem um papel central na regulação da permeabilidade paracelular (MADARA, 1992). As doenças intestinais podem alterar a permeabilidade intestinal através de mecanismos via zônulas de oclusões, provavelmente com a mediação de células inflamatórias e mediadores químicos, bem como alterando a composição da membrana citoplasmática e da área intestinal total para absorção. Em adição, drogas podem introduzir mecanismos diferentes, como o bloqueio na divisão celular (quimioterápicos) ou de enzimas como ciclooxigenase (DAINES), os quais

participam direta ou indiretamente na regulação da permeabilidade. Por outro lado, suscitamos a hipótese de que outras drogas, como glutamina e fatores de crescimento, possam induzir ou promover um adequado suprimento de energia e/ou precursores para a manutenção e recuperação rápida da integridade e permeabilidade do epitélio intestinal lesado, decorrente de vários processos patológicos, conforme aqui descrito.

A participação de células inflamatórias e mediadores na regulação da permeabilidade ainda é pouco conhecida. Em um estudo utilizando células epiteliais em cultura, como células T-84 de carcinoma do cólon humano, foi possível documentar o aumento de permeabilidade resultante da migração transepitelial de neutrófilos induzido pelo peptídeo bacteriano, denominado N-formil-L-metionil-L-leucil-L-fenilalanina (fMLP) (MILKS e cols., 1986). Essa observação nos leva a postular que nas doenças inflamatórias intestinais esse mecanismo também ocorra, resultando na alteração de permeabilidade. Utilizando o mesmo modelo *in vitro*, outros pesquisadores demonstram que o interferon- γ , mas não o TNF, IL-1 ou IL-2, causa diminuição na resistência transepitelial, resultando no aumento da permeabilidade em monocamadas de células T-84 (MADARA e STAFFORD, 1989). É possível que outros mediadores participem também dessa regulação da permeação transepitelial e estejam relacionados com os

mecanismos envolvidos nas doenças inflamatórias e não inflamatórias intestinais.

Em várias doenças, como a celíaca, colite ulcerativa, doença de Crohn e outras, foi observada diminuição na área de absorção e isso está, sem dúvida, relacionado com a redução da permeação de marcadores como manitol e ramnose (MENZIES e cols., 1979; COBDEN e cols., 1978). Na colite ulcerativa e doença de Crohn, foram detectadas alterações na composição lipídica da membrana citoplasmática dos enterócitos, as quais parecem estar associadas com alterações na permeação de água, íons e solutos de baixo peso molecular (BRASITUS e cols., 1986; SANDLE e cols., 1990; MEDDINGS, 1989; PACHECO e cols., 1987).

JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

2 - JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

2.1 Justificativa

O intestino delgado é o segmento essencial do trato gastrintestinal para manutenção da vida. Em condições normais, o estado nutricional é mantido, principalmente através da absorção no intestino delgado, de nutrientes provenientes da dieta. A importância da associação entre o intestino delgado e o estado nutricional é bem documentada em condições patológicas, tais como doenças diarréicas, doença celíaca, doença de Crohn e enteropatia tropical. Estimativas globais demonstram que a incidência da diarreia, em média, atinge 2,5 episódios por criança-ano de observação e que a mortalidade relacionada com essa doença é de 3,3 milhões de crianças/ano, em pacientes abaixo de cinco anos de vida (BERN e cols., 1992). As principais complicações resultantes de doenças diarréicas são desidratação por perda de eletrólitos e água, e desnutrição, as quais são responsáveis pelas causas diretas de morte imediata ou a médio e longo prazos relacionadas com essas doenças. A desnutrição frequentemente está associada com a perda da integridade e alterações da permeabilidade do epitélio intestinal, o que perpetua o círculo vicioso da diarreia e desnutrição, comumente observado em crianças no nosso meio.

A glutamina é absorvida no intestino delgado, normalmente acoplada com íons sódio e é considerada o principal substrato energético e metabólico para o epitélio intestinal. Um derivado da glutamina, alanil-glutamil-glutamina, é desenvolvido e sintetizado nesse trabalho, o qual se mantém estável em condições ácidas (pH=1), como aquelas observadas no estômago, e pode prover ao intestino maior quantidade de glutamina, sem alterar a osmolalidade fisiológica da solução e do lúmen intestinal.

Nosso objetivo geral nesse trabalho é determinar o impacto da glutamina e derivados na restauração da perda de eletrólitos, água e recuperação da integridade e permeabilidade da mucosa intestinal alterada, como resultante de doenças diarréicas.

Nesse estudo, pretendemos que soluções orais contendo glutamina e derivados possam promover uma efetiva restauração da perda de eletrólitos e água, bem como recuperar a integridade e permeabilidade alteradas do epitélio intestinal, em decorrência de doenças diarréicas.

2.2 Objetivos

Nossos objetivos específicos são:

2.2.1 Desenvolver e sintetizar um derivado estável da glutamina, denominado alanil-glutamil-glutamina

2.2.2 Caracterizar o papel da glutamina e derivados no transporte intestinal de eletrólitos e água

(a) Determinar a sensibilidade e eficácia do transporte intestinal *in vitro* de glutamina, alanina e glicose.

(b) Estudar a eficácia da glutamina e derivados no transporte intestinal *in vivo* e no modelo de diarreia secretória induzida pela toxina da cólera.

2.2.3 Determinar a sensibilidade e eficácia do método de permeabilidade intestinal com lactulose e manitol, bem como validá-lo nos pacientes com diarreia

(a) Desenvolver e determinar a sensibilidade e acurácia do método de cromatografia líquida de alta resolução para medidas de monossacarídeos e dissacarídeos.

- (b) Validar o teste diferencial com duplo açúcar, lactulose/manitol, em controles e pacientes com diarreia.

2.2.4 Avaliar o impacto de glutamina na integridade e permeabilidade do epitélio intestinal

- (a) Avaliar o efeito de glutamina na integridade e permeabilidade do epitélio intestinal em crianças com diarreia aguda.
- (b) Determinar o impacto de glutamina na integridade e permeabilidade do epitélio intestinal em crianças identificadas como de alto risco para doenças diarreicas e/ou desnutrição.

MATERIAIS E MÉTODOS

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Origem e Síntese de Alanil-Glutamil-Glutamina

Em estudos preliminares (LIMA e cols., 1992), temos demonstrado que a glutamina foi eficaz na indução de absorção de sódio e que pode ser utilizada para recuperação das perdas de eletrólitos e água, bem como da integridade e permeabilidade intestinal, como resultado de doenças diarréicas. Por outro lado, temos observado a instabilidade da glutamina, principalmente em pH ácido, semelhante àquela observada no estômago, o que limita muito o uso por via oral dessa substância para o tratamento de doenças diarréicas. O acoplamento de uma ou mais moléculas de aminoácidos na glutamina, normalmente, resulta na estabilidade desse substrato. A idéia da presente invenção, já patenteada (U.S. Patent # 5.561.111), surgiu com a perspectiva da combinação de 2-5 aminoácidos que tivessem importância para o tratamento de doenças diarréicas. Assim, desenvolvemos o composto alanil-glutamil-glutamina (**Figura 7**), o qual contém alanina e duas moléculas de glutamina capazes de prover o intestino com maior número de aminoácidos, sem alterar a osmolalidade da solução. Esse composto é capaz, também, de estimular a absorção de eletrólitos e água e potencialmente suprir o epitélio com a sua principal fonte

Alanil-Glutamil-Glutamina

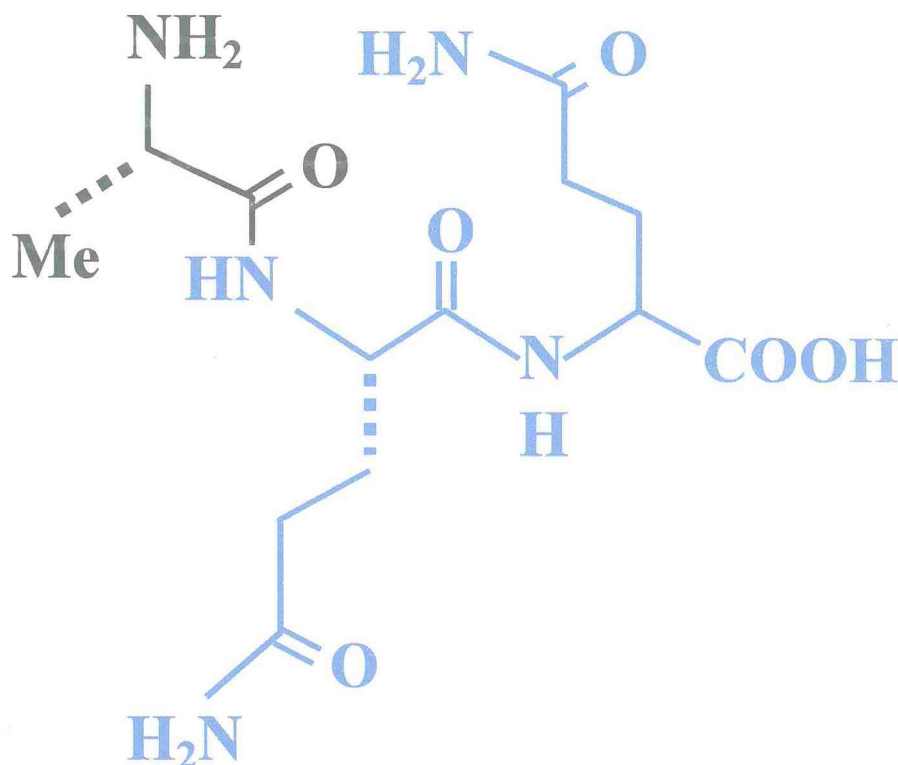


Figura 7 - Estrutura química do composto alanil-glutamil-glutamina. Esse composto estimula a absorção de eletrólitos e água e provê o epitélio intestinal da sua principal fonte energética e precursores metabólicos importantes para proliferação e maturação da mucosa intestinal.

energética e de precursores metabólicos essenciais para proliferação e maturação da mucosa intestinal. Os componentes utilizados nessa invenção são conhecidos e podem ser interligados utilizando a reação convencional de acoplamento de peptídeos, tal como a reação de fase sólida para síntese de peptídeo, conforme descreveu HUDSON (1988). Esse método foi utilizado com sucesso para síntese de alanil-glutamil-glutamina (**Figura 7**) e teve a colaboração efetiva dos pesquisadores Richard L. Guerrant e Timothy L. MacDonald, dos Departments of Internal Medicine and Chemistry da University of Virginia, Charlottesville, VA. Os produtos de degradações dos compostos glutamina, alanil-glutamina e alanil-glutamil-glutamina, em meio ácido, foram medidos via ressonância magnética, e teve a colaboração, também, dos pesquisadores há pouco citados.

3.2 Câmaras de Üssing

3.2.1 Animal Experimental e Procedimento Cirúrgico

Os animais experimentais utilizados foram coelhos albinos, califórnia, de ambos os sexos, pesando entre 1,5 a 2,0 quilos, postos a jejuar durante 24 horas, com água, e sacrificados por traumatismo craniano imediatamente antes do procedimento cirúrgico.

A cavidade abdominal foi aberta através de uma incisão mediana de 4-8 cm e o segmento do íleo identificado pela junção da válvula íleo-cecal. Um segmento de 20-30 cm de íleo distal foi seccionado e imerso em solução de Ringer (pH = 7,4) a 4 °C. Em seguida, a camada serosa foi retirada e o segmento aberto na linha de penetração dos vasos mesentéricos. O segmento total foi subdividido em segmentos de 2-3 cm e eliminados os que apresentassem placas de Peyers. Esses procedimentos foram realizados sobre uma placa de Petri contendo solução de Ringer a 4 °C, conforme a metodologia citada por SCHULTZ e ZALUSKY (1964).

Cada segmento de 2-3 cm (membranas) foi colocado entre duas hemi-câmaras de acrílico, com área circular interna de um centímetro quadrado. As câmaras foram então fixadas e montadas nos tubos de circulação/aeração nos seus respectivos suportes. Em seguida, foram preenchidas simultaneamente com solução de Ringer com manitol (100 mg/dl) no lado mucoso e solução de Ringer com glicose (100 mg/dl) no lado seroso (FIELD, 1971). Para o estudo do efeito dos substratos no intestino pré-tratado com toxina da cólera (P.M., 84 kDa; ICN Biomedicals Inc., Aurora, Ohio), o modelo de alça intestinal ligada foi utilizado, conforme descrito adiante, e a toxina (1 µg/ml) foi incubada no lúmen intestinal, por 4 horas, até a montagem das membranas nas câmaras.

3.2.2 Soluções Perfusoras

A solução de Ringer utilizada nos experimentos apresentava a seguinte composição química: Na^+ , 145; K^+ , 4,6; Ca^{2+} , 3,4; Mg^{2+} , 0,8; Cl^- , 119; HCO_3^- , 25; SO_4^- , 0,8 mEq/L, e todos os sais foram fornecidos pela Sigma Chemical Company, St. Louis, MO. Os sais foram pesados em balança analítica METTLER AE50 (Mettler Instrument Corporation, Hightstown, NJ) e a osmolalidade das soluções foi medida em osmômetro WIDE-RANGE OSMOMETER (Advanced Instruments Inc., Newton Highlands, Mass.).

A solução foi saturada durante 15 minutos com uma mistura gasosa de carbogênio (95% de oxigênio/ 5% de gás carbono), fornecida pela White Martins Gases Ind. do Nordeste S.A., Fortaleza, CE, e o pH ajustado para 7,4, usando um pHmetro BECKMAN 32 pH (Meter, Beckman Instruments, Inc., Fullerton, CA) enquanto a solução de ácido clorídrico 1 N foi auxiliada por um agitador magnético NUOVA II THERMOLYNE (Barnstead/Thermolyne corporation, Dubuque, Iowa). A adição de glicose (100 mg/dl) ou manitol (100 mg/dl) na solução de Ringer foi realizada posteriormente. Glicose e manitol foram adquiridos na Sigma Chemical Company, St. Louis, MO.

A solução de Ringer colina foi feita substituindo-se o cloreto de sódio pelo cloreto de colina – HO-(CH₂)₂-N(CH₃)₃-Cl (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO), obtendo-se a seguinte composição: colina, 120; Na⁺, 25; K⁺, 4,6; Ca²⁺, 3,4; Mg²⁺, 0,8; Cl⁻, 119; HCO₃⁻, 25; SO₄⁻, 0,8 mEq/L; foi saturada com mistura de carbogênio e ajustado o pH conforme descrito para solução de Ringer há pouco mencionada.

3.2.3 Aquecimento e Aeração

A aeração e circulação dos perfusatos (10 ml) em cada hemi-câmara foram realizadas com o borbulhamento da mistura de carbogênio em cada um dos tubos de circulação/aeração (**Figura 8, Painel A**). A temperatura do perfusato foi mantida em 37,8 °C, através da circulação de água a essa temperatura, nas paredes dos tubos que eram conectados a uma bomba de circulação termo-estável HAAKE FE2 (Berlin , Germany).

3.2.4 Sistema Elétrico

Para conectar as câmaras com o sistema elétrico, foram construídas pontes de Ringer ágar (48 g/L; Sigma Chemical Company, St. Louis, MO) utilizando cânulas de polietileno (PE205 I.D., 1,57 mm e PE280 I.D., 2,15

mm – Intrademdic, Clay Adams Co., Parsippany, NJ). A solução de Ringer ágar foi aquecida em banho-maria e agitada em intervalos de 5 minutos,

Câmaras de Üssing

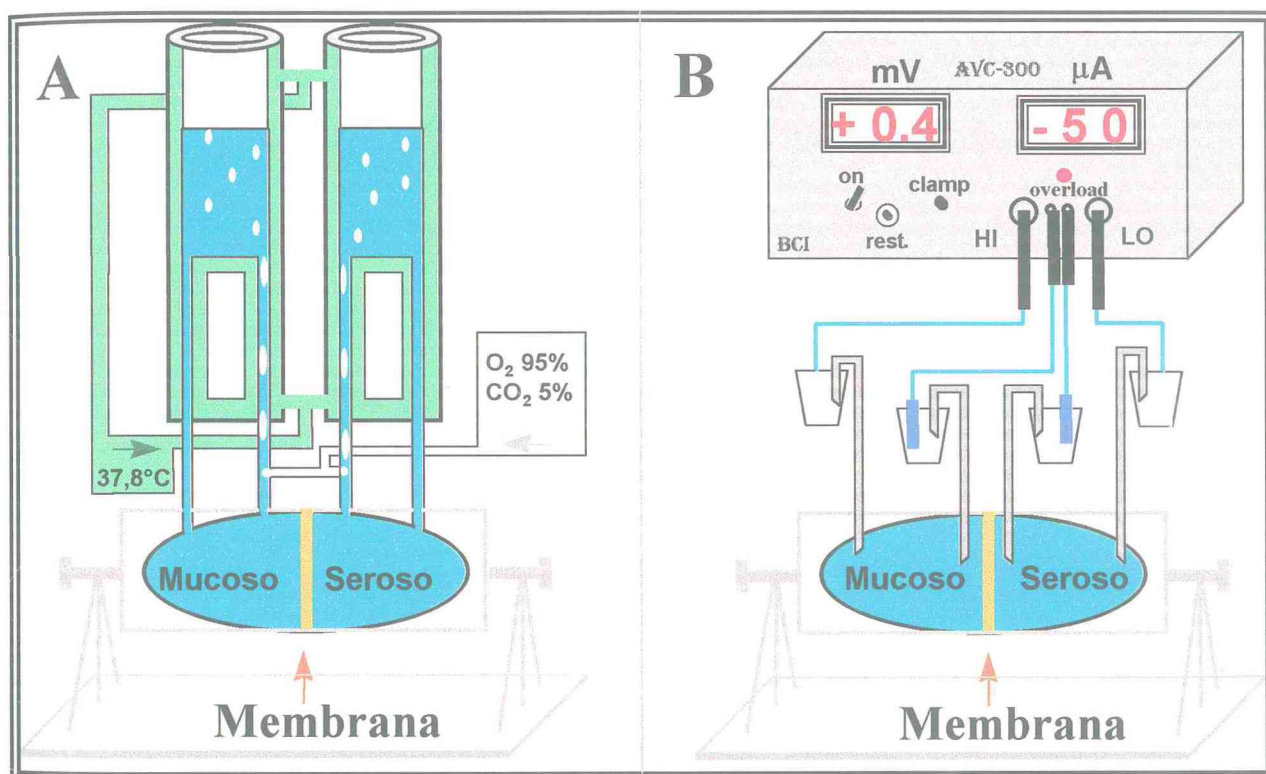


Figura 8 – Esquema ilustrativo das câmaras de Üssing. O Painel A mostra o sistema de aquecimento e aeração, e o Painel B mostra o sistema elétrico das câmaras de Üssing.

durante aproximadamente 30 minutos, antes do preenchimento das cânulas (LIMA e cols., 1992).

As cânulas de menor diâmetro interno (13 cm x 1,57 mm de diâmetro) foram preenchidas com Ringer ágar e conectadas em cada um dos orifícios centrais das hemi-câmaras, e outro extremo foi imerso na solução saturada de KCl, juntamente com o eletrodo de calomel (Beckman Instruments, Inc., Irvine, CA), conforme ilustrado na **Figura 8 (Painel B)**. As duas outras cânulas (13 cm x 2,15 mm) foram conectadas nos orifícios distais das hemi-câmaras, e o outro extremo imerso na solução saturada de KCl com os eletrodos de prata (Beckman Instruments, Inc., Irvine, CA). Os eletrodos de calomel e prata foram em seguida conectados com um clampeador de voltagem automática (BIC model, AVC-300, Buck & Co. Inc. Franklin, Mass).

Uma vez montadas as câmaras, ainda sem as membranas, com aquecimento, aeração e circulação do perfusado, os clampeadores foram ligados e o amperímetro zerado para determinar o potencial denominado espontâneo, gerado pelo sistema. Se o potencial (PD) espontâneo ultrapassasse os limites de +1,0 a -1,0 mV, todo o sistema era desmontado e refeito. A resistência elétrica do sistema foi calculada impondo-se 100 μ A no amperímetro (Δi) e registrando de novo o valor apresentado pelo

voltímetro (ΔPD); com essas duas diferenças, calculamos a resistência elétrica do sistema, usando a lei de Ohm ($R = \Delta PD / \Delta i$). O valor da resistência assim calculada foi imposta ao omímetro do clampeador de voltagem, permitindo que, posteriormente, se medisse somente a resistência elétrica oferecida pela membrana (FIELD, 1971; SCHULTZ e ZALUSKY, 1964; USSING e ZERAHN, 1951).

3.2.5 Protocolo Experimental

O protocolo experimental foi dividido em três períodos. O período inicial de estabilidade foi considerado os primeiros 30 minutos após a montagem do sistema. Se a medida da corrente de curto-circuito (CCC) ultrapassava mais de 30% das médias das outras câmaras, a câmara em questão era rapidamente desmontada e a membrana substituída.

O período de estudo envolveu a adição cumulativa (curva dose-resposta cumulativa) de substratos ou drogas às soluções perfusoras, feitas de 20 em 20 minutos durante 100 minutos, com volumes constantes de 100 μl e iso-osmolar. Antes de cada adição, foi retirado igual volume (100 μl) de perfusato, a fim de manter o volume total constante em cada hemi-câmara. Os substratos utilizados nesse período do protocolo experimental foram: L-glutamina, L-alanina, D-(+)-glicose, e alanil-glutamina, as quais foram

aquiridas da Sigma Chemical Co., St. Louis, MO. Os compostos glicosil-glutamina, glicosil-alanina, acilalanil-glutamina, e alanil-glutamil-glutamina foram desenvolvidos e sintetizados utilizando o direito de patente do autor desse trabalho, em colaboração com pesquisadores na University of Virginia, conforme já descrito.

O período final foi denominado de teste funcional da câmara. Para esse teste, adicionamos 200 μl de uma solução de 10^{-3} M de teofilina (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) na solução de Ringer glicose do lado seroso (concentração final na câmara de 2×10^{-5} M). A teofilina causa um grande aumento na CCC e esse teste biológico tinha o propósito de avaliar a estabilidade elétrica da membrana. Caso o clampeador de voltagem apresentasse sobrecarga de corrente, os dados obtidos nessa eventual câmara eram eliminados da análise.

3.2.6 Análise dos Dados

Os cálculos das alterações na CCC, PD e R foram realizados utilizando planilha Excel 4.0 (Microsoft Corporation, Cupertine, CA) no sistema de computação MacIntosh (Apple Computer Inc., CA USA). A análise de variância (ANOVA; testes de Fischer; Duncan e Schèffè) e o teste *t* de Student foram realizados com auxílio do programa StatView para

MacIntosh , e utilizados para determinar a diferença entre as médias dos parâmetros citados (KIRKWOOD, 1988). Diferenças entre as médias com probabilidades de $p \leq 0,05$ foram consideradas estatisticamente significantes.

3.3 Modelo da Alça Intestinal Ligada

3.3.1 Animal Experimental

Coelhos albinos carlifornianos, de ambos os sexos, pesando de 1,5-2,0 quilos, ou ratos Wistar, pesando de 140-160 gramas, foram anestesiados com ketamina (35 mg/kg corporal, i.m.) e xylazina (5 mg/kg corporal, i.m.), e realizada laparotomia mediana de 4-8 cm para visualização do intestino delgado. O modelo clássico da alça intestinal ligada foi o mesmo utilizado por DE e CHATTERJE (1953) para estudos *in vivo* do efeito secretório do *Vibrio cholerae*. O lúmen de um segmento de aproximadamente 30 cm, medido a partir da válvula íleo-cecal, foi lavado com 5-10 ml de uma solução salina tamponada (pH 7,4). Em seguida, segmentos menores de 4-6 cm foram isolados com dupla ligadura (fio de seda) para injeção 1 ml de toxina da cólera (1 µg/ml) ou controle com solução salina tamponada (PBS).

3.3.2 Protocolo Experimental e Dosagens Bioquímicas

O fluido recuperado do lúmen intestinal (2-18 horas) nos grupos controles ou tratados foi coletado, medido e estocado (-20°C). A taxa de secreção do fluido intestinal foi avaliada dividindo o volume recuperado (μl) pelo comprimento (cm) da alça intestinal ligada.

As dosagens dos teores de sódio e potássio nas amostras do fluido intestinal coletado foram realizadas por fotometria de chama (Flame Photometer - modelo 443 e 21, Instrumentation Laboratory Inc. Lexington, MA USA). O método colorimétrico para cloretos foi utilizado de acordo com as especificações do fabricante (Labtest Biot. Diagnósticos Ltda, Belo Horizonte Brasil). A osmolalidade das amostras de perfusato foi medida em osmômetro (Vapor Pressure Osmometer 5100C, Wescor Inc., Logan, Utha USA).

3.3.1 Análise dos Dados

Os cálculos das taxas de secreção intestinal, teores de eletrólitos, osmolalidade e pH do fluido intestinal foram realizados utilizando Excel 4.0 (Microsoft Corporation, Cupertine, CA) no sistema MacIntosh (Apple Computer Inc., CA USA). A diferença entre as médias dos parâmetros citados foi analisada utilizando a análise de variância (ANOVA) e os testes

de Fischer, Duncan, Schèffè e o teste *t* de Student, com auxílio do programa StatView para MacInstosh (KIRKWOOD, 1988). Valores de probabilidades $p \leq 0,05$ foram considerados significativos.

3.4 Modelo da Perfusão Intestinal

3.4.1 Animal Experimental

Coelhos albinos, californianos, de ambos os sexos, pesando de 1,5-2,0 quilos, e ratos Wistar, de ambos os sexos, pesando de 140-160 gramas foram utilizados para perfusão intestinal.

3.4.2 Protocolo Experimental e Dosagens Bioquímicas

Após anestesia com ketamina e xylazina, foi realizada laparotomia mediana de 6-10 cm para visualização do intestino delgado. O lúmen de um segmento de aproximadamente 30 cm do intestino delgado foi lavado com 10 ml de uma solução salina tamponada (pH 7,4). Em seguida, foi introduzida uma cânula a montante e outra a jusante no segmento intestinal. A perfusão com as soluções testes (37°C, pH 7,4) foram realizadas pela cânula proximal, utilizando uma bomba (Holter Roller Pump 900, Extracorporeal Medical Specialities Inc., King of Prússia, PA USA) de

baixo fluxo (0,05-0,9 ml/min) devidamente calibrada (**Figura 9**). Esse modelo da perfusão intestinal *in vivo* foi baseado no método descrito por ELLIOTT e cols. (1991).

Ao fim dos experimentos, os animais foram sacrificados e o peso seco (90°C por 48 h) dos segmentos intestinais perfundidos foi utilizado para correção dos parâmetros funcionais de absorção.

Fenolsulfaleína (FSF; 50 mg/ml; Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) foi utilizada como marcador não-absorvível para os cálculos dos parâmetros de absorção de sódio, potássio, cloreto e água. FSF foi medido por espectrofotometria (Espectrofotômetro modelo B382, Micronal S.A. Aparelhos de Precisão, São Paulo, SP Brasil), conforme método desenvolvido por SCHEDL e CLIFTON (1961). As dosagens dos teores de sódio e potássio nas amostras de perfusato foram realizadas por fotometria de chama (Flame Photometer - modelo 443 e 21, Instrumentation Laboratory Inc. Lexington, MA USA). O método colorimétrico para cloretos foi utilizado de acordo com as especificações do fabricante (Labtest Biot. Diagnósticos Ltda, Belo Horizonte Brasil). A osmolalidade das amostras de perfusato foi medida em osmômetro (Vapor Pressure Osmometer 5100C, Wescor Inc., Logan, Utha USA).

Sistema de perfusão intestinal

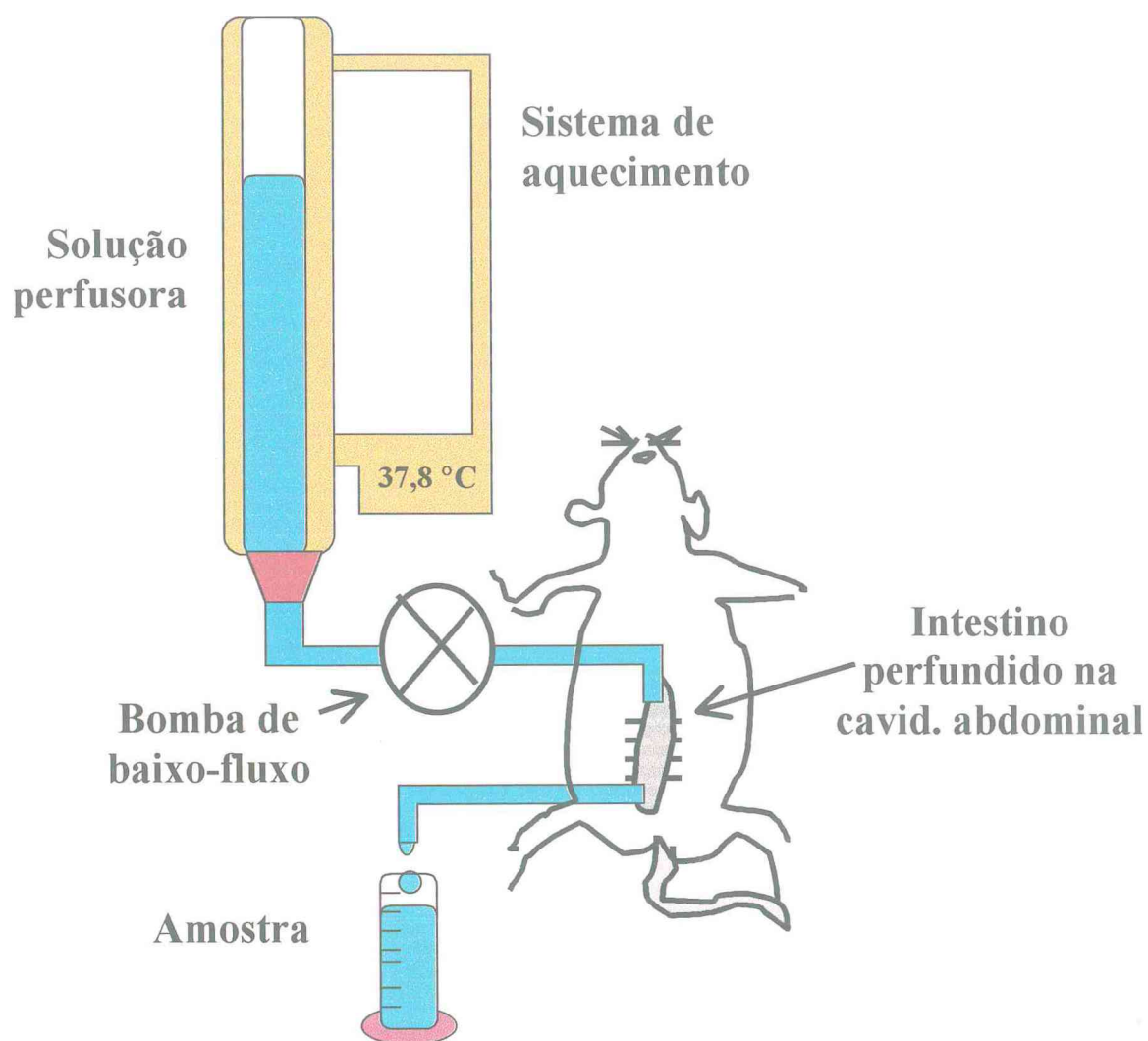


Figura 9 – A figura mostra o sistema aberto de perfusão intestinal *in vivo*, o qual é composto de um tubo para solução perfusora, um sistema de aquecimento e uma bomba de baixo fluxo. A solução perfunde o intestino na cavidade peritoneal e o eluente é coletado para análise bioquímica.

As soluções foram perfundidas nos animais controles e tratados com toxina da cólera. Na perfusão em coelhos, a toxina da cólera (concentração final = 1 $\mu\text{g/ml}$) foi adicionada em 15-30 ml de solução de Ringer (pH 7,4) e perfundida durante aproximadamente 30 min. antes do início da perfusão propriamente dita. Em ratos, a toxina da cólera (1 $\mu\text{g/ml}$) foi incubada por 18 h, no volume total de 5 ml, no lúmen de um segmento do intestino delgado fechado, medindo aproximadamente 30 cm. Os controles foram tratados da mesma maneira, mas sem a adição de toxina da cólera.

O volume das alças intestinais de coelhos controles foi de $21 \pm 7,5$ ml e não houve diferença estatística significativa quando comparada com os outros grupos utilizados. Observamos uma pequena perda de FSF nos animais tratados com toxina da cólera (TC) e utilizando solução de Ringer, mais não houve diferença significativa quando em comparação com o grupo controle (%FSF recuperado: SR + TC = $69 \pm 16\%$ vs. SR controle = $87 \pm 12\%$; $n = 5$, $p > 0,05$ teste t de Student). Em seguida, foram coletadas amostras do perfusato a cada 10 min., durante 180 min.

3.4.3 Análise dos Dados

Os cálculos dos parâmetros de transportes intestinais de eletrólitos e água foram realizados em planilha eletrônica Excel v.5.0 (Microsoft Corp., Cupertine, CA USA) para sistema operacional MacIntosh (Apple Computer Inc., CA USA). As diferenças entre as médias desses parâmetros foram testadas utilizando a análise de variância (ANOVA) e os testes de Fischer, Duncan, Schèffè e o teste *t* de Student, com auxílio do programa StatView para MacInstosh (KIRKWOOD, 1988). Valores de probabilidades $p \leq 0,05$ foram considerados significativos.

3.5 Cromatografia Líquida de Alta Pressão para Determinação de Monossacarídeos e Dissacarídeos

3.5.1 Açúcares e Reagentes

Mio-inositol, D-(+)-glicosamina, sorbitol, manitol, D-(+)-glicose, melibiose, β -lactose e lactulose foram comprados da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO) e utilizados como açúcares-padrões para análise em cromatografia líquida de alta pressão com detecção amperométrica pulsada (HPLC-PAD). Hidróxido de sódio e carbonato 50% (v/v) foram usados como eluentes para coluna de cromatografia.

3.5.2 Equipamentos

O sistema analisador de carboidrato BioLC HPLC, a que foram adicionado o módulo de bomba gradiente GPM-2, o módulo eluente de gás EDM-II e o detector pulsátil amperométrico PAD-II com eletrodos de ouro foram adquiridos da Dionex (Sunnyvale, CA). A coluna de troca aniônica CarboPac MA-1 (250 mm x 4.0 mm I.D., pelicular resin) com o módulo de proteção foi também adquirida da Dionex. As injeções foram realizadas manualmente. A **Figura 10** mostra o desenho esquemático do sistema de HPLC-PAD.

3.5.3 Preparação das Amostras

Para padronização e calibração das amostras usando HPLC-PAD, preparamos dois grupos de soluções denominadas de soluções-padrões. Cada grupo foi composto de quatro açúcares-padrões na concentração de 0,06 mM para cada açúcar. Os grupos foram divididos em Grupo I, glicosamina, manitol, melibiose e lactulose, e Grupo II, inositol, sorbitol, glicose e lactose. As soluções-padrões, contendo os mesmos açúcares, foram injetadas no início de cada experimento para calibração do HPLC-PAD, bem como a cada quatro amostras para compensar a perda de

Cromatografia líquida de alta pressão

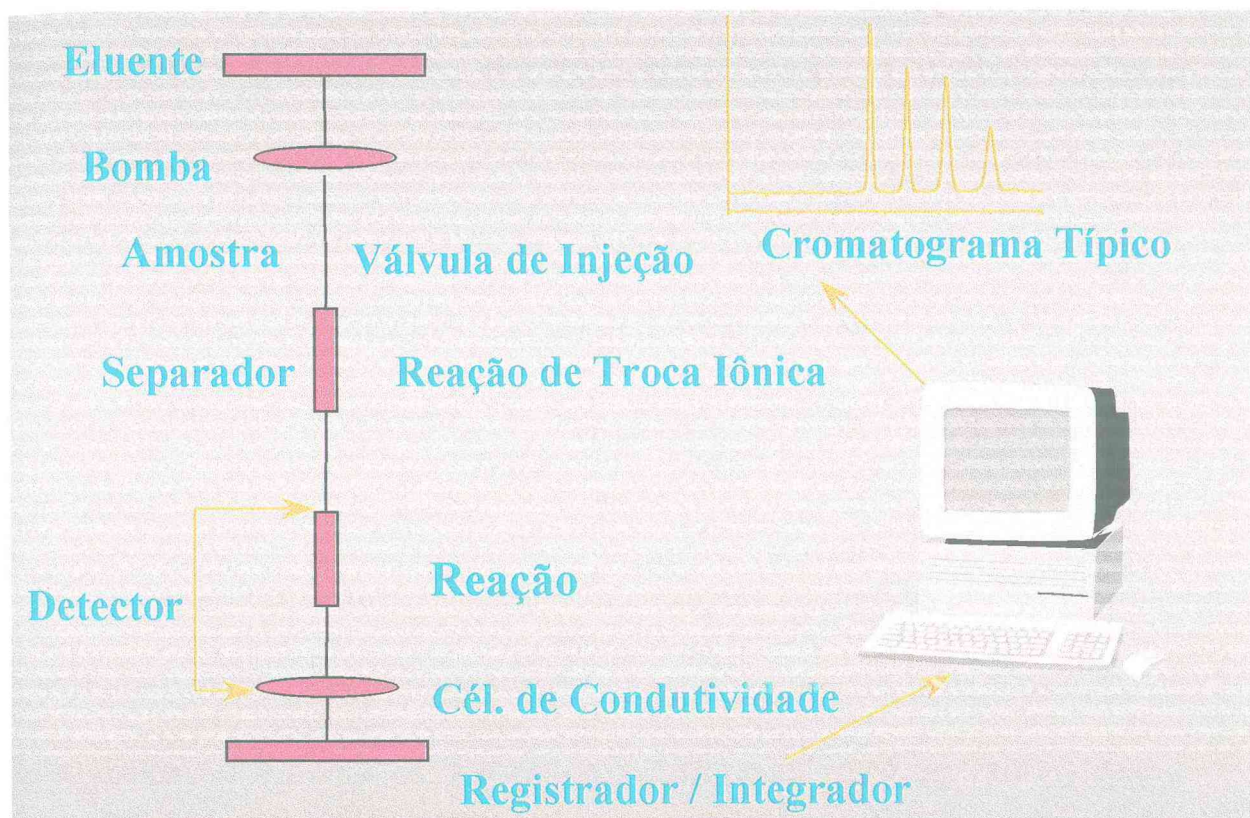


Figura 10 – O sistema de cromatografia líquida de alta pressão com detecção amperométrica pulsada (HPLC-PAD) é mostrado no esquema. A coluna de cromatografia é o componente essencial para separação de monossacarídeos e dissacarídeos.

sensibilidade resultante do acúmulo de materiais nos eletrodos de ouro para detecção. Para analisar a variação intra-experimento, utilizamos os padrões dos Grupos I e II na concentração de 0,1 mM. Cinquenta microlitros de cada grupo foram utilizados para dosagens sucessivas (N = 4). Para avaliar a variação inter-experimento, preparamos quatro amostras independentes dos Grupos I e II na concentração de 1,0 mM. A partir das soluções originais, diluímos os açúcares-padrões nas seguintes concentrações: 1,0, 0,3, 0,1, 0,03 e 0,01 mM, respectivamente. De cada solução, tiramos 50 µl para dosagem no HPLC-PAD.

As amostras de urina (50 µl) para dosagens foram diluídas em 50 µl de uma solução contendo melibiose (3,6 mM) e adicionada água bidestilada e deionizada no volume de 2,9 ml. Após filtração (0,22 µ), 50 µl foram utilizados para dosagem no HPLC-PAD. As concentrações e tempos de retenções foram armazenadas e utilizadas depois para análise.

3.5.4 Validação do Teste de Permeabilidade

Para validar o teste diferencial de permeabilidade intestinal utilizando lactulose e manitol, estudamos crianças de um estudo coorte na comunidade Gonçalves Dias, ora em desenvolvimento na Unidade de Pesquisas Clínicas-HUWC e Depto. de Fisiologia e Farmacologia, Faculdade de Medicina,

Universidade Federal do Ceará (UFC). Uma folha de consentimento (veja **ANEXOS**, item 8.6) foi aprovada pelo Comitê de Ética da Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, e utilizada nesse estudo. Após assinatura da folha de consentimento, os participantes do estudo, crianças menores do que 5 anos e maiores de 2 meses de idade, com e sem diarreia, foram estudadas para validação do teste diferencial de permeabilidade. O teste de permeabilidade foi também validado em voluntários adultos saudáveis, pacientes HIV⁺ com e sem diarreia, atendidos no Hospital S. José, Fortaleza, CE-Brasil. O protocolo experimental foi examinado e aprovado pela Comissão de Ética da Faculdade de Medicina, UFC. Após assinatura da folha de consentimento (veja **ANEXOS**, item 8.6), os participantes tomaram 20 ml (5g de lactulose/1g de manitol), conforme o protocolo descrito a seguir e resumido na **Figura 11**.

Após três horas de jejum, as crianças (2 ml/kg) ou adultos (20 ml) tomaram a solução-teste contendo as formulações galênicas de manitol (50 mg/ml) e lactulose (250 mg/ml) (**Figura 11**). Manitol foi adquirido da HenriFarma Produtos Químicos e Farmac. Ltda., São Paulo, SP e lactulose (Lactulona) da Luitpold Produtos Farmacêuticos Ltda. Barueri, SP. A urina foi coletada por 5 horas em recipiente contendo 1 ml de clorhexidina (40 mg/ml) adquirida da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). O volume total

Teste de Permeabilidade Intestinal

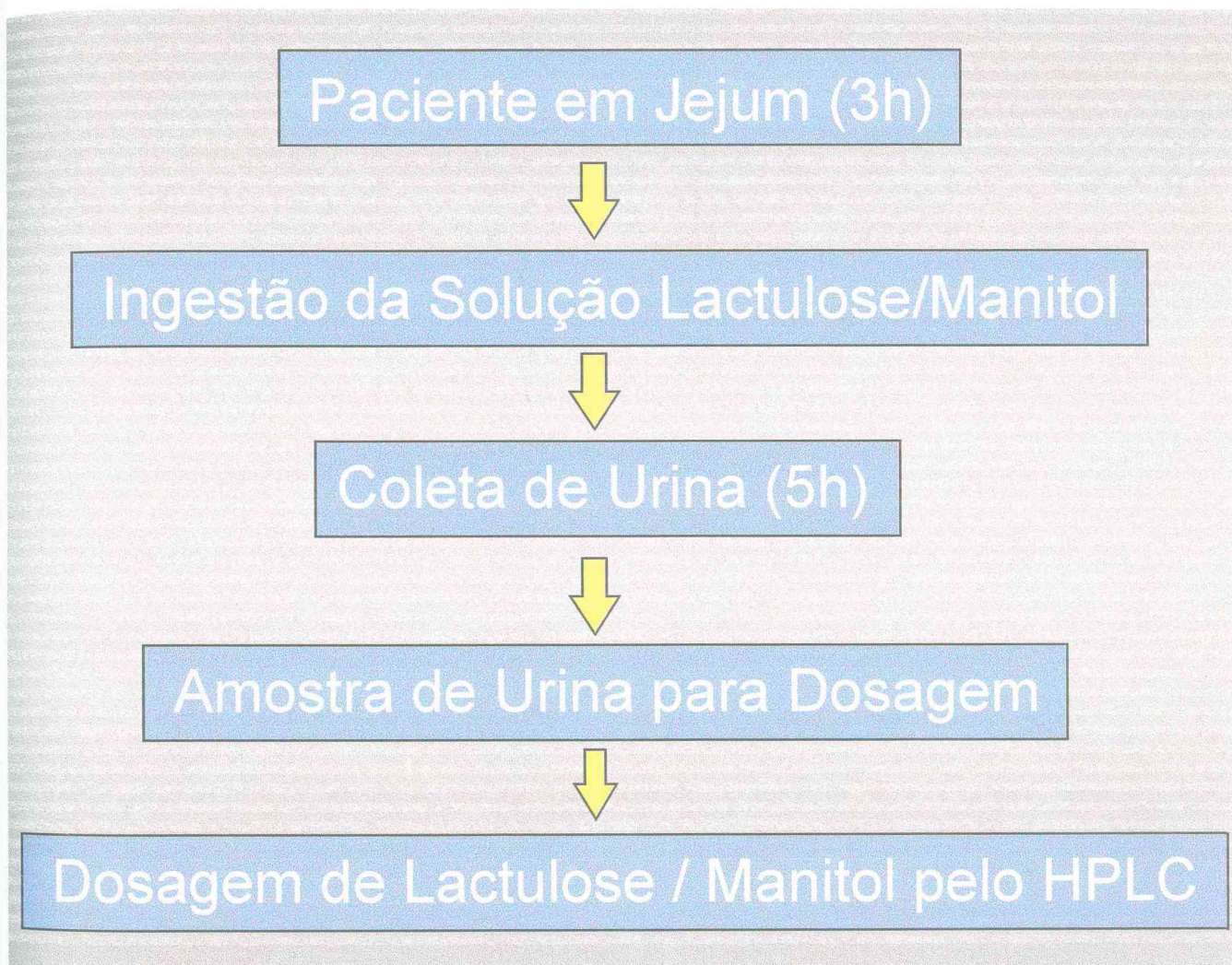


Figura 11 – Protocolo experimental para realização do teste diferencial de permeabilidade intestinal utilizando lactulose e manitol.

de urina foi anotado e uma amostra de 10 ml foi estocada a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ para posterior dosagem de lactulose e manitol pelo método de HPLC-PAD descrito anteriormente.

3.5.5 Condições Cromatográficas para Análise

A análise de mono- e dissacarídeos por HPLC-PAD foi realizada em equipamento Dionex BioLC, conforme descrito há pouco. A eluição dos açúcares foi realizada usando eluente isocrático (concentração constante) de NaOH 480 mM com o fluxo de 0,4 ml/min. A temperatura da coluna foi a do ambiente no laboratório. A determinação dos açúcares foi conduzida com detector amperométrico com o seguinte padrão de potencial de duração: 0,15 v, 720 ms; oxidação = 0,70 v, 120 ms; redução = -0,30 v, 360 ms. A variação de saída do detector foi ajustada para 1,0 mA, com tempo de resposta para integração de 3 s. Cinquenta microlitros de cada amostra foram injetados manualmente. A quantificação das amostras foi realizada utilizando o sistema de dados Bio-AutoIon 450 (Dionex).

3.5.6 Análise dos Dados

Os resultados foram mostrados em média \pm desvio padrão e análise de regressão foi utilizada para determinação dos coeficientes de

correlações dos açúcares-padrões usados. Os dados foram analisados observando-se a precisão intra- e inter-experimentos, linearidade das concentrações-padrões utilizadas, percentual de recuperação e especificidade de separação dos açúcares testados, incluindo o manitol e a lactulose. A validação do teste de permeabilidade usando manitol e lactulose foi realizada em crianças e adultos com e sem diarreia. O teste não-paramétrico de Wilcoxon foi utilizado para determinação das diferenças entre as médias dos parâmetros analisados (KIRKWOOD, 1988). Os parâmetros analisados foram os percentuais de excreção de lactulose, manitol e a taxa de lactulose/manitol. Valores de probabilidades $p \leq 0,05$ foram considerados significativos.

3.6 Impacto de Glutamina na Integridade e Permeabilidade Intestinal

3.6.1 Comunidade Urbana Gonçalves Dias

Para testar a hipótese de que a glutamina possa ter um benefício para o epitélio intestinal e no tratamento da diarreia aguda, delineamos ensaio clínico em crianças pertencentes a uma comunidade urbana de baixa condição socioeconômica, denominada Gonçalves Dias (GD), em Fortaleza, CE (veja ANEXOS, item 8.6). Essa comunidade está localizada a cinco

quadras dos laboratórios da Unidade de Pesquisas Clínicas, por conseguinte, aproximadamente 5-10 minutos, a pé, desses laboratórios.

Em 1989, iniciamos um estudo coorte para doenças intestinais, o qual se notabilizou pela sua sistemática de vigilância e interação de sucesso entre o meio acadêmico e a comunidade. Atualmente, esse estudo prospectivo encontra-se com nove anos e abrange uma gama de profissionais e pesquisadores treinados, entre agentes de saúde, alunos de iniciação científica, enfermeiras, médicos, alunos de pós-graduação, pesquisadores, além do pessoal de apoio técnico-administrativo.

Nosso último censo nessa comunidade, realizado em setembro de 1997, detectou 351 moradias, com a média de 4,3 pessoas por casa nessa população (1.501 pessoas). Cento e oitenta e sete (12%) crianças abaixo de cinco anos residiam nessa comunidade no momento do nosso último censo.

3.6.2 População para o Ensaio Clínico

Nessa comunidade e desde o início do estudo, em 1989, desenvolvemos e mantemos um sistema de vigilância ativa para o acompanhamento e detecção de novos episódios de diarreias e outras doenças, através do uso de um questionário específico (veja **ANEXOS**, item 8.6). Esse sistema envolve a visita, duas vezes por semana, aos domicílios

das crianças nascidas naquela comunidade e consideradas ativas no estudo. A visita semanal é realizada por duas agentes de saúde e uma enfermeira, além da coordenação realizada pelo autor do estudo. Esse grupo faz reuniões semanais regulares para revisão da pesquisa ora em andamento e o delineamento de novas atividades de pesquisas.

Até dezembro de 1997, 388 crianças foram envolvidas no estudo coorte prospectivo, das quais 161 (41%) permaneciam ativas, ou seja, participavam ainda do estudo. Das 227 (59%) crianças que saíram do estudo: 163 (72%) mudaram de endereço; 26 (11%) não cooperaram com o estudo; 17 (8%) foram doadas para outras famílias; e 21 (9%) tiveram outras razões.

Análise preliminar de morbidade por diarreia na comunidade GD, no período de agosto 1989 a dezembro 1996, em 261 crianças participantes desse estudo, mostrou que em média essas crianças tiveram 3,6 episódios da doença por criança/ano de observação, dos quais 3,38, 0,18 e 0,04 foram por diarreia aguda (≤ 14 dias de duração), persistente (>14 e ≤ 30 dias) e crônica (>30 dias), respectivamente.

3.6.3 Plano Experimental e Tamanho da Amostra

Idealizamos um estudo prospectivo caso-controle, duplo-cego e aleatório em crianças (>2 meses de idade) com diarreia (três ou mais evacuações líquidas nas últimas 24 horas) na comunidade GD. As crianças com diarreia nessa comunidade foram detectadas através do sistema de vigilância ativa, conforme descrito. O grupo, denominado de caso, tomou a solução oral de reidratação contendo glutamina, e o grupo controle tomou a solução de reidratação oral padrão recomendada pela Organização Mundial de Saúde (OMS). A composição das soluções de reidratações orais utilizadas no estudo são mostradas na **Tabela 3**. Todos os sais e substratos utilizados nas soluções provieram de formulações galênicas, e estas foram preparadas no laboratório de farmacotécnica da UPC, UFC.

Com amostras de 10-15 pacientes em cada grupo, tivemos uma probabilidade de mais de 80% de detectar um efeito verdadeiro na intervenção, utilizando o teste diferencial de permeabilidade intestinal com lactulose/manitol (efeito placebo 10%; efeito do tratamento 30%; valor estatístico de 80%; $p < 0,05$).

3.6.4 Comissão de Ética

O protocolo experimental foi examinado e aprovado pela Comissão de Ética da Faculdade de Medicina (veja **ANEXOS**, item 8.7).

Para todas as crianças admitidas no estudo, anexou-se ao protocolo de pesquisa a ficha de consentimento devidamente assinada pelo pais e/ou responsáveis legais. Assegurou-se às crianças e seus responsáveis o direito inquestionável de, a qualquer momento, retirarem-se espontaneamente do protocolo, sem prejuízo ou solução de continuidade em seu trabalho e assistência ambulatorial e/ou hospitalar, colocando-se, sempre em primeiro lugar, o máximo controle possível da doença.

3.6.5 Critérios de Inclusão e Exclusão

Crianças com idade superior a dois meses, participantes do estudo coorte prospectivo, conforme descrito, e com diarréia foram elegíveis para participar do estudo. Para efeito de composição do grupo experimental para *randomização*, diarréia foi definida como a eliminação de três ou mais evacuações líquidas em cada período de vinte e quatro horas.

Foram excluídas todas as crianças com diarréia que apresentassem desidratação severa de correção difícil e/ou complicações de infecções sistêmicas graves concomitantes, como tuberculose, pneumonia, meningite,

sepsis, varicela, sarampo e outras, que impossibilitassem sua participação livre e voluntária, além daquelas apresentando qualquer grau de insuficiência hepática, renal ou cardíaca.

Tabela 3. Composição da solução de reidratação oral à base de glutamina (SRO-Gln) e da solução padrão (SRO) recomendada pela Organização Mundial de Saúde para o tratamento de diarreia.

Composição ^a	SRO	SRO	SRO-Gln	SRO-Gln
	g / L	(mmol/L)	g / L	(mmol/L)
NaCl	3,5	Na ⁺ (90)	3,5	Na ⁺ (90)
Citrato de Na ⁺	2,9	Cl ⁻ (80)	2,9	Cl ⁻ (80)
KCl	1,5	K ⁺ (20)	1,5	K ⁺ (20)
Glicose ^b	20,0	Gli (111)	16,2	Gli (90)
Glutamina ^b	-	-	13,1	Gln (90)

^a Todos os sais e a glicose são formulações galênicas e foram obtidas da HenriFarma Produtos Químicos e Farmacêuticos Ltda., São Paulo, SP. A glutamina, 100% pura, é também uma formulação galênica e foi adquirida da Cambridge Nutraceuticals, Boston, MA.

^b Glicose (P.M. = 180 Da) e Glutamina (P.M. = 146 Da).

3.6.6 Questionário e Teste de Permeabilidade

Para cada criança admitida, consta um protocolo numerado, com um questionário individualizado (veja **ANEXOS**, item 8.8), contendo dados pessoais e clínico-laboratoriais importantes referentes à evolução da doença, bem como um espaço destinado ao desenvolvimento da pesquisa propriamente dita (coleta e resultados).

Depois de esvaziarem a bexiga, sob jejum matinal (>3 horas), as crianças ingeriram 2 ml por quilo de peso, de uma solução contendo lactulose (250 mg/ml) e manitol (50 mg/ml), no volume máximo de 20 ml. Uma hora após esse procedimento, foram liberadas para o desjejum. A urina foi coletada por cinco horas num recipiente próprio estéril, contendo clorhexidine (40 mg/ml) adquirida da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). Uma vez estabelecida a diurese final do período, retirou-se uma alíquota de 10 ml de cada amostra para dosagens de lactulose e manitol, conforme descrevemos.

3.6.7 Análise dos Dados

Os cálculos dos parâmetro de excreção de lactulose, manitol e a taxa lactulose/manitol foram feitos com auxílio da planilha de Excel 4.0 (Microsoft Corporation, Cupertine, CA) no sistema IBM compatível. O teste não-paramétrico de Wilcoxon foi utilizado para determinação das diferenças entre as médias dos parâmetros analisados (KIRKWOOD, 1988). O teste *t* de Student ou Qui-quadrado foi utilizado para comparação de dados clínicos relevantes para a pesquisa, como idade, sexo e grau de desidratação no início do estudo. Valores de probabilidades $p \leq 0,05$ foram considerados significativos.

RESULTADOS

4 RESULTADOS

4.1 Estrutura Química e Estabilidade da Glutamina, Alanil-Glutamina e Alanil-Glutamil-Glutamina

O mecanismo de degradação da glutamina (Gln) em meio aquoso e ácido, e o mecanismo de estabilidade da alanil-glutamil-glutamina (Ala-Gln-Gln) são mostrados na **Figura 12**. A adição de uma molécula de alanina e/ou glutamina na molécula original de glutamina previne seu processo de degradação química em meio aquoso e ácido. A ligação peptídica, por ser uma ligação forte e planar, é responsável pela estabilização da glutamina, impedindo sua degradação em meio aquoso e ácido. As curvas de pHs e tempo-efeito para degradação de glutamina, em meio aquoso (água bidestilada e deionizada) acidificado com solução de ácido clorídrico (HCl 1N), são mostradas na **Figura 13**. Nos pHs de 7,0, 5,0 e 3,0, a glutamina apresenta os seguintes percentuais de degradações 5%, 3% e 9%, respectivamente, no tempo de 375 horas de incubação. Entretanto, no pH de 1,0 a glutamina é degradada em 24% nas primeiras 25 horas de incubação, atingindo o máximo de 77% de degradação no tempo de 375 horas. A **Figura 14** mostra a estabilidade da alanil-glutamina (Ala-Gln) e alanil-glutamil-glutamina em pH de 1,0 e no tempo de 100 horas. Observar a rápida degradação de

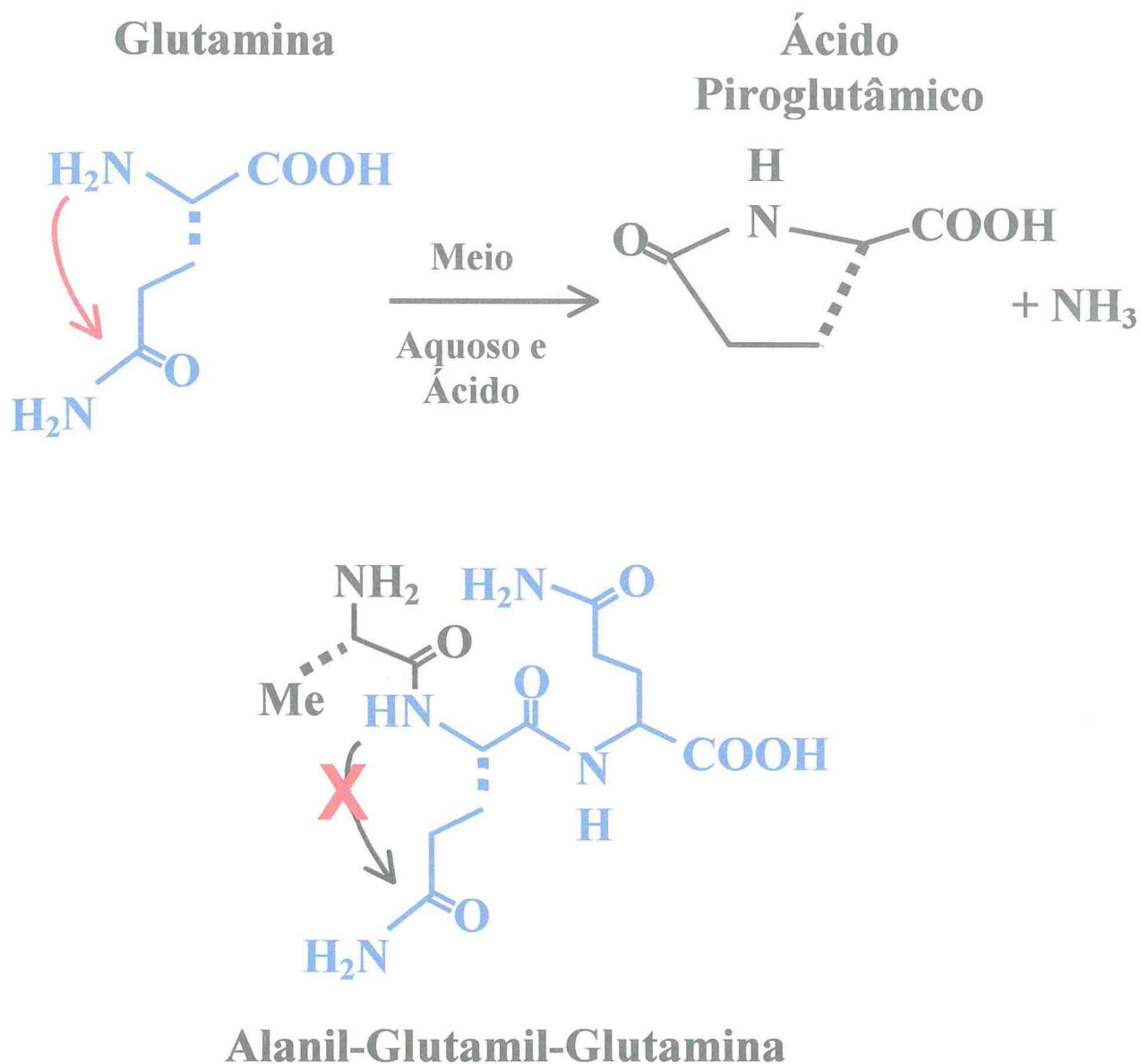


Figura 12 - Estrutura química e mecanismo de estabilidade química da glutamina e alanil-glutamyl-glutamina. A adição de uma molécula de alanina e/ou glutamina na molécula original da glutamina previne sua degradação em meio aquoso e ácido.

Hidrólise de Glutamina em Diferentes Graus de Acidez

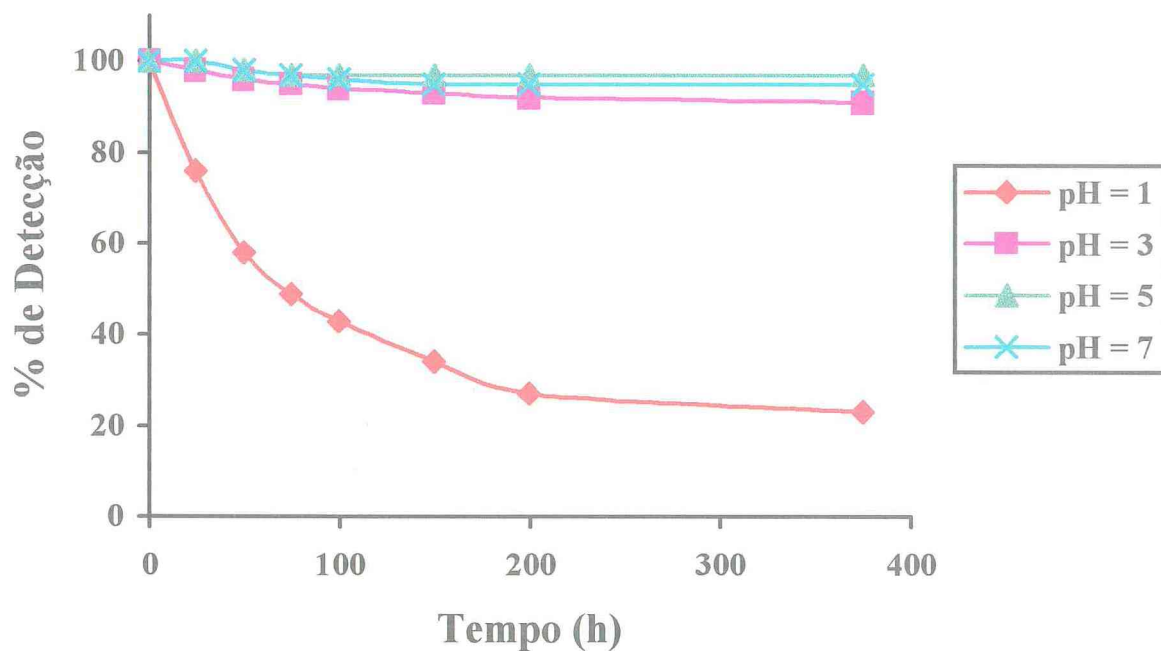


Figura 13 – Curvas tempo-efeitos de degradação da glutamina em diferentes graus de acidez. Cada ponto representa a média de três experimentos com cada amostra medida em duplicado.

Degradação de Glutamina e Derivados

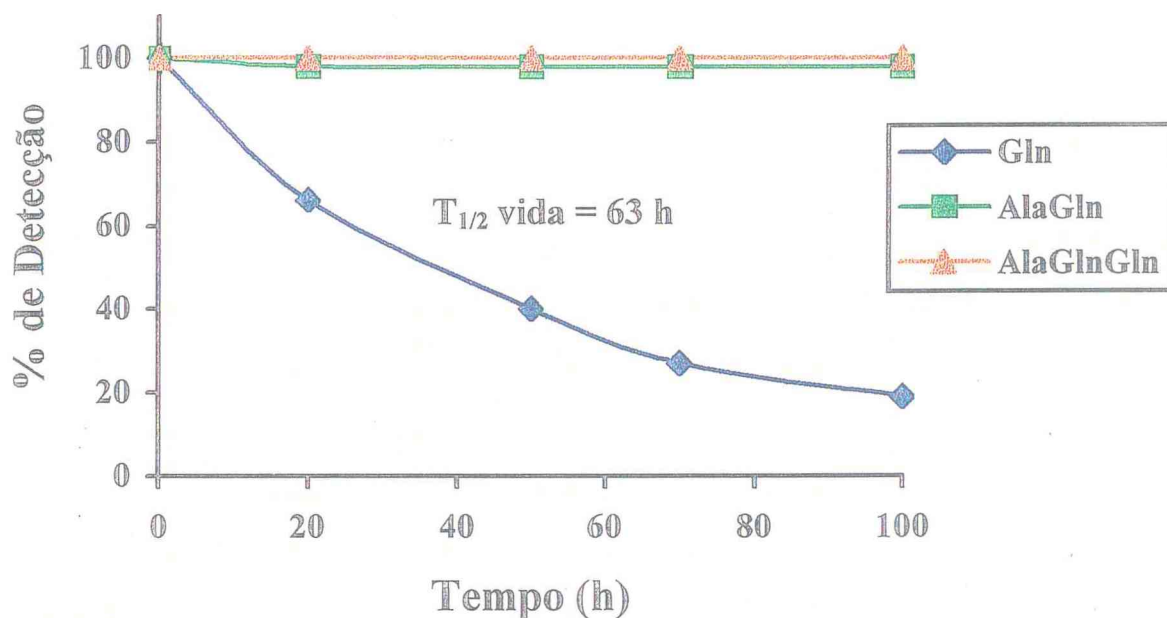


Figura 14 – Curvas tempo-efeitos de degradação da glutamina (Gln), alanil-glutamina (Ala-Gln) e alanil-glutamila-glutamina (Ala-Gln-Gln) em pH = 1. Cada ponto representa a média de três experimentos com cada amostra medida em duplicado. $T_{1/2}$ vida = meia-vida da Gln.

glutamina, atingindo o máximo de 81% no tempo de 100 horas de incubação. Ao contrário, os compostos Ala-Gln e Ala-Gln-Gln permaneceram estáveis durante todo o período de observação.

4.2 Sensibilidade e Eficácia *In Vitro* do Cotransporte Intestinal de Sódio com Glutamina, Alanina e Glicose

As curvas dose-respostas cumulativas de glutamina (Gln; 10^{-5} a 10^{-2} M), alanina (Ala; 3×10^{-4} a $3 \times 10^{-1.5}$ M) e glicose (Gli; 10^{-5} a 3×10^{-2} M) na corrente de curto-circuito (CCC) em mucosa do íleo de coelho, montada em câmaras de Üssing, mostraram efeitos máximos de 100 , 66, e 36%, respectivamente (**Figura 15**). Os pD_2 calculados para glutamina, alanina e glicose foram de 3,0, 2,4 e 3,5, respectivamente (**Figura 15**). Assim, a glutamina e alanina apresentaram eficácias semelhantes e melhores do que a glicose no aumento da CCC. No entanto, glutamina e glicose mostraram semelhantes sensibilidades e foram melhores do que a alanina.

A substituição equimolar de sódio por colina no lado mucoso aboliu completamente os efeitos na CCC induzidos por glutamina, alanina e glicose (**Figuras 16, 17, e 18**). Os coeficientes de Hill calculados para glutamina, alanina e glicose nas curvas dose-respostas há pouco descritos mostraram os seguintes valores: 1,4, 0,97 e 0,96, respectivamente (**Figura 19**).

Curvas dose-respostas cumulativas de glutamina, alanina e glicose

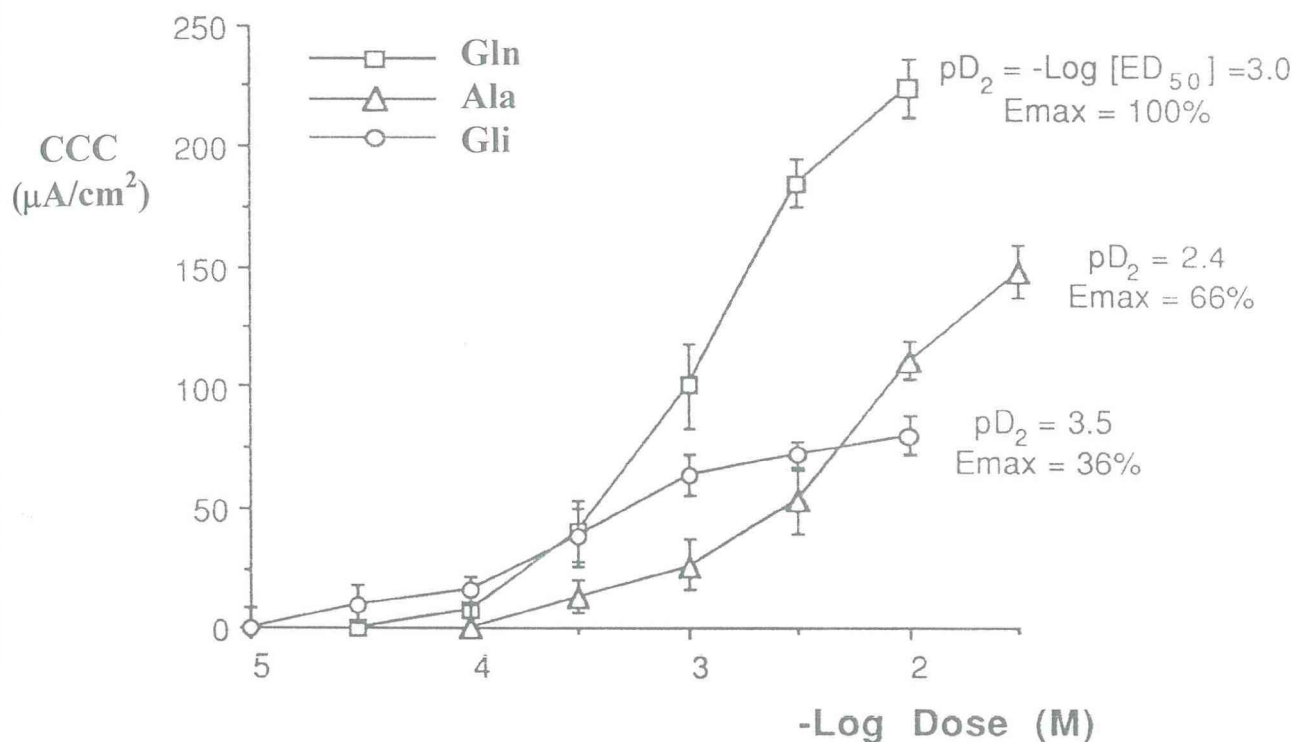


Figura 15 – Efeito de glutamina, alanina e glicose ($10^{-5} - 10^{-1}$ M) no transporte eletrogênico intestinal *in vitro*. Os dados representam a média \pm erro padrão do aumento da corrente de curto-circuito (CCC) de no mínimo quatro animais. E_{max} = efeito máximo; e pD_2 = logarítmico negativo da concentração que induz o efeito de 50%.

Curva dose-resposta cumulativa da glutamina na ausência de sódio

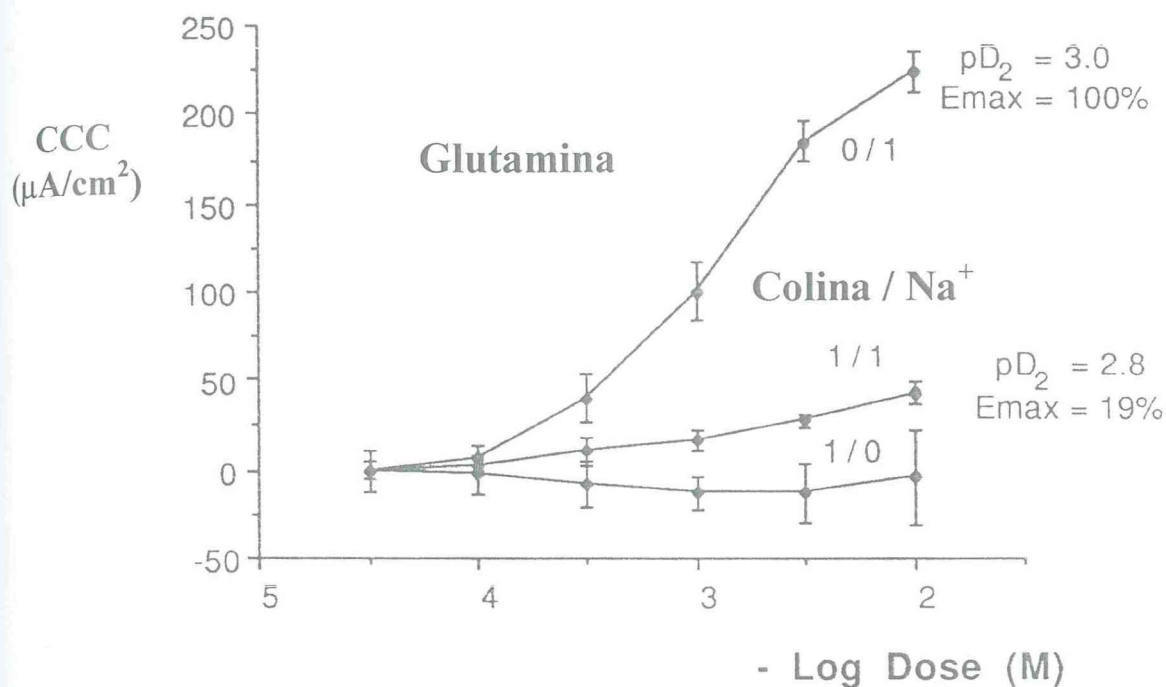


Figura 16 – Efeito de glutamina ($10^{-4,5}$ – 10^{-2} M) no transporte eletrogênico intestinal *in vitro*. Os dados representam a média \pm erro padrão do aumento da corrente de curto-circuito (CCC) de no mínimo quatro animais. E_{max} = efeito máximo; e pD_2 = logarítmico negativo da concentração que induz o efeito de 50%.

Curva dose-resposta cumulativa da alanina na ausência de sódio

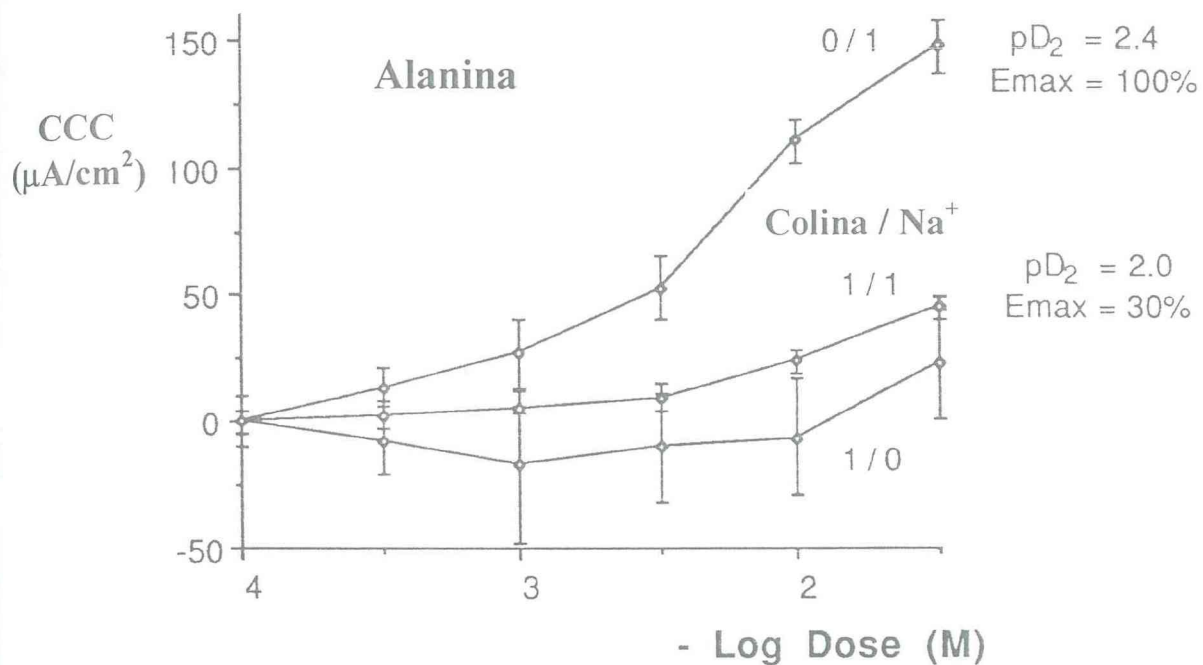


Figura 17 – Efeito de alanina (10^{-4} – $10^{-1,5}$ M) no transporte eletrogênico intestinal *in vitro*. Os dados representam a média \pm erro padrão do aumento da corrente de curto-circuito (CCC) de no mínimo quatro animais. Emax = efeito máximo; e pD₂ = logarítmico negativo da concentração que induz o efeito de 50%.

Curva dose-resposta cumulativa da glicose na ausência de sódio

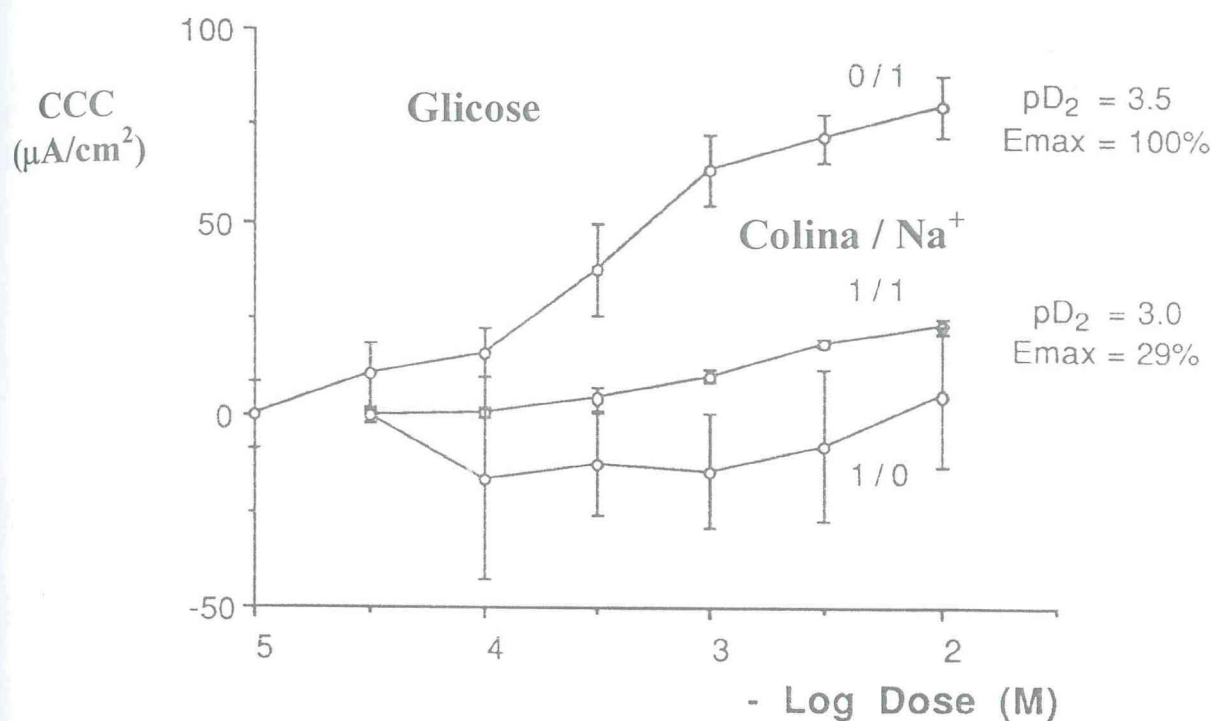


Figura 18 – Efeito de glicose (10^{-5} – 10^{-2} M) no transporte eletrogênico intestinal *in vitro*. Os dados representam a média \pm erro padrão do aumento da corrente de curto-circuito (CCC) de no mínimo quatro animais. Emax = efeito máximo; e pD_2 = logarítmico negativo da concentração que induz o efeito de 50%.

Coeficientes de Hill para as curvas dose-respostas cumulativas da glutamina, alanina e glicose

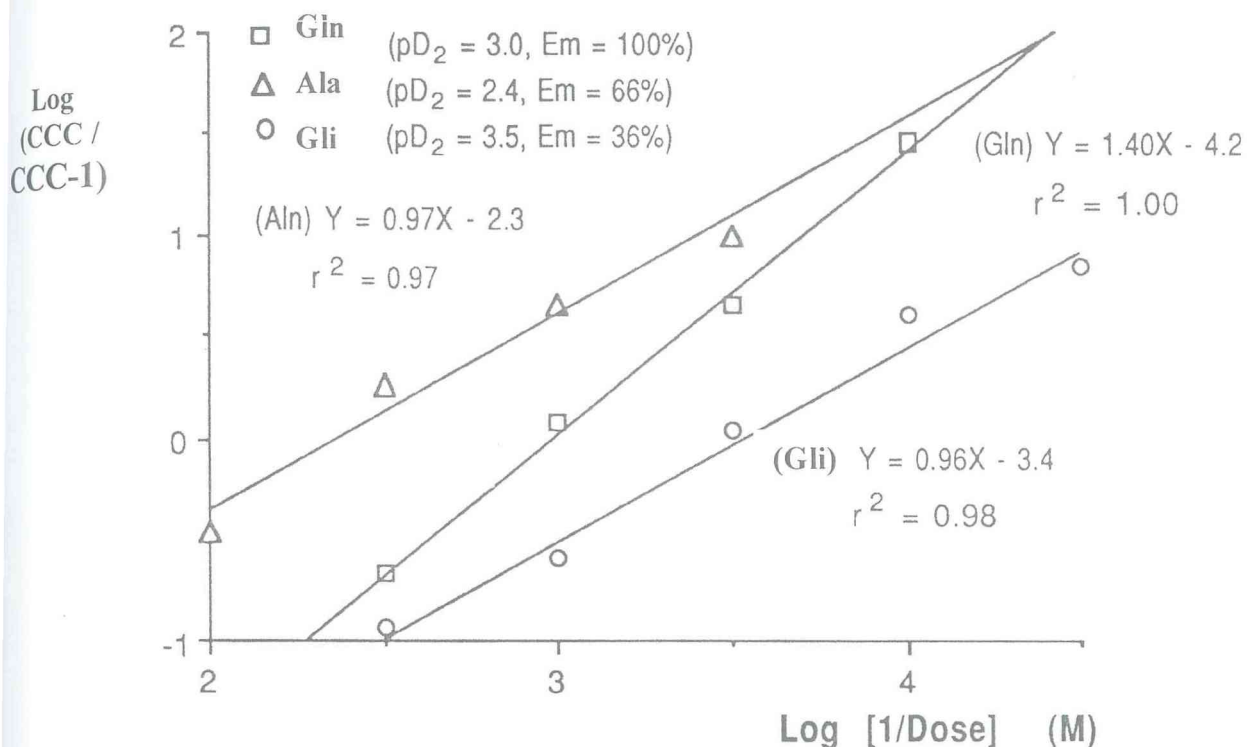


Figura 19 – Efeito de glutamina, alanina e glicose (10^{-5} – 10^{-2} M) no transporte eletrogênico intestinal *in vitro*. Os dados representam a média \pm erro padrão do aumento da corrente de curto-circuito (CCC) de no mínimo quatro animais. E_{max} = efeito máximo; pD_2 = menos o logarítmico da concentração que induz o efeito de 50%; r^2 = coeficiente de correlação; e equações das retas com seus respectivos coeficientes de Hill (Glutamina = 1,4; Alanina = 0,97; e Glicose = 0,96).

4.3 Efeito *In Vitro* da Toxina da Cólera no Cotransporte Intestinal de Sódio com Glutamina, Alanina e Glicose

A **Figura 20** mostra a atividade secretória da toxina da cólera (TC; 1 $\mu\text{g/ml}$) em alça intestinal ligada de coelhos e no tempo de 4 horas. A mucosa do íleo de coelho pré-tratado com TC também mostrou uma intensa secreção *in vitro* detectada pelo aumento na CCC (veja painel inserido na **Figura 20**). O pré-tratamento da mucosa intestinal com TC não alterou a eficácia e sensibilidade das curvas dose-respostas à glutamina ou alanina (**Figuras 21 e 22**), entretanto, reduziu a sensibilidade e aumentou a eficácia da curva dose-resposta à glicose (**Figura 23**).

4.4 Efeito *In Vitro* de Alanil-Glutamina e Alanil-Glutamil-Glutamina no Cotransporte Intestinal de Sódio

Os efeitos no transporte eletrogênico de Ala-Gln, Ala-Gln-Gln e vários outros derivados glicosilaminoácidos, como glicosilglutamina, glicosilalanina e o dipeptídeo acilalanilglutamina foram determinados em íleo de coelhos montados em câmaras de Üssing. Os resultados mostraram aumento significativo ($p < 0,05$; ANOVA) na CCC em relação ao controle, somente para os substratos Ala-Gln e Ala-Gln-Gln (**Figura 24**).

Efeito secretório intestinal da toxina da cólera

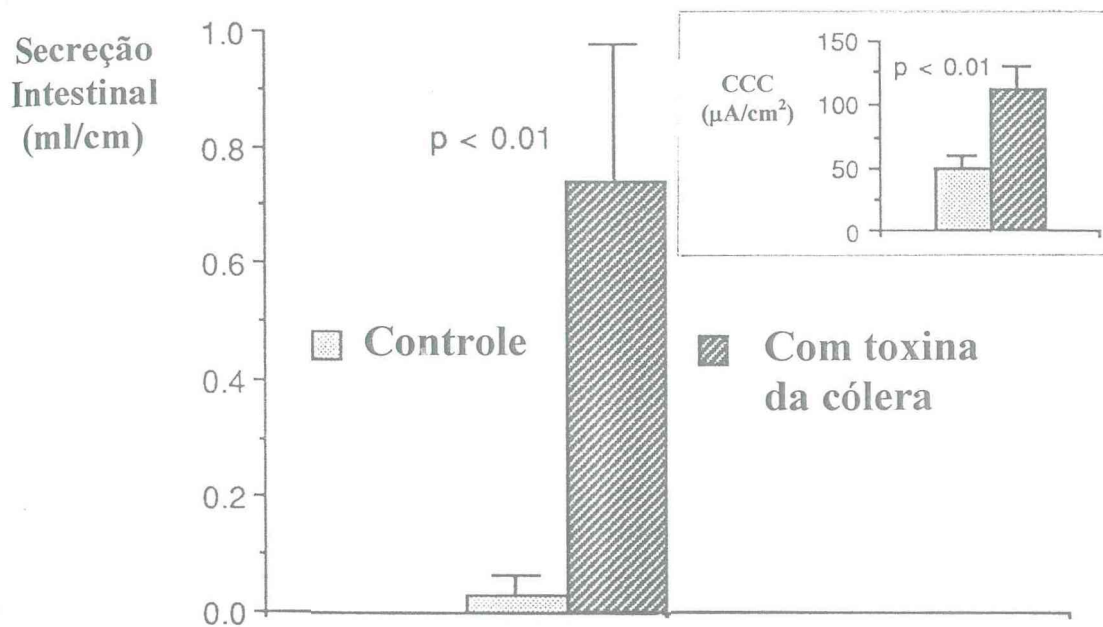


Figura 20 – Efeito de toxina da cólera (1 µg/ml) na secreção e transporte eletrogênico intestinal. Os dados representam a média \pm erro padrão do aumento no fluido intestinal ou corrente de curto-circuito (CCC) de no mínimo quatro animais. O painel inserido mostra o efeito de toxina da cólera no transporte eletrogênico intestinal.

Curva dose-resposta cumulativa da glutamina no intestino pré-tratado com toxina da cólera

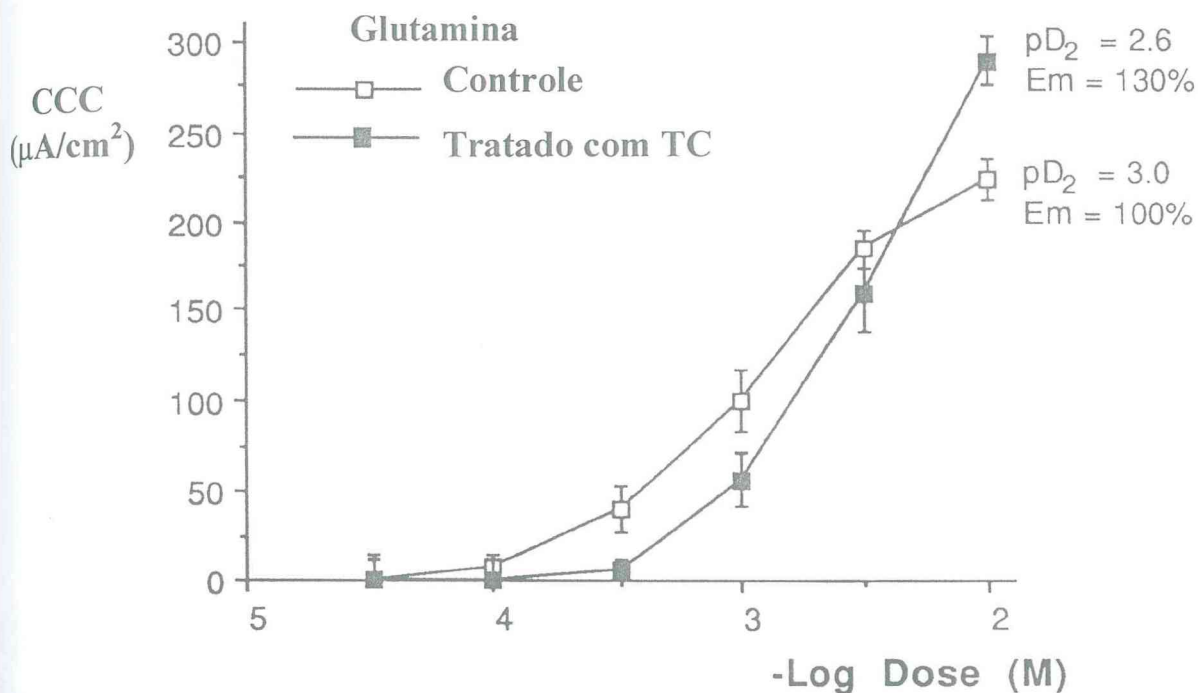


Figura 21 – Efeito de glutamina (10^{-4} – 10^{-2} M) no transporte de sódio em intestino pré-tratado com toxina da cólera (TC). Os dados representam a média \pm erro padrão do aumento da corrente de curto-circuito (CCC) de no mínimo quatro animais. E_{max} = efeito máximo; e pD_2 = menos o logarítmico da concentração que induz o efeito de 50%.

Curva dose-resposta cumulativa da alanina no intestino pré-tratado com toxina da cólera

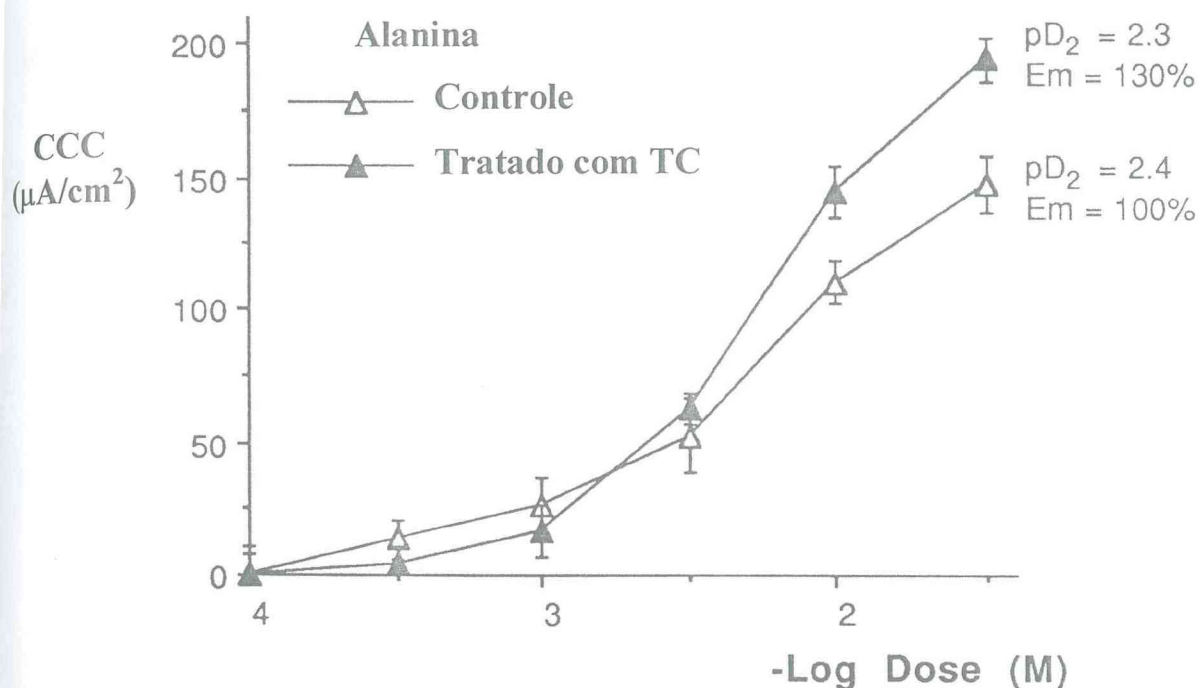


Figura 22 – Efeito de alanina (10^{-4} – 10^{-1} M) no transporte de sódio em intestino pré-tratado com toxina da cólera (TC). Os dados representam a média \pm erro padrão do aumento da corrente de curto-circuito (CCC) de no mínimo quatro animais. E_{max} = efeito máximo; e pD_2 = menos o logarítmico da concentração que induz o efeito de 50%.

Curva dose-resposta cumulativa da glicose no intestino pré-tratado com toxina da cólera

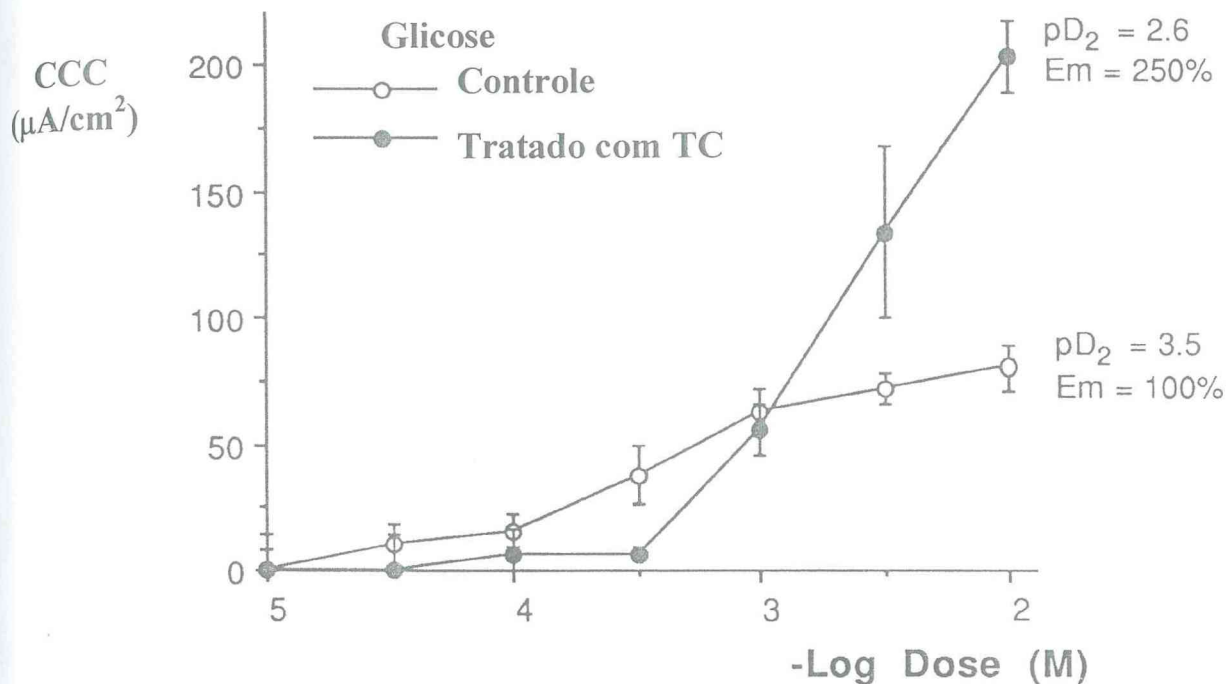


Figura 23 – Efeito de glicose ($10^{-5} - 10^{-2}$ M) no transporte de sódio em intestino pré-tratado com toxina da cólera (TC). Os dados representam a média \pm erro padrão do aumento da corrente de curto-circuito (CCC) de no mínimo quatro animais. E_{max} = efeito máximo; e pD_2 = menos o logarítmico da concentração que induz o efeito de 50%.

Efeito de glicosilaminoácidos e peptídeos no transporte eletrogênico intestinal

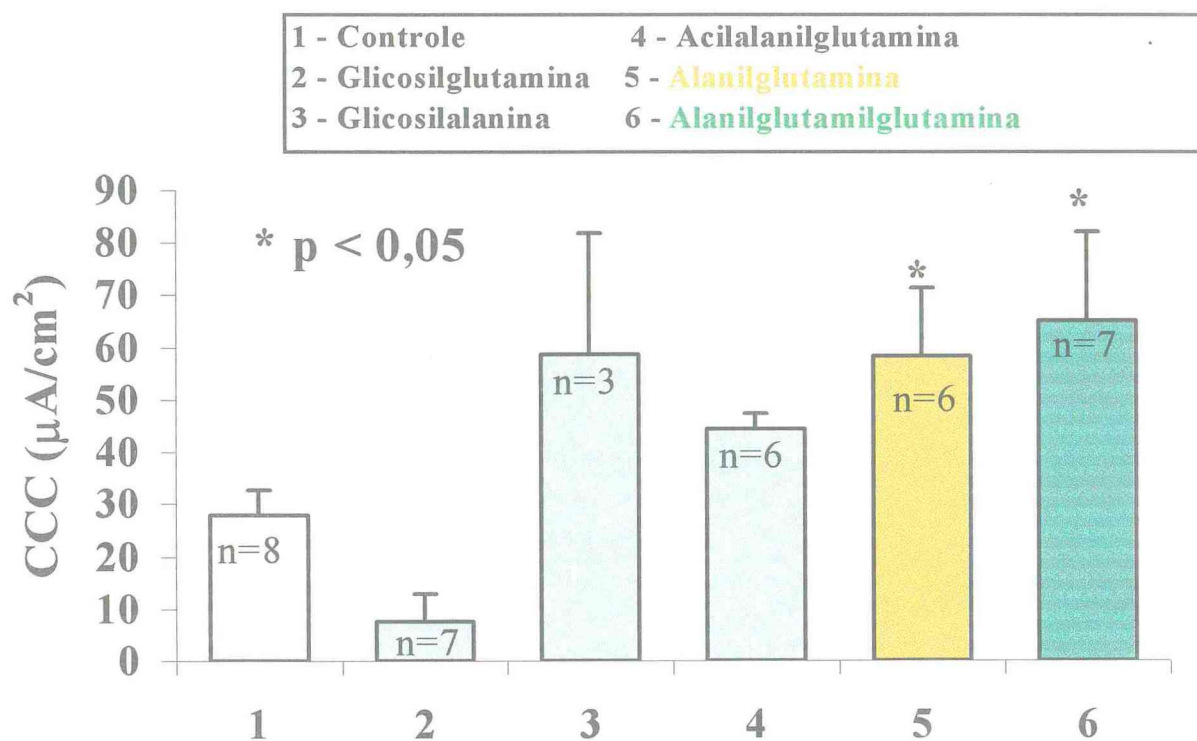


Figura 24 – Efeito de glicosilaminoácidos e peptídeos (10^{-3} – 10^{-2} M) no transporte eletrogênico intestinal *in vitro*. Os dados representam a média \pm erro padrão do aumento da corrente de curto-circuito (CCC) de no mínimo quatro animais. A análise dos dados mostrou aumento significativo em comparação com o controle somente para os grupos alanilglutamina e alanil-glutamil-glutamina.

4.5 Eficácia *In Vivo* da Solução de Reidratação Oral à Base de Glutamina na Absorção de Eletrólitos e Água

Grupos de cinco coelhos cada um foram utilizados no modelo de perfusão intestinal *in vivo* para testar a eficácia das seguintes soluções de reidratações orais: (a) solução modificada de Ringer (SR); (b) solução de reidratação oral recomendada pela OMS (SRO-OMS); e (c) solução de reidratação oral à base de glutamina (SRO-Gln). A composição das soluções utilizadas são mostradas na **Tabela 4**. A osmolalidade da SR, SRO-OMS e SRO-Gln foram de 303 ± 62 , 274 ± 4 , e 279 ± 16 mOsmol/kg (média \pm erro padrão), respectivamente, e as mesmas não apresentaram diferenças significativas ($p > 0,05$; teste *t* de Student).

Tabela 4. Composição química da solução de Ringer modificada (SR), solução de reidratação oral recomendada pela Organização Mundial de Saúde (SRO-OMS), e solução de reidratação à base de glutamina (SRO-Gln).

Composição ^a	SR (g/L)	SRO-OMS (g/L)	SRO-Gln (g/L)
NaCl	6,50	3,5	3,5
Glicose	2,00	20,0	-
Glutamina	-	-	16,2
Citrato de Na ⁺	-	2,9	2,9
KCl	0,14	1,5	1,5
CaCl ₂	0,12	-	-
NaHCO ₃	0,20	-	-
NaH ₂ PO ₄	0,01	-	-

^a A osmolalidade da SR, SRO-OMS e SRO-Gln foram 303 ± 62 , 274 ± 4 , e 279 ± 16 mOsmol/kg (média \pm erro padrão), respectivamente, e estas não apresentaram diferenças significativas ($p > 0,05$; teste t de Student).

Para testar o efeito da SRO-Gln em um modelo de diarreia secretória,

utilizamos a perfusão intestinal *in vivo* estimulada com a toxina da cólera (TC). A TC (1,0 $\mu\text{g/ml}$) + SR, perfundida durante trinta minutos antes do período de estudo, causa uma intensa secreção de sódio (controle = $4,29 \pm 2,19 \mu\text{Eq/g/min}$ vs. CT = $-14,34 \pm 2,18 \mu\text{Eq/g/min}$; $p < 0,05$) em animais perfundidos com SR (**Figura 25**). Em adição, essa toxina também causa secreção significativa de água quando comparada com animais-controles ($0,04 \pm 0,01$ vs. $-0,15 \pm 0,02 \text{ ml/g/min}$; $p < 0,05$). O tempo para início do efeito na secreção de água e sódio foi de 30 (**Figura 25**) e 60 minutos, respectivamente, atingindo seus efeitos máximos aos 180 minutos de perfusão.

As **Figuras 26 e 27** mostram os efeitos da SRO-OMS e SRO-Gln no transporte de sódio e água, quando comparados com a SR e/ou no intestino pré-tratado com TC. A SRO-OMS reduz significativamente a secreção de sódio ($-14,34 \pm 2,18$ vs. $-0,50 \pm 0,48 \mu\text{Eq/g/min}$; $p < 0,05$). Da mesma forma, essa solução diminui a secreção de água ($-0,15 \pm 0,02$ vs. $-0,01 \pm 0,01 \text{ ml/g/min}$; $p < 0,05$). Por outro lado, a SRO-Gln teve uma eficácia melhor do que a SRO-OMS e SR na redução do transporte de sódio intestinal, o qual foi reduzido para $10,31 \pm 1,21 \mu\text{Eq/g/min}$ ($p < 0,05$), com um efeito significante também na absorção de água ($0,076 \pm 0,008 \text{ ml/g/min}$; $p < 0,01$). Em adição, o efeito da TC na secreção de

Secreção intestinal de água e sódio induzido pela toxina da cólera no intestino de coelho *in vivo*

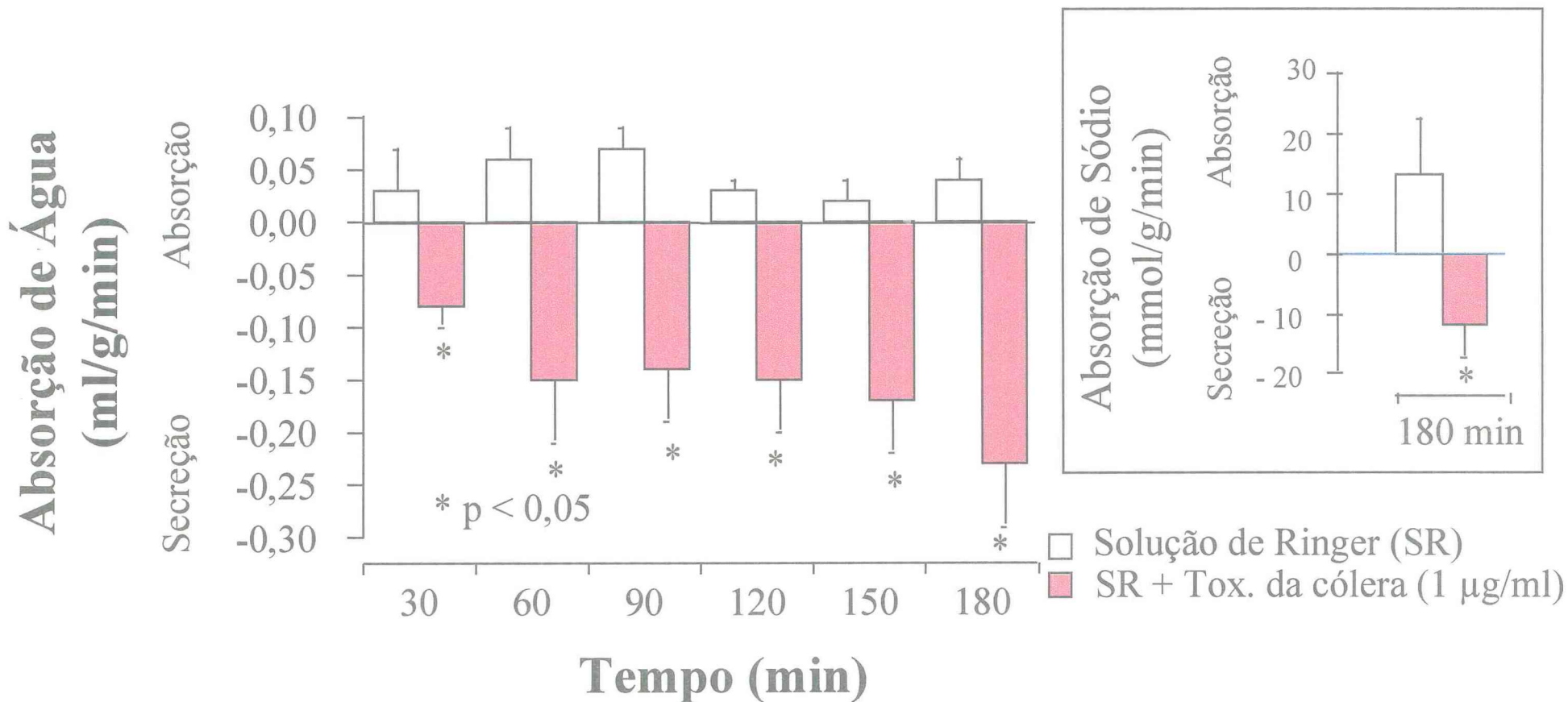


Figura 25 - Secreção de água e sódio induzido pela toxina da cólera na perfusão intestinal do íleo de coelhos. A toxina da cólera causa aumento significativo de secreção de água com início aos 30 minutos e com efeito máximo aos 180 minutos de perfusão.

Efeito na absorção de água da solução de reidratação oral padrão e da solução com glutamina na diarréia secretória induzida pela toxina da cólera

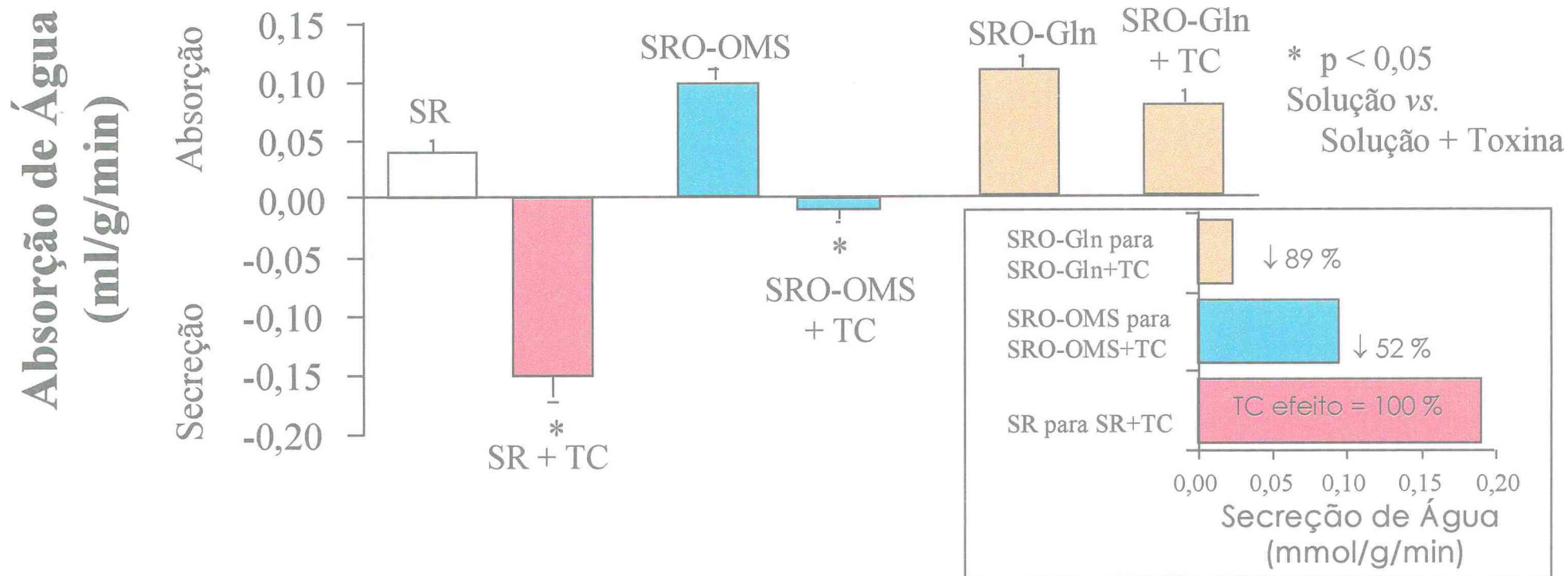


Figura 26 - Efeito no transporte de água da solução de reidratação recomendada pela Organização Mundial de Saúde (SRO-OMS) e solução com glutamina (SRO-Gln) na diarréia secretória induzida pela toxina da cólera (TC). O painel inserido mostra os percentuais de reduções na secreção de água das duas soluções em relação à solução de Ringer (SR).

Efeito na absorção de sódio da solução de reidratação oral padrão e da solução com glutamina na diarreia secretória induzida pela toxina da cólera

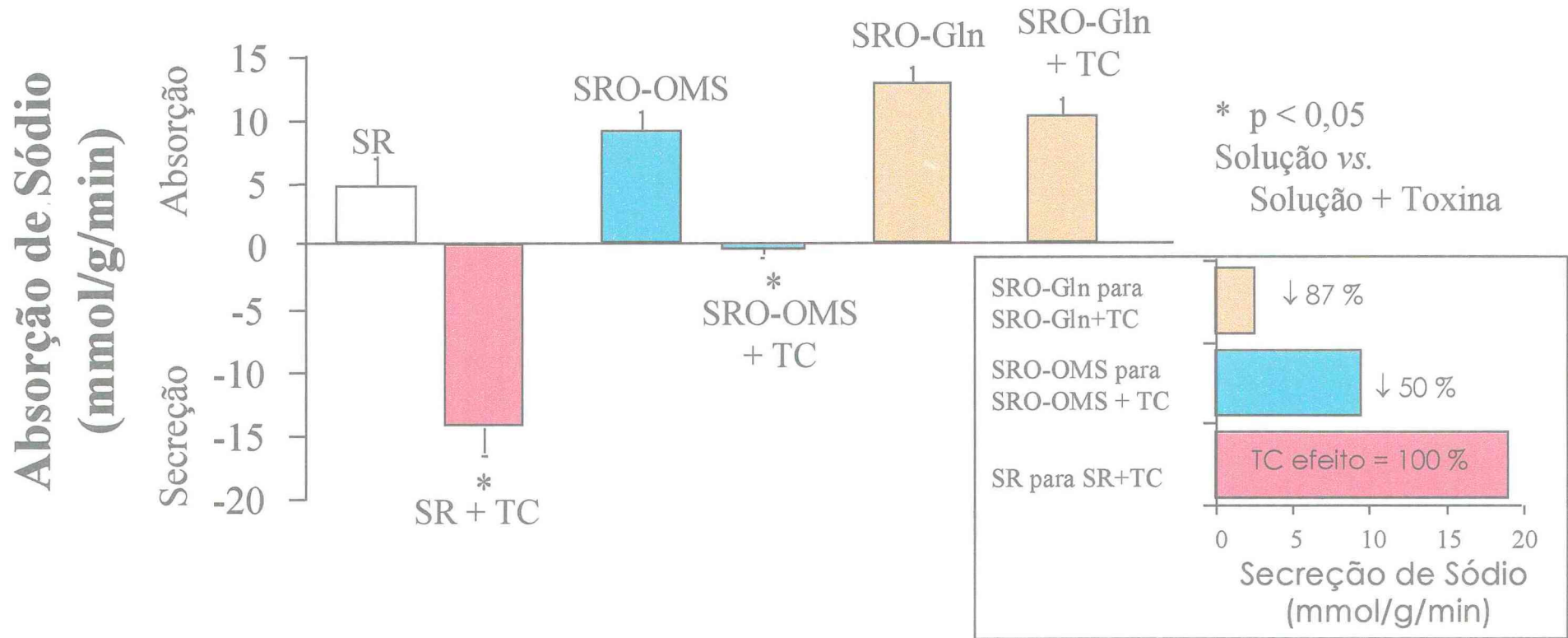


Figura 27 - Efeito no transporte de sódio da solução de reidratação recomendada pela Organização Mundial de Saúde (SRO-OMS) e solução com glutamina (SRO-Gln) na diarreia secretória induzida pela toxina da cólera (TC). O painel inserido mostra os percentuais de reduções na secreção de sódio das duas soluções em relação à solução de Ringer (SR).

sódio e água foi abolido quando os animais foram perfundidos com a SRO-Gln ($12,9 \pm 1,093 \mu\text{Eq}$ de $\text{Na}^+/\text{g}/\text{min}$ e $0,107 \pm 0,011 \text{ ml}$ de $\text{H}_2\text{O}/\text{g}/\text{min}$; $p < 0,05$).

Os dados na **Tabela 5** mostram os efeitos da SR, SRO-OMS e SRO-Gln no transporte de cloro e potássio, bem como na osmolalidade e pH luminal, no intestino controle ou pré-tratado com TC. A SRO-OMS aumenta a absorção de cloro ($10,13 \pm 1,51 \mu\text{Eq}/\text{g}/\text{min}$; $p < 0,05$) e diminui, mas não suprime, a secreção do cloro induzido pela TC ($-0,86 \pm 1,11 \mu\text{Eq}/\text{g}/\text{min}$; $p < 0,05$). A absorção de cloro é também aumentada com a perfusão da SRO-Gln ($16,90 \pm 2,05 \mu\text{Eq}/\text{g}/\text{min}$; $p < 0,05$), em relação ao SR, e ao contrário da SRO-OMS, essa solução completamente suprime a secreção de cloro induzido pela TC ($9,68 \pm 1,24 \mu\text{Eq}/\text{g}/\text{min}$; $p < 0,05$).

A SRO-OMS ($3,4 \pm 0,2 \mu\text{Eq}/\text{g}/\text{min}$; $p < 0,05$) e a SRO-Gln ($2,9 \pm \mu\text{Eq}/\text{g}/\text{min}$; $p < 0,05$) causam aumento significativo no transporte de potássio, quando em comparação com a SR ($0,4 \pm 0,1 \mu\text{Eq}/\text{g}/\text{min}$; $p < 0,05$). Entretanto, a SRO-Gln foi mais eficaz do que a SRO-OMS para reduzir o efeito de secreção de potássio induzido pela TC (**Tabela 5**).

A TC diminui significativamente a osmolalidade do fluido intestinal ($\Delta\text{Osm}_{\text{controle}} = 22,34 \pm 3,340$ vs. $\Delta\text{Osm}_{\text{TC}} = -21,74 \pm 2,270 \mu\text{Osm}/\text{g}/\text{min}$;

$p < 0,05$). Esse efeito é reduzido quando da perfusão utilizando a SRO-OMS ou SRO-Gln (**Tabela 5**). Apesar de a TC alterar o pH luminal ($7,55 \pm 0,05$ para $7,36 \pm 0,02$; $p < 0,05$), esse efeito foi abolido com a perfusão da SRO-OMS ou SRO-Gln (**Tabela 5**).

A histopalologia dos tecidos corados com hematoxilina-eosina, nos segmentos intestinais perfundidos com SR, SRO-OMS e SRO-Gln, pré-tratados ou não com a TC, não mostrou diferenças significativas (dados não mostrados).

4.6 Eficácia *In Vivo* das Soluções de Reidratações Oraís à Base de Alanil-Glutamina e Alanil-Glutamil-Glutamina na Absorção de Eletrólitos e Água

Em virtude da pequena quantidade disponível do substrato recentemente sintetizado e patenteado, desenvolvemos o modelo de perfusão intestinal *in vivo* para ratos, no sentido de diminuir a quantidade de substratos utilizados no perfusato. Mesmo assim, tivemos de testar os substratos Gln, Ala-Gln, Ala-Ala e Ala-Gln-Gln, na concentração de 1,11 mM. Essa concentração foi cem vezes menor do que a concentração de substratos normalmente recomendada para as soluções de reidratações orais. A **Tabela 6** mostra a composição das soluções utilizadas nesses experimentos. Como mostrado na **Tabela 7**, a solução contendo Ala-Gln-

Tabela 5 - Efeito da solução de Ringer modificada (SR), solução de reidratação oral recomendada pela Organização Mundial de Saúde (SRO-OMS) e solução de reidratação oral à base de glutamina (SRO-Gln) no transporte de cloro, potássio, osmolalidade e pH, utilizando o modelo de diarreia secretória induzido pela toxina da cólera (TC) *

Soluções	Cloro ($\mu\text{Eq/g/min}$)	Potássio ($\mu\text{Eq/g/min}$)	Osmolalidade ($\mu\text{Osm/g/min}$)	pH
SR				
Controle	$-24,720 \pm 4,570^a$	$0,390 \pm 0,070^a$	$22,340 \pm 3,340^a$	$7,55 \pm 0,05^a$
Toxina	$-6,040 \pm 2,590^a$	$-0,370 \pm 0,140^{b,c}$	$-21,740 \pm 2,270^{b,c}$	$7,36 \pm 0,02^b$
SRO-OMS				
Controle	$10,130 \pm 1,510^a$	$2,850 \pm 0,220^a$	$20,940 \pm 3,970^a$	$7,48 \pm 0,03$
Toxina	$-0,860 \pm 1,110^d$	$0,860 \pm 0,130^{b,d}$	$-0,800 \pm 1,440^{b,d}$	$7,59 \pm 0,03^b$
SRO-Gln				
Controle	$16,900 \pm 2,050$	$3,400 \pm 0,200$	$23,210 \pm 8,140$	$7,43 \pm 0,02$
Toxina	$9,680 \pm 1,240^{c,d}$	$2,920 \pm 0,150^{c,d}$	$22,780 \pm 2,500^{c,d}$	$7,47 \pm 0,03$

* Os dados representam a média \pm erro padrão de cinco animais e durante os 180 minutos de perfusão. Os valores negativos são considerados como balanço secretório e valores positivos são considerados balanço de absorção.

Os seguintes valores foram significativos para $p < 0,05$: ^a solução sem toxina vs. aquela com toxina; ^b SR mais TC vs. SRO-OMS com TC; ^c SR mais TC vs. SRO-Gln com TC; ^d SRO-OMS com TC vs. SRO-Gln com TC.

Tabela 6. Composição química da solução de Ringer (SR), solução glutamina (SRO-Gln), solução com alanil-glutamina (Ala-Gln), solução com alanil-alanina (Ala-Ala) e solução com alanil-glutamil-glutamina (AGG).

Composição ^a	SR	SRO-Gln	Ala-Gln	Ala-Ala	AGG
	(g/L)	(g/L)	(g/L)	(g/L)	(g/L)
NaCl	6,50	3,5	3,5	3,5	3,5
Glutamina	-	0,162	-	-	-
Ala-Gln	-	-	0,241	-	-
Ala-Ala	-	-	-	0,177	-
Ala-Gln-Gln	-	-	-	-	0,423
Citrato de Na ⁺	-	2,9	2,9	2,9	2,9
KCl	0,14	1,5	1,5	1,5	1,5
CaCl ₂	0,12	-	-	-	-
NaHCO ₃	0,20	-	-	-	-
NaH ₂ PO ₄	0,01	-	-	-	-

^a As osmolalidades das soluções de SR, SRO-Gln, Ala-Gln, Ala-Ala e Ala-Gln-Gln foram $188 \pm 37,46$, $184 \pm 14,98$, $175 \pm 10,84$, $177 \pm 29,47$ e $187 \pm 23,85$ mOsmol/kg (média \pm erro padrão; $n \geq 8$), respectivamente; estas tiveram concentrações iguais de substratos (1,11 mMol/L) e não apresentaram diferenças significativas ($p > 0,05$; ANOVA).

Tabela 7 – Efeitos de glutamina (Gln), alanil-glutamina (Ala-Gln), alanil-alanina (Ala-Ala) e alanil-glutamil-glutamina (Ala-Gln-Gln) na absorção intestinal de eletrólitos e água.

	Absorção H ₂ O	Sódio	Cloro	Potássio
Soluções	μl/g/min	μEq/g/min	μEq/g/min	μEq/g/min
Ringer	40 ± 5	3,7 ± 0,6	2,9 ± 0,6	-0,2 ± 0,02
Gln	70 ± 5	4,1 ± 0,5	5,2 ± 0,6 *	1,4 ± 0,10
Ala-Gln	30 ± 3	2,0 ± 0,4	2,4 ± 0,3	0,7 ± 0,06
Ala-Ala	50 ± 2	5,7 ± 0,3 *	2,8 ± 0,3	1,9 ± 0,06 *
Ala-Gln-Gln	90 ± 10 *	2,8 ± 0,7	2,3 ± 0,7	2,0 ± 0,3 *

* Valores significativos $p < 0,05$ em relação à solução de Ringer controle (ANOVA, teste de Fisher). Os dados são apresentados em média ± erro padrão de no mínimo 4 diferentes experimentos.

Gln induziu maior absorção de água. A solução com Ala-Ala induziu maior absorção de sódio. As soluções contendo Ala-Gln-Gln ou Ala-Ala induziram maior absorção de potássio. Por outro lado, a solução com Gln induziu maior absorção de cloro.

No sentido de desenvolver o modelo de diarreia secretória em ratos, avaliamos as curvas dose e tempo-efeitos da toxina da cólera nessa espécie.

As **Figuras 28 e 29** mostram as curvas-doses e tempo-efeito da TC no modelo de alça intestinal ligado de rato. A TC apresenta um efeito secretório significativo somente após 10 horas e na dose de 1,0 $\mu\text{g/ml}$ (139 ± 29 vs. $17,2 \pm 8,6$ $\mu\text{l/cm}$; $p < 0,05$). O tempo e dose para o efeito máximo foi de 18 horas e com a dose de 1,0 $\mu\text{g/ml}$ (187 ± 25 vs. $17,2 \pm 8,6$ $\mu\text{l/cm}$; $p < 0,05$). Com base nesses resultados, decidimos pré-tratar os animais com TC (1 $\mu\text{g/ml}$), durante 18 horas antes do início dos experimentos de perfusão intestinal *in vivo* para testar as seguintes soluções: (a) solução de Ringer; (b) solução SRO-OMS; (c) solução SRO-Gln; e (d) solução SRO-AlaGln. A composição das soluções foi a mesma há pouco mencionada, diferente somente na concentração de 111 mM para os substratos Gli, Gln e Ala-Gln, utilizados nesse protocolo experimental. A solução de reidratação com o composto Ala-Gln-Gln não foi testada porque a quantidade necessária foi insuficiente.

A **Tabela 8** resume os resultados obtidos nesse estudo. A Ala-Gln e Gli mostraram eficácia semelhante no modelo de diarreia secretória induzida pela TC. A solução contendo Gln mostrou-se mais eficaz do que Ala-Gln ou Gli em reduzir a secreção de eletrólitos e água induzidos pela TC.

Curva dose-efeito da toxina da cólera em alça intestinal isolada de rato

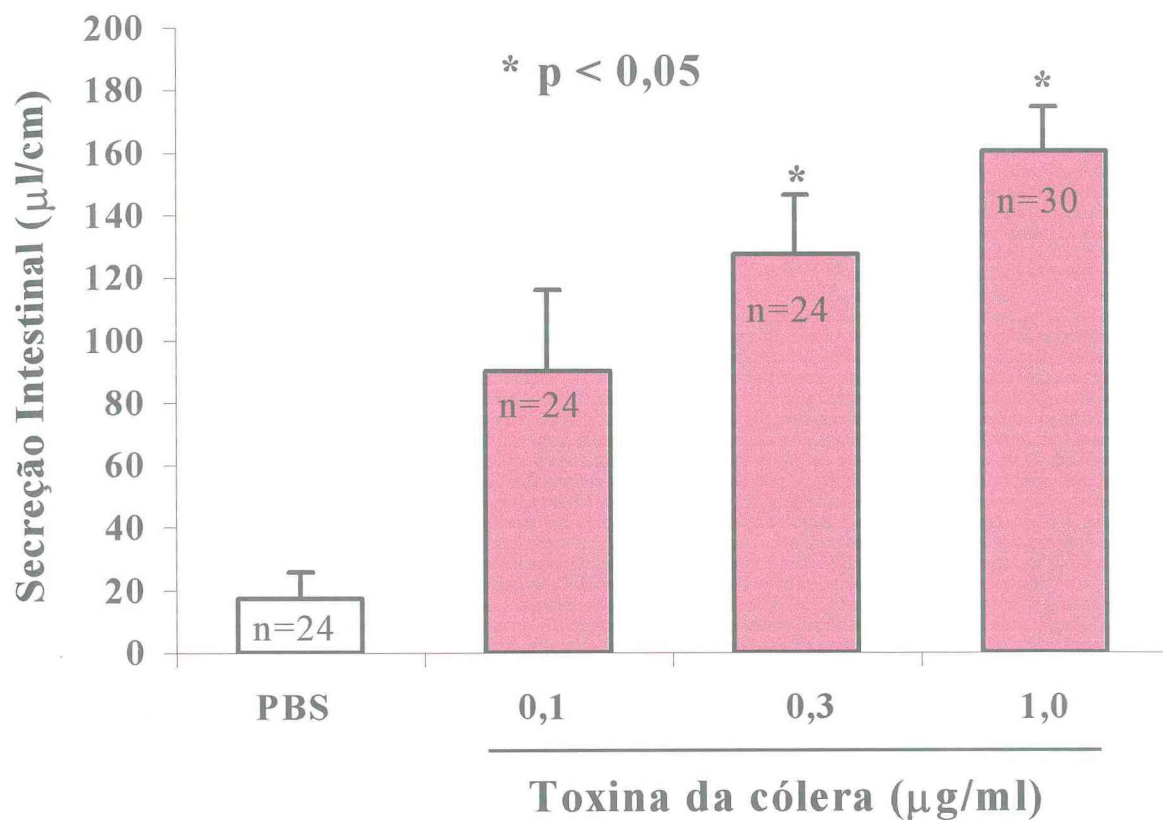


Figura 28 – Curva dose-efeito da toxina da cólera em alça intestinal isolada de rato. Os dados representam a média \pm erro padrão e no tempo de incubação de 6-18 horas. A secreção foi significativa nas doses de 0,3 e 1,0 $\mu\text{g/ml}$.

Curva tempo-efeito da toxina da cólera em alça intestinal isolada de rato

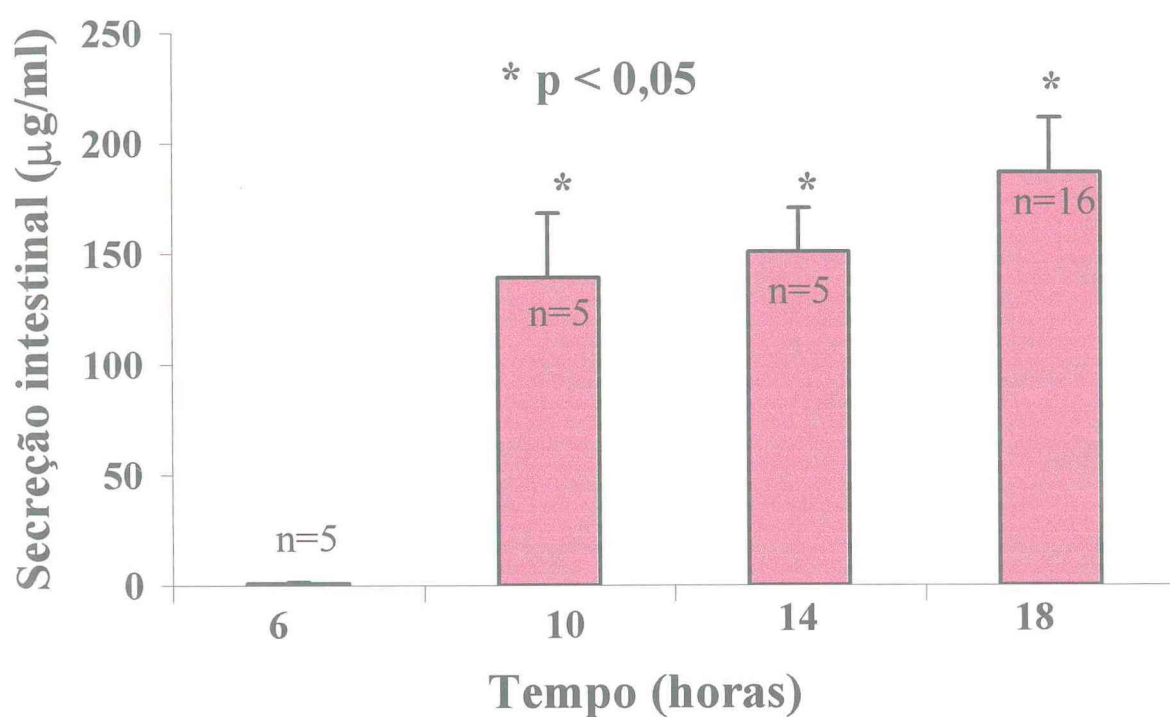


Figura 29 – Curva tempo-efeito da toxina da cólera (1 µg/ml) em alça intestinal isolada de rato. Os dados representam a média \pm erro padrão e nos tempos de 6, 10, 14 e 18 horas. A secreção foi significativa nos tempos de 10, 14 e 18 horas de incubação.

Tabela 8 – Efeitos das soluções de Ringer, glicose (Gli), glutamina (Gln) e alanil-glutamina (Ala-Gln) na absorção intestinal de eletrólitos e água, no modelo de diarreia secretória induzida pela toxina da cólera.

Soluções	Absorção H ₂ O	Sódio	Cloro	Potássio
	μl/g/min	μEq/g/min	μEq/g/min	μEq/g/min
Ringer	11 ± 7	-2,1 ± 0,8	0,2 ± 0,7	-0,9 ± 0,20
Gli	-9 ± 4	-2,1 ± 0,4	-0,7 ± 0,3	0,4 ± 0,04
Gln	45 ± 4 *	2,1 ± 0,4 *	2,2 ± 0,3 *	1,0 ± 0,08 *
Ala-Gln	-28 ± 10	-2,5 ± 1,2	-2,2 ± 0,1	0,4 ± 0,4

* Valores significativos $p < 0,05$ em relação à solução de Ringer controle (ANOVA, teste de Scheffé). Os dados são apresentados em média ± erro padrão de no mínimo 4 diferentes experimentos. Os substratos nessas soluções tinham a concentração de 111 mMol/L.

4.7 Sensibilidade e Acurácia do Método de Cromatografia Líquida de Alta Resolução para Medidas de Monossacarídeos e Dissacarídeos

O fato de o manitol e a lactulose pertencerem a duas classes diferentes de açúcares, como monoaçúcar álcool e dissacarídeo, respectivamente, explica

o porquê da dificuldade do desenvolvimento de métodos adequados para separação e dosagens utilizando enzimas de degradação. Neste método, usamos a coluna de cromatografia CarboPac-MA1, cuja resina é empacotada em coluna não-metálica, ideal para determinação e análise de açúcares fracamente ionizados em eluente com alta concentração de hidróxido de sódio. A reprodutibilidade de separação dos vários açúcares é mostrada na **Tabela 9**. Para determinar a variação intra-experimento, quatro amostras de açúcares de um mesmo tubo de ensaio, contendo 5000 picomoles em 50 µl, foram injetadas no HPLC para medida das quantidades recuperadas e cálculos dos tempos de retenções (**Tabelas 9 e 10**). O desvio-padrão das amostras recuperadas foi menor do que 1,9%, enquanto a variação nos tempos de retenções foi menor do que 1,2%. Na determinação da variação intra-experimentos, utilizamos a injeção de quatro amostras independentes de oito açúcares, contendo 5000 picomoles em 50 µl. Um cromatograma das amostras dos açúcares-padrões é mostrado na **Figura 30**, onde são observados os tempos e picos de retenção. A variação dos desvios padrões observados na recuperação das amostras foi, em média, 9,8%, e a variação

Tabela 9 – Determinação por cromatografia líquida de alta resolução com detecção amperométrica (HPLC-PAD) da variação intra-experimental e percentual de recuperação das amostras de açúcares-padrões.

Açúcares	Média *	Desvio	% Variação	% Recuperação
	(n = 4)	Padrão		
Inositol	4544	49	1,1	90,9
Glucosamina	4911	79	1,6	98,2
Sorbitol	4843	74	1,5	96,9
Manitol	5075	91	1,8	101,5
Melibiose	4922	78	1,6	98,4
Glicose	4888	62	1,3	97,8
Lactulose	4870	69	1,4	97,4
Lactose	4846	27	0,6	96,9
Média	4862	36	1,4	97,2

* Concentrações das amostras em picomoles por 50 µl. Os padrões de açúcares utilizados tinham 5000 picomoles por 50 µl.

Tabela 10 – Determinação da variação intra-experimental dos tempos de retenções dos açúcares-padrões medidos por cromatografia líquida de alta pressão com detecção amperométrica (HPLC-PAD).

Açúcares	Média *	Desvio	% Variação
	(n = 4)	Padrão	
Inositol	6,85	0,07	1,0
Glucosamina	13,73	0,11	0,8
Sorbitol	14,56	0,14	1,0
Manitol	17,29	0,16	0,9
Melibiose	21,10	0,22	1,1
Glicose	22,07	0,19	0,9
Lactulose	25,42	0,26	1,0
Lactose	28,12	0,28	1,0
Média	18,64	0,179	0,96

* Tempos de retenção em minutos.

nos tempos de retenções foi inferior a 2% (**Tabelas 11 e 12**).

A variação linear das quantidades detectadas em relação às concentrações (1,0, 0,3, 0,1, 0,03, 0,01 mM) dos padrões de açúcares utilizados foi avaliada usando os coeficientes de correlações das curvas. Os resultados foram obtidos de quatro observações para cada concentração indicada. Os coeficientes de correlações foram: para o manitol, $r^2 = 1,0$; glicosamina, $r^2 = 0,994$; lactulose, $r^2 = 1,0$; melibiose, $r^2 = 0,998$; inositol, $r^2 = 0,996$; sorbitol, $r^2 = 0,999$; lactose, $r^2 = 0,999$; e glicose, $r^2 = 1,0$ (**Figura 31, A e B**). Os percentuais de recuperações dos açúcares nas amostras-padrões, na variação intra-experimento, variaram de 91-102% (**Tabela 9**) enquanto na variação inter-experimento, foi de 90-101% (**Tabela 11**).

Para avaliar as condições ideais de cromatografia, utilizamos três parâmetros: retenção (κ'), seletividade (α) e eficiência (N). Os valores de κ' para o manitol, melibiose e lactulose foram 2,53, 3,15, e 3,99, respectivamente (variação normal: $1 \leq \kappa' \leq 10$). Para seletividade, observamos os seguintes valores: melibiose/manitol, 1,24; lactulose/melibiose, 1,27; e lactulose/manitol, 1,58 (variação normal: $\alpha > 1$).

Cromatograma das amostras de açúcares-padrões

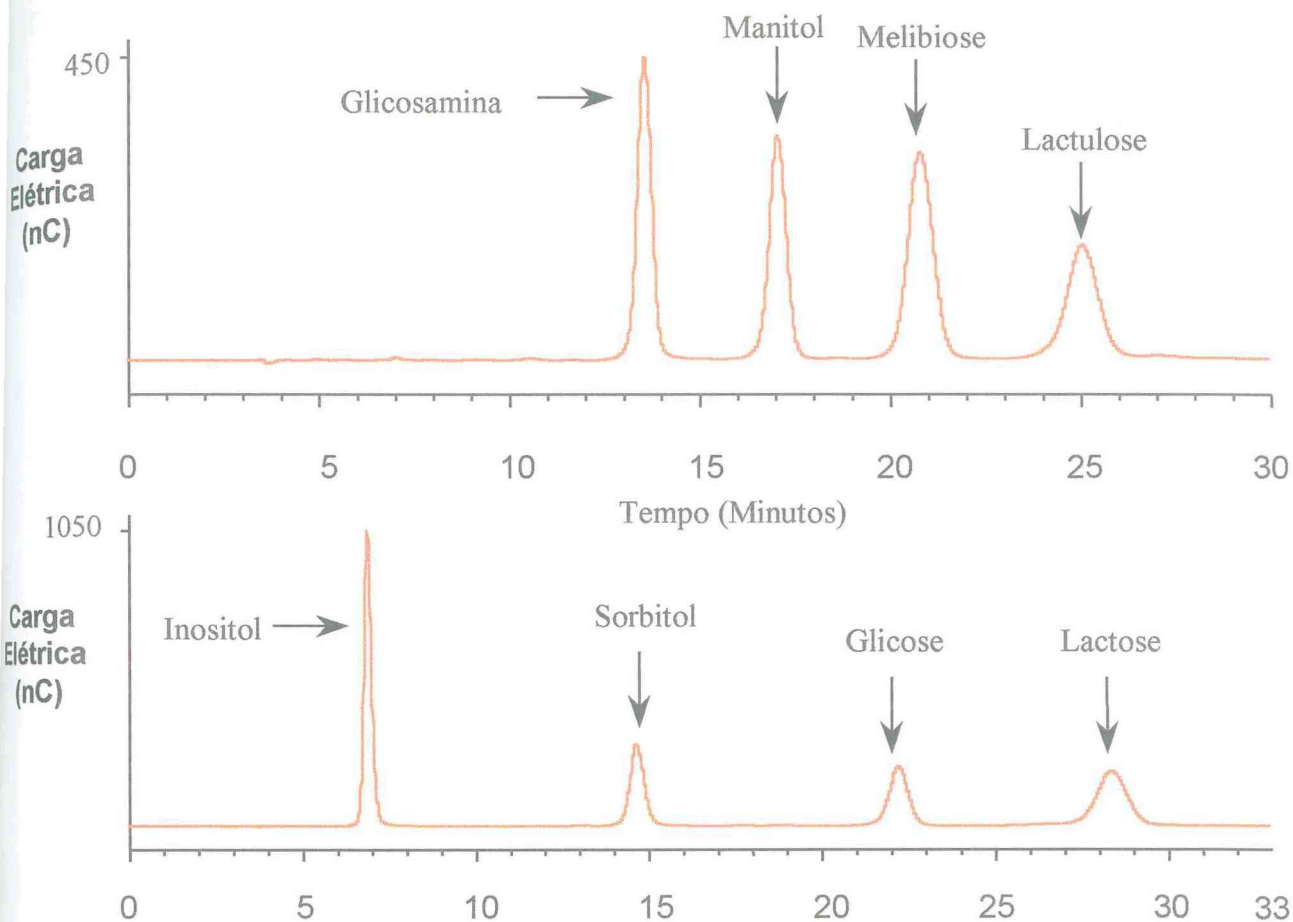


Figura 30 - Cromatograma das amostras dos açúcares-padrões mostrando seus tempos e picos de retenção. A lactulose e manitol apresentam picos bem definidos e separados, permitindo excelente medida e padronização deste método para utilização no teste de permeabilidade intestinal.

Curvas das Concentrações dos Açúcares-Padrões

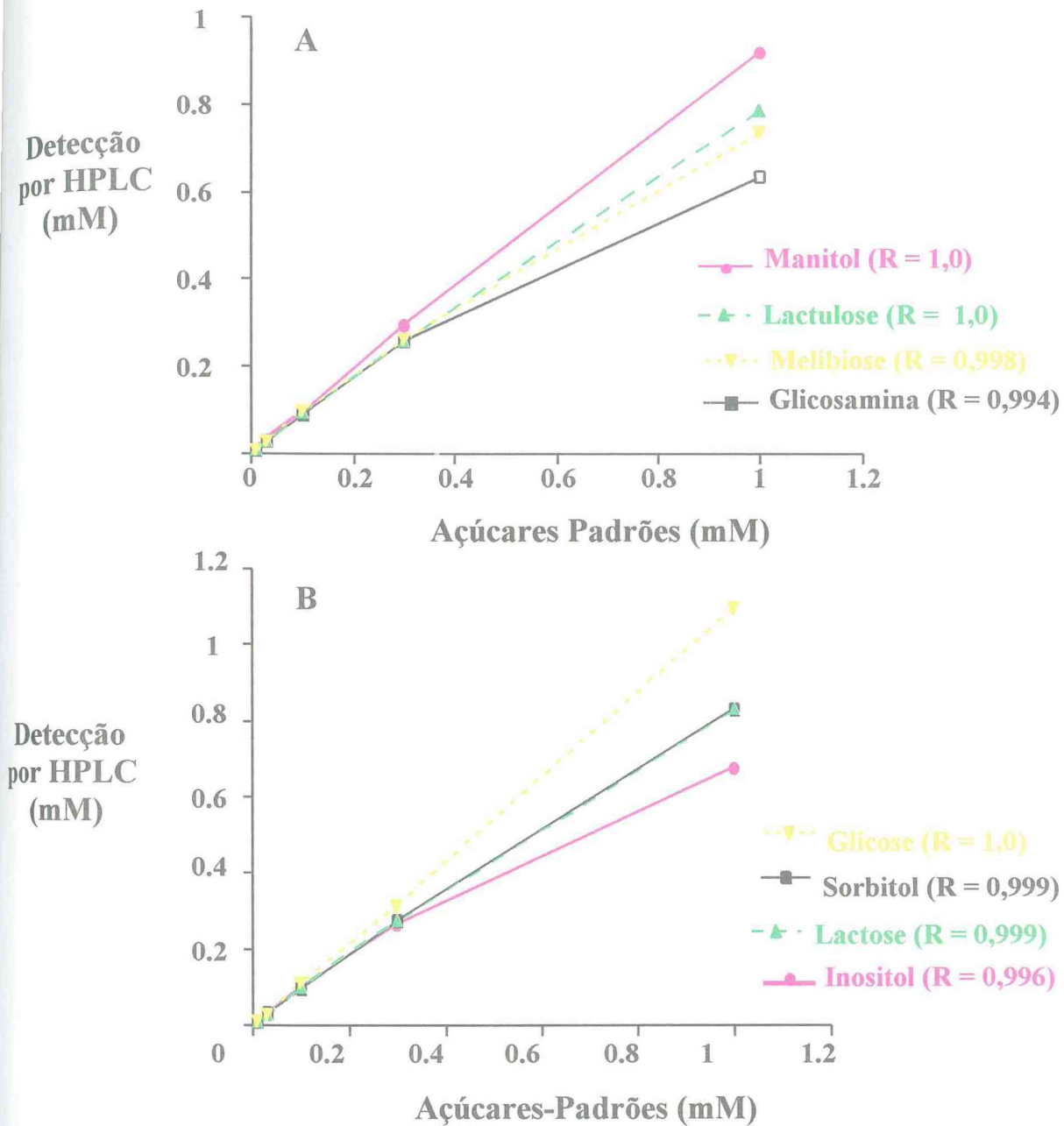


Figura 31 – O painel A mostra as curvas e os índices de correlações dos açúcares manitol, lactulose, melibiose e glicosamina. O painel B mostra as curvas e os índices de correlações dos açúcares glicose, sorbitol, lactose e inositol.

Tabela 11 – Determinação por cromatografia líquida de alta pressão com detecção amperométrica (HPLC-PAD) da variação inter-experimental e percentual de recuperação das amostras de açúcares-padrões.

Açúcares	Média *	Desvio		% Recuperação
	(n = 4)	Padrão	% Variação	
Inositol	4976	246,33	5,0	90,9
Glucosamina	4488	679,42	15,1	98,2
Sorbitol	4953	195,30	3,9	96,9
Manitol	4810	425,61	8,8	101,5
Melibiose	4859	484,18	10,0	98,4
Glicose	5460	1196,59	21,9	97,8
Lactulose	4771	234,24	4,9	97,4
Lactose	5050	442,67	8,8	96,9
Média	4919	258	9,8	97,3

* Concentrações das amostras em picomoles por 50 µl. Os padrões de açúcares utilizados tinham 5000 picomoles por 50 µl.

Tabela 12 – Determinação da variação inter-experimental dos tempos de retenções dos açúcares-padrões medidos por cromatografia líquida de alta pressão com detecção amperométrica (HPLC-PAD).

Açúcares	Média *	Desvio	% Variação
	(n = 4)	Padrão	
Inositol	6,74	0,02	0,3
Glucosamina	13,46	0,12	0,9
Sorbitol	14,09	0,06	0,5
Manitol	17,06	0,04	0,2
Melibiose	20,40	0,33	1,6
Glicose	21,26	0,22	1,0
Lactulose	24,49	0,45	1,9
Lactose	26,70	0,31	1,2
Média	18,03	0,19	0,95

* Tempos de retenção em minutos.

A eficiência em número de pratos foi de 4395, 3642 e 3165 para o manitol, melibiose e lactulose, respectivamente.

4.8 Validação do Teste Diferencial com Duplos Açúcares, Lactulose e Manitol, em Voluntários Sadios e Pacientes com Diarréia

Doenças diarréicas endêmicas ou a invasão pelo vírus HIV na mucosa intestinal provocam dano significativo na área de absorção, integridade e permeabilidade do epitélio intestinal. A membrana mucosa do trato gastrointestinal é o alvo para inúmeros agentes patogênicos, como bactérias, protozoários e vírus, incluindo o vírus HIV, tornando-se assim evidentes suas manifestações clínicas. A diarréia normalmente é o sintoma comum. Entretanto, a medida da área de absorção, integridade e permeabilidade intestinal nessas doenças, bem como os mecanismos envolvidos, são ainda pouco conhecidos. O desenvolvimento de um método não-invasivo e diferencial utilizando dois açúcares, como lactulose e manitol, torna a avaliação dos danos causados por essas doenças um indicador capaz de refletir a progressão ou recuperação da doença.

A validação do método de cromatografia líquida para medida diferencial dos açúcares para o teste de permeabilidade intestinal foi avaliada em duas populações. No primeiro grupo, 30 crianças participantes

do estudo coorte na comunidade urbana Gonçalves Dias foram selecionadas para um estudo caso-controle, pareado por idade (mais ou menos três meses), as quais estavam com diarreia (n = 15 casos) e controles (n = 15) sem história de diarreia nas últimas duas semanas. No segundo grupo, voluntários adultos saudáveis (n = 13), pacientes HIV⁺ sem (n = 19) e com diarreia (n = 18) foram selecionados. O protocolo utilizado para o teste de permeabilidade foi descrito em Materiais e Métodos.

A **Figura 32** mostra um cromatograma típico de uma criança saudável e outra com diarreia. Pode-se observar que o pico de concentração do manitol foi mais elevado na criança sadia comparado com a criança com diarreia. Ao contrário, o pico de concentração da lactulose foi maior na criança com diarreia comparado com o controle sadio. Assim, crianças com menor área de absorção normalmente excretam menos manitol na urina. Por outro lado, crianças com lesão ou alteração da permeabilidade intestinal apresentam maior excreção de lactulose na urina.

Os dois grupos não apresentaram diferenças significativas quanto a idade (Controle = $21 \pm 17,2$ vs. Diarreia = $17 \pm 12,3$; n = 15 em cada grupo; $p > 0,05$) e sexo (Controle: 5 masc. / 10 fem. Vs. Casos: 9 masc. / 6 fem.; $p > 0,05$). Um dos pacientes no grupo com diarreia apresentou desidratação severa no primeiro dia antes do teste.

Cromatogramas de Crianças com e sem Diarréia

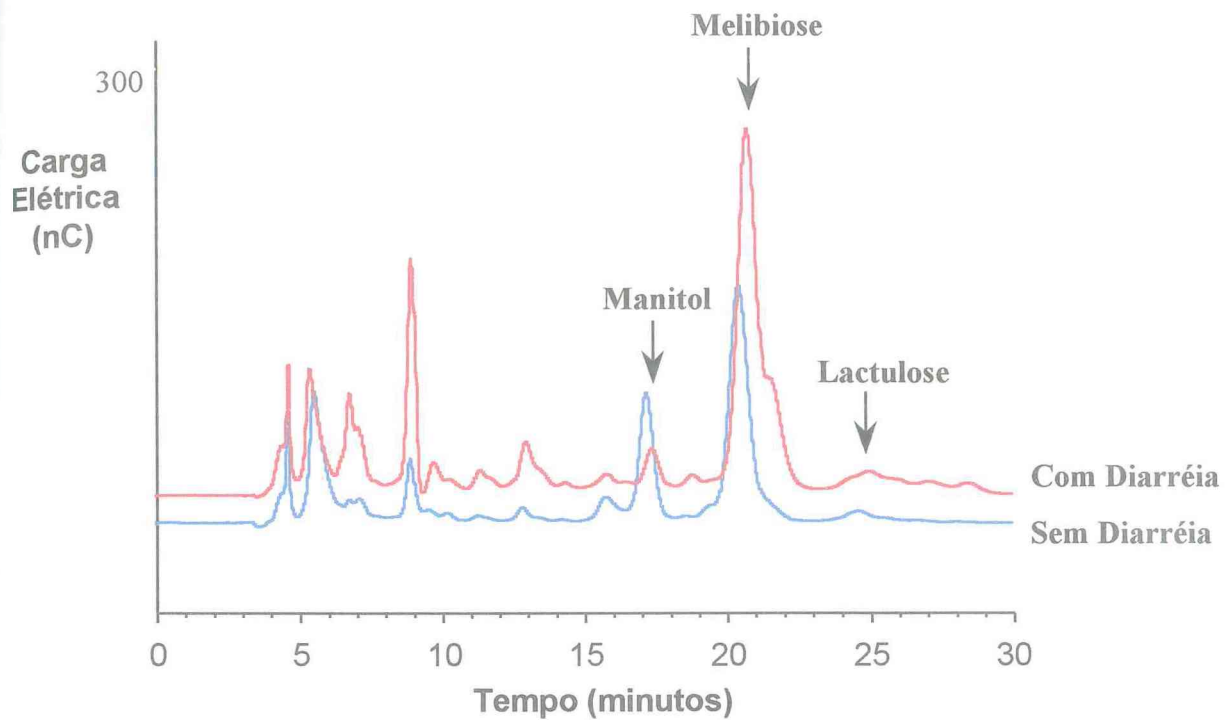


Figura 32 – Cromatograma de uma criança com e sem diarréia. O pico de manitol está maior na criança sem diarréia, enquanto o de lactulose é maior na criança com diarréia. A melibiose é utilizada como controle interno.

No grupo com diarreia, observamos aumento significativo no percentual de excreção de lactulose ($0,3229 \pm 0,07398\%$ vs. $0,1183 \pm 0,02208\%$; $n=15$ por grupo; $p = 0,018$) e na taxa lactulose/manitol ($0,1404 \pm 0,03113$ vs. $0,0394 \pm 0,00607$; $n=15$ por grupo; $p = 0,001$), em relação ao grupo controle (**Figura 33 e 34**). As taxas de excreções de manitol não apresentaram diferenças significativas ($2,6665 \pm 0,5412$ vs. $2,7192 \pm 0,3692$; $n=15$ por grupo; $p > 0,05$) (**Figura 35**).

A **Figura 36** caracteriza um cromatograma típico de um paciente HIV⁺ sem e com diarreia. Pode-se observar o maior pico de manitol nos pacientes HIV⁺ sem diarreia. O paciente com diarreia apresenta o menor pico de manitol, consistente com a diminuição na área de absorção. Em relação à excreção de lactulose, verifica-se o menor pico nos pacientes HIV⁺ sem diarreia. Os dados também são consistentes com um menor grau de lesão e/ou alteração da permeabilidade intestinal nos pacientes HIV⁺ sem diarreia.

Excreção urinária de lactulose em crianças com diarreia

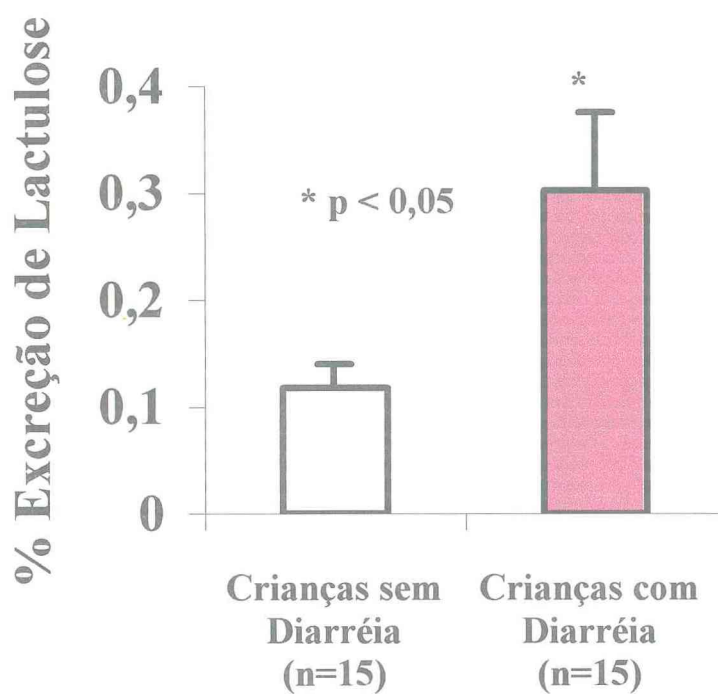


Figura 33 – Percentual de excreção de lactulose em crianças com e sem diarreia. As crianças com diarreia apresentam maior excreção de lactulose do que crianças sadias-controles.

Taxa de lactulose / manitol em crianças com diarréia

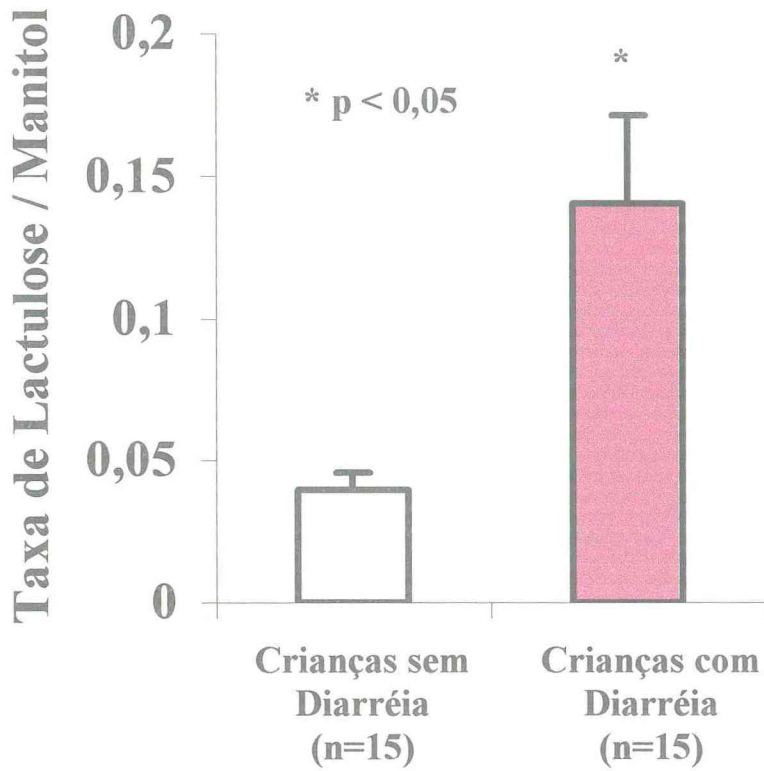


Figura 34 –Taxa de excreção de lactulose / manitol em crianças com e sem diarréia. As crianças com diarréia apresentam maior taxa de excreção de lactulose / manitol do que crianças sadias-controles.

Excreção urinária de manitol em crianças com diarreia

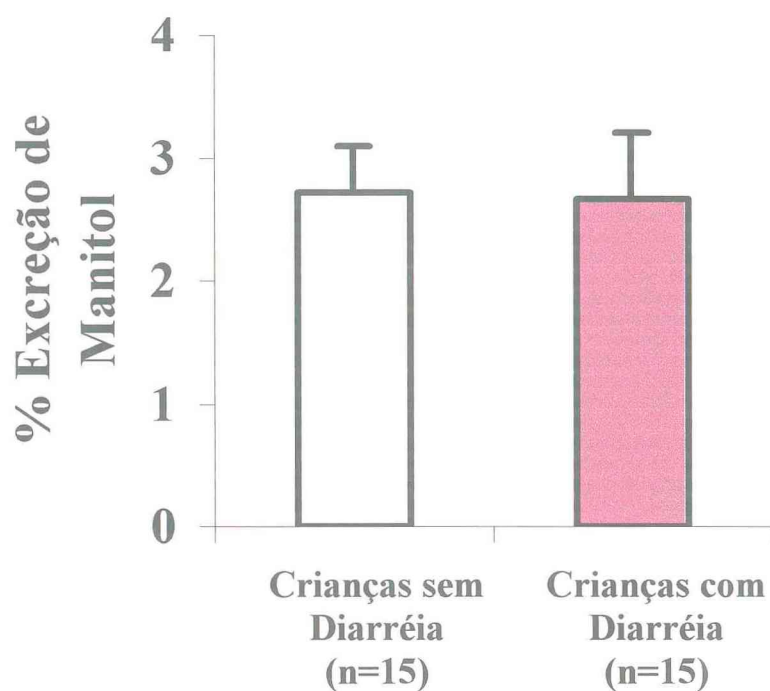


Figura 35 – Percentual de excreção de manitol em crianças com e sem diarreia. As crianças com e sem diarreia não apresentam diferença significativa entre os percentuais de excreções de manitol.

Cromatogramas de pacientes HIV⁺ com e sem Diarréia

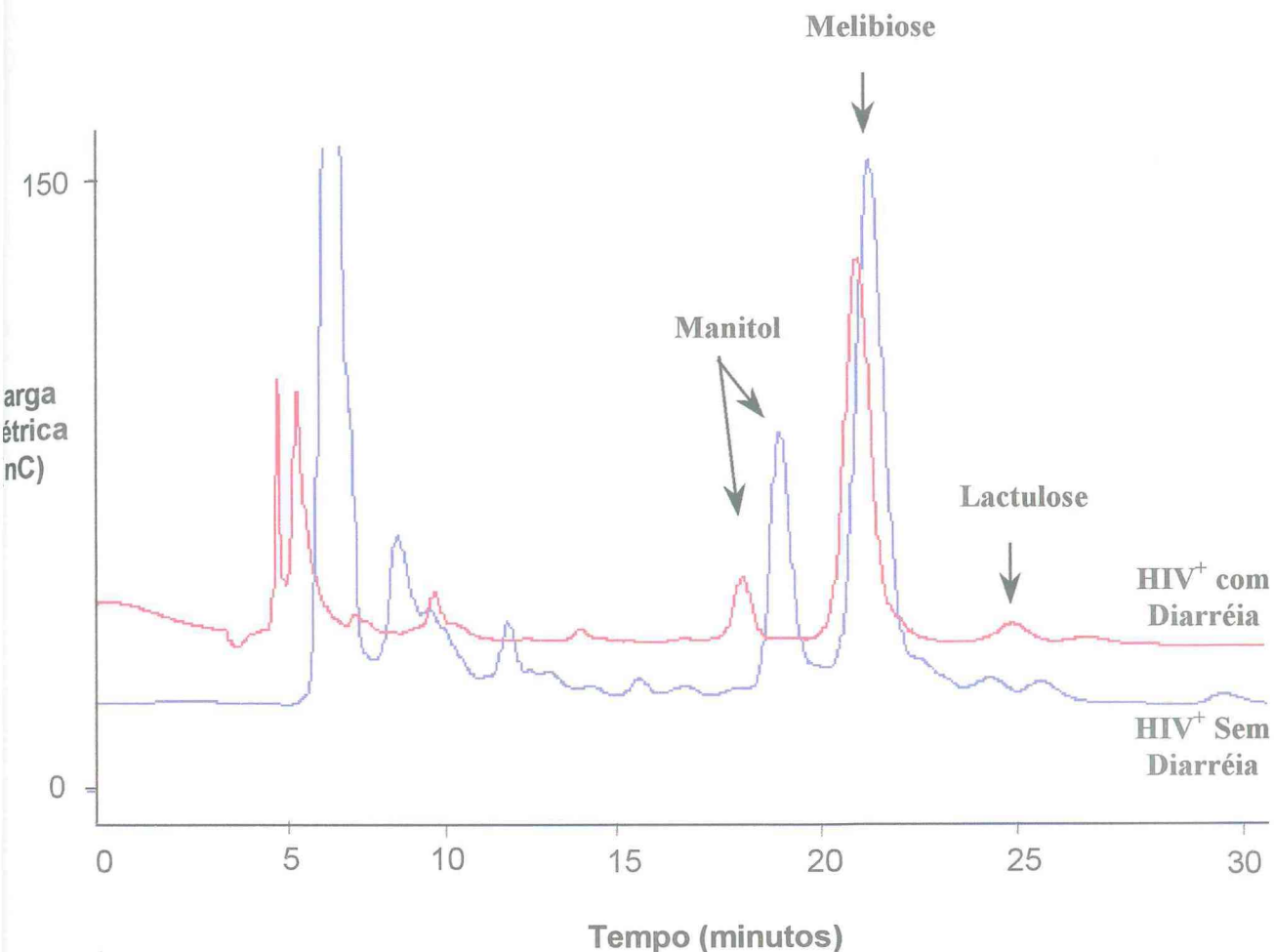


Figura 36 – Cromatograma típico de um paciente HIV⁺ com e sem diarreia. O pico de manitol é maior no paciente HIV⁺ sem diarreia, enquanto o de lactulose é maior no paciente HIV⁺ com diarreia. A melibiose é utilizada como controle interno.

Treze adultos voluntários sadios, entre 18 e 41 anos de idade, e 40 pacientes HIV⁺, com 11 a 53 anos, foram envolvidos no estudo de validação do teste de permeabilidade. Dos 40 pacientes envolvidos, 14 (35%) estavam internados no Hospital S. José e 26 (65%) advieram do ambulatório do mesmo Hospital. Todos foram do sexo masculino, o que simplificou em muito a coleta de urina para o teste de permeabilidade. As idades dos voluntários sadios variaram de 18 a 41 anos (mediana = 26). Os pacientes HIV⁺ tiveram uma variação de idade de 11 a 53 anos (mediana = 30,5 anos). Os pacientes estudados com e sem diarreia não apresentaram diferenças entre as médias de idades ou pesos. A duração média da diarreia foi de $126 \pm 33,9$ dias (mediana, 35 dias; variação, 1 dia a 1 ano). Dois de 18 (11%) pacientes tiveram diarreia aguda (≤ 14 dias de duração), 3/18 (17%) foram acometidos de diarreia persistente (15-30 dias), e 13/18 (72%) sofreram diarreia crônica (>30 dias). Dois adoeceram de diarreia com duração não identificada. Na admissão, 60% tiveram desidratação moderada, e nenhuma desidratação severa.

Os exames de fezes dos pacientes HIV⁺ para identificação de protozoários intestinais foram realizados no Laboratório de Doenças Infecciosas da UPC/UFC e revelaram a presença de oocistos de

Cryptosporidium parvum em 26,3% (5/19) dos pacientes com diarreia e em nenhum dos pacientes sem diarreia (0/15; $p=0,05$). *Enterocytozoon bienersi* (Microsporidium) foi detectado em 5,3% (1/19) dos pacientes HIV⁺ com diarreia, e em nenhum do grupo sem diarreia ($p>0,05$).

Em 18 pacientes HIV⁺ com diarreia, a excreção de lactulose foi de $0,936 \pm 0,197\%$ (média \pm erro padrão) da dose administrada, ou seja, 1,5 vezes maior do que nos pacientes HIV⁺ sem diarreia ($0,607 \pm 0,086\%$; $n = 19$; $p = 0,13$) e 3,0 vezes maior do que nos voluntários sadios ($0,304 \pm 0,039\%$; $n = 13$; $p = 0,01$) (**Figura 37**). O percentual de manitol excretado foi de 1,5 menor nos pacientes com diarreia ($8,097 \pm 1,269\%$) do que nos pacientes sem diarreia ($11,91 \pm 1,37\%$; $p = 0,049$) e 2,2 vezes menor do que os voluntários sadios ($17,89 \pm 1,423$; $p = 0,001$) (**Figura 38**). Como mostrado na **Figura 39**, a taxa lactulose/manitol foi 2,8 vezes maior no grupo com diarreia ($0,176 \pm 0,042$; $p = 0,01$) do que no grupo sem diarreia ($0,062 \pm 0,011$) e 10,4 vezes maior do que os voluntários sadios ($0,017 \pm 0,002$; $p = 0,004$).

Em adição, os pacientes com diarreia e positivos para *Cryptosporidium* spp apresentaram a taxa de lactulose/manitol 6,0 vezes maior do que o grupo sem diarreia, e 3,0 vezes maior do que o grupo com diarreia e sem

Excreção de lactulose em voluntários sadios e pacientes HIV positivos com e sem diarreia

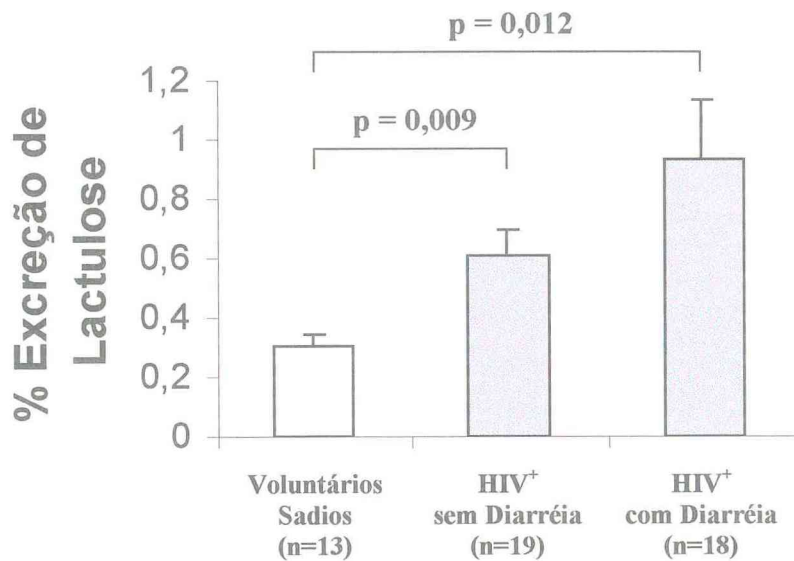


Figura 37 – Percentual de excreção de lactulose em voluntários sadios e pacientes HIV⁺ sem e com diarreia. Os pacientes HIV⁺ sem ou com diarreia mostraram aumento significativo nos percentuais de excreções de lactulose.

Excreção de manitol em voluntários sadios e pacientes HIV positivos com e sem diarreia

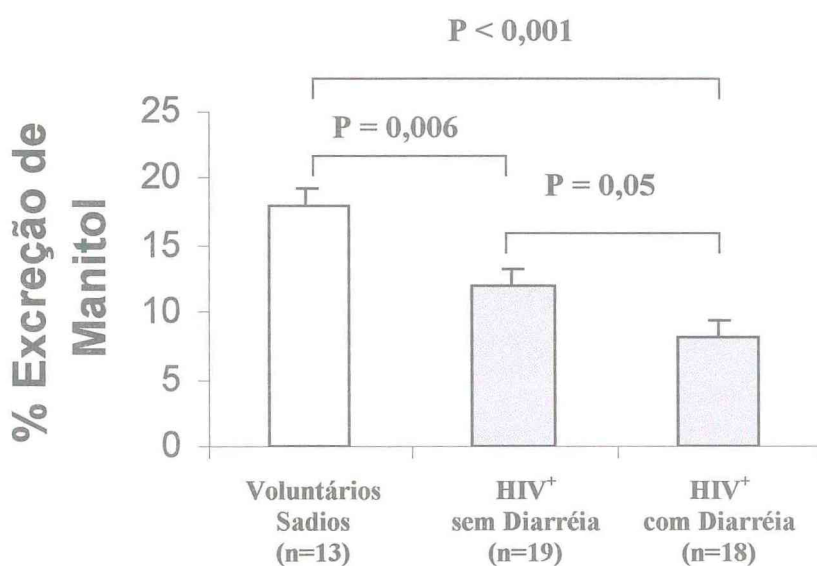


Figura 38 – Percentual de excreção de manitol em voluntários sadios e pacientes HIV⁺ sem e com diarreia. Os pacientes HIV⁺ sem ou com diarreia apresentaram diminuição significativa nos percentuais de excreções de manitol.

Taxa de lactulose / manitol em voluntários sadios e pacientes HIV positivos com e sem diarreia

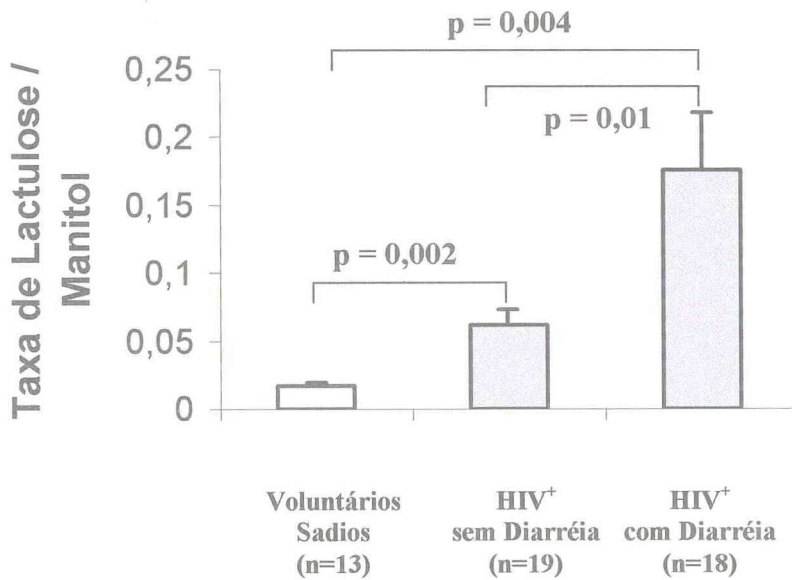


Figura 39 – Taxa de excreção de lactulose / manitol em voluntários sadios e pacientes HIV⁺ sem e com diarreia. Os pacientes HIV⁺ sem ou com diarreia apresentaram aumentos significativos nas taxas de lactulose / manitol.

Cryptosporidium spp ($p = 0,02$) (**Figura 40**). Esse efeito foi resultante da diminuição na excreção urinária de manitol e aumento na excreção de lactulose ($p < 0,05$), essa última, mais proeminente nos pacientes com infecção pelo *Cryptosporidium* spp (**Figura 41 e 42**). O único paciente com infecção por *Microsporidium* spp teve a taxa de lactulose/manitol superior a 3,0 vezes aquela apresentada pelos pacientes-controles sem diarreia. Diferente da taxa observada nos pacientes com *Cryptosporidium* spp, o aumento na taxa de lactulose/manitol nos pacientes com *Microsporidium* spp resultou principalmente da diminuição na excreção urinária de manitol (**Figura 40, 41 e 42**).

4.9 Efeito de Glutamina na Integridade e Permeabilidade do Epitélio Intestinal em Crianças com Diarreia Aguda

Um total de 38 crianças (**Tabela 13**) com diarreia, selecionadas do estudo coorte prospectivo na comunidade Gonçalves Dias, participou do estudo caso-controle, duplo-cego, e aleatório para testar o efeito das duas soluções de reidratações orais na permeabilidade intestinal: (a) solução de reidratação oral padrão recomendada pela OMS (SRO-OMS); e (b) solução de reidratação oral à base de glutamina (SRO-Gln) (**Tabela 3**). Dezesesseis (42%) crianças não entraram na análise do estudo por várias razões: (a) 14

Excreção de lactulose em pacientes HIV positivos e com cryptosporidiose

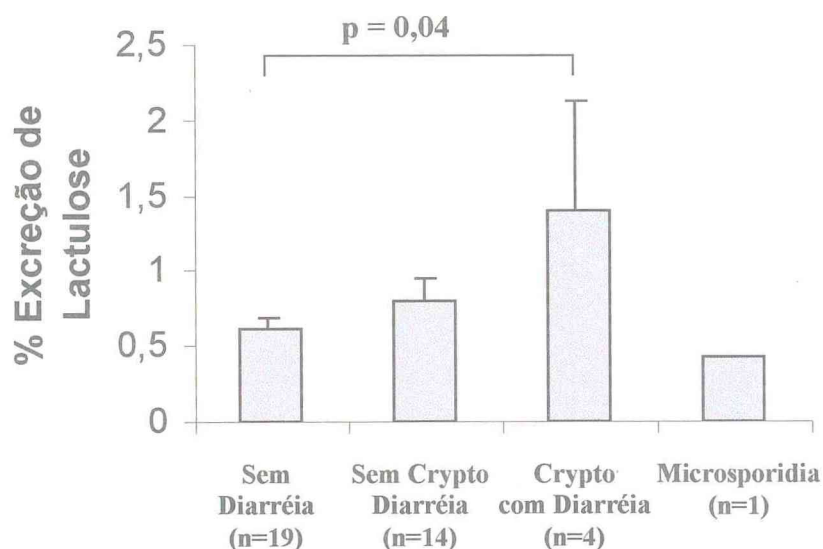


Figura 40 – Percentual de excreção de lactulose em pacientes HIV⁺ sem e com diarréia por *Cryptosporidium* spp. ou *Microsporidium* spp. Os pacientes HIV⁺ e com diarréia causada por *Cryptosporidium* spp. mostraram aumento significativo no percentual de excreção de lactulose.

Excreção de manitol em pacientes HIV positivos e com cryptosporidiose

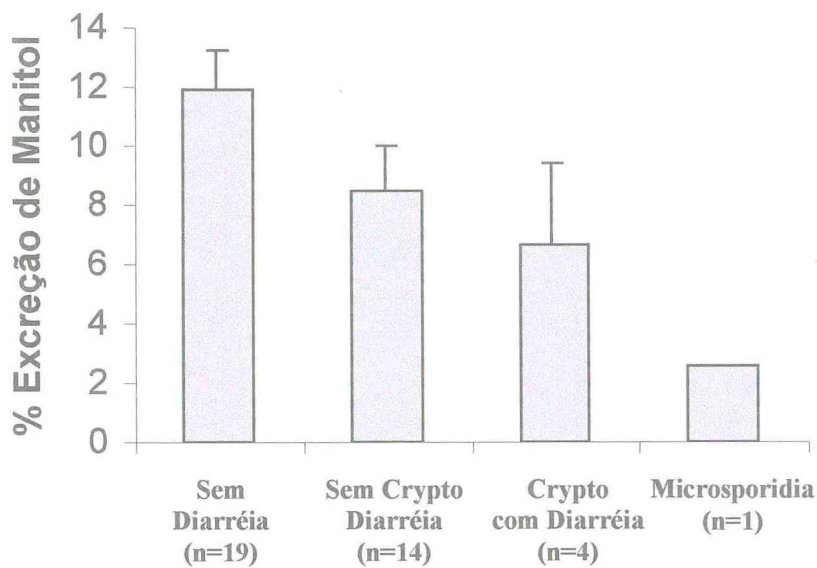


Figura 41 – Percentual de excreção de manitol em pacientes HIV⁺ sem e com diarréia por *Cryptosporidium* spp. ou *Microsporidium* spp. Os pacientes HIV⁺ não mostraram diferença significativa nos percentuais de excreções de manitol.

Taxa de lactulose / manitol em pacientes HIV positivos e com cryptosporidiose

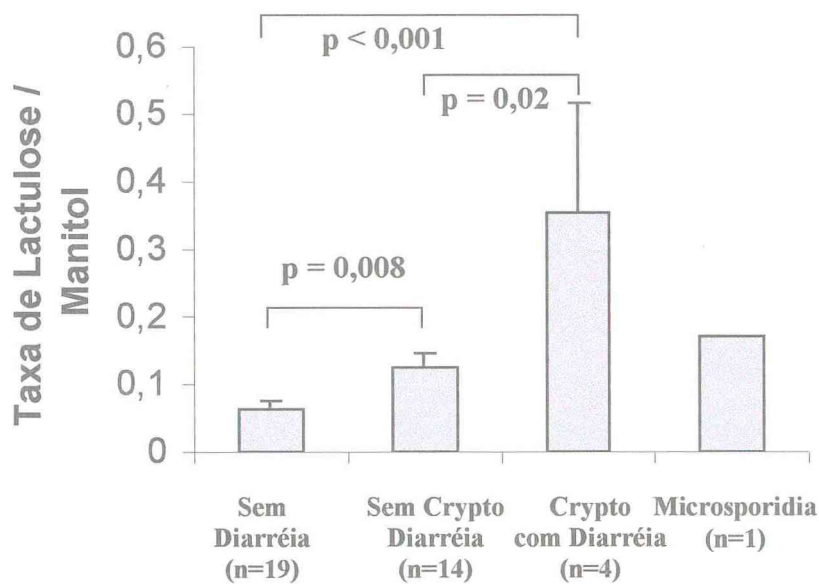


Figura 42 –Taxa de lactulose / manitol em pacientes HIV⁺ sem e com diarréia por *Cryptosporidium* spp. ou *Microsporidium* spp. Os pacientes HIV⁺ com diarréia causada por *Cryptosporidium* spp. mostraram aumento significativo, mesmo comparado com os pacientes com diarréia, e negativos para esse parasita.

perderam o primeiro e/ou o segundo teste de permeabilidade; (b) uma mudou de endereço; e (c) uma não teve a medida de lactulose/manitol realizada (**Tabela 13**). Vinte e duas crianças (58%) completaram o estudo. As crianças apresentaram características semelhantes, quanto a idade, peso na admissão e grau de desidratação também na admissão (**Tabela 14**). Os dados de evolução da doença nas crianças em tratamento com a SRO-Gln e SRO-OMS são mostrados na **Tabela 15**. Os números de dias com diarreia, vômitos, febre ou desidratação durante o tratamento não apresentaram diferenças significativas.

O protocolo experimental é mostrado na **Figura 43**. Todas as crianças seguiram o mesmo protocolo experimental. Após assinatura da folha de consentimento, foi aplicado um questionário específico para coleta dos dados demográficos, clínicos e laboratoriais. O teste de permeabilidade foi realizado no dia anterior ao início do tratamento. Uma amostra de sangue foi coletada para determinação de uréia e creatinina. As soluções foram “randomizadas” e administradas na dose de 50-100 ml/kg/dia durante cinco dias seguidos. No terceiro dia da pesquisa, foi coletada outra amostra de sangue para determinação de uréia e creatinina. No sexto dia da pesquisa, o teste de permeabilidade intestinal com lactulose/manitol foi repetido para

Tabela 13 – Total de crianças com diarreia que participaram do ensaio clínico da solução de reidratação oral com glutamina.

	Pacientes No. (%)
Pacientes envolvidos	38 (100)
Saída do estudo	16 (42)
Perda do teste L/M ^a	14
Mudou de endereço	1
Medida incompleta	1
Completaram o estudo	22 (58)

^a L/M = lactulose/manitol; onze não completaram o 1° e/ou 2° teste, um não urinou durante o teste, um teve a taxa L/M anormal e um perdeu a urina na coleta.

Tabela 14 – Idade, peso e grau de desidratação das crianças com diarréia submetidas ao ensaio clínico com glutamina ^a.

Características	Controles (N = 13)	SRO-Gln ^b (N = 9)
Idade (meses)	29 ± 26	26 ± 23
Peso na admissão (kg)	12 ± 5,4	11 ± 3,6
Diarréia no início (dias)	4,8 ± 2,98	7,6 ± 8,09
Desidratação na admissão	0	1
- Moderada	-	1
- Severa	-	0

^a Os dados são mostrados em média ± desvio padrão. O grupos não apresentaram diferenças significativas com $p < 0,05$, utilizando o teste *t* de Student ou Qui-quadrado.

^b SRO-Gln = soro de reidratação oral com glutamina; os controles utilizaram a solução-padrão recomendada pela Organização Mundial de Saúde (OMS).

Tabela 15 – Evolução clínica das crianças com diarreia e em tratamento com a solução de reidratação oral com glutamina ^a.

	Controles	SRO-Gln ^b
Evolução clínica	(N = 13)	(N = 9)
Diarreia (dias)	2,5 ± 1,94	2 ± 1,8
Vômitos (dias)	0	0,8 ± 1,09
Febre (dias)	0	0,1 ± 0,33
Desidratação (dias)	0	2
Ingesta da SRO (ml/kg)	59 ± 130	91 ± 85

^a Os dados são mostrados em média ± desvio padrão. O grupos não apresentaram diferenças significativas com $p < 0,05$, utilizando o teste *t* de Student ou Qui-quadrado.

^b SRO-Gln = soro de reidratação oral com glutamina; os controles utilizaram a solução-padrão recomendada pela Organização Mundial de Saúde (OMS).

avaliação do efeito das soluções na integridade e permeabilidade da mucosa intestinal. As medidas de uréia e creatinina no sangue foram normais nos dois grupos, antes ou durante o tratamento com as duas soluções.

Diferente do grupo tratado com a SRO-OMS (L/M: $0,1086 \pm 0,0300$ vs. $0,1085 \pm 0,0180$; $n = 13$; $p > 0,05$), o grupo tratado com a SRO-Gln apresentou uma diminuição próxima ao nível de significância na taxa de lactulose/manitol (L/M: $0,1510 \pm 0,0326$ vs. $0,0741 \pm 0,0152$; $n = 9$ pares; $p = 0,056$) (**Figura 44**). Esse efeito foi resultante, principalmente, da redução na excreção urinária de lactulose (**Figura 45**). Os percentuais de excreção urinária de manitol não variaram significativamente nos dois grupos após os tratamentos (**Figura 46**).

4.10 Efeito de Glutamina na Integridade e Permeabilidade do Epitélio Intestinal em Crianças de Alto Risco para Doenças Diarréicas e/ou Desnutrição

Trinta crianças de alto risco (veja definição em Materiais e Métodos), foram selecionadas para um estudo caso-controle, duplo-cego, e aleatório para testar o efeito da SRO-Gln na permeabilidade intestinal. As soluções administradas no tratamento foram as mesmas citadas há pouco, diferindo

apenas no total de dias. Nesse estudo, utilizamos sete dias de tratamento, no lugar de cinco dias usados no protocolo anterior.

Vinte e três de um total de 30 crianças completaram o estudo, tendo assim uma eficiência de 77%. Sete crianças não tiveram o 1º ou 2º teste de permeabilidade validado no momento da análise do estudo. A **Tabela 16** mostra as características dos grupos tratados com SRO-OMS e a SRO-Gln. Os dois grupos foram semelhantes quanto a idade, sexo e peso na admissão. As quantidades de soluções tomadas foram semelhantes também nos dois grupos experimentais.

Novamente, diferente do grupo SRO-OMS (L/M: $0,05777 \pm 0,00959$ vs $0,05412 \pm 0,01711$; $n= 10$; $p > 0,05$), o grupo tratado com a SRO-Gln mostrou uma redução significativa da taxa de lactulose/manitol ($0,06569 \pm 0,01821$ vs. $0,04350 \pm 0,00803$; $n = 13$; $p = 0,03$) (**Figura 47**). Esse efeito foi dependente da redução, embora não significativa, no percentual de excreção urinária de lactulose (**Figura 48**). Os percentuais de excreção de manitol não se alteraram nos grupos experimentais (**Figura 49**).

Efeito de glutamina na taxa de lactulose/manitol em crianças com diarréia

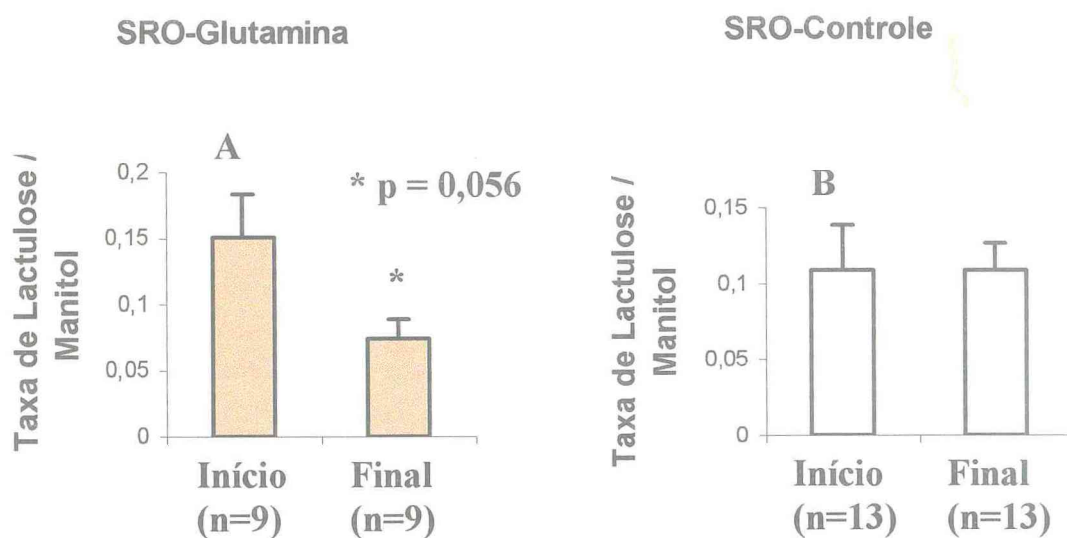


Figura 44 – Os painéis A e B mostram os efeitos das soluções de reidratações orais com e sem glutamina nas taxas de lactulose / manitol em crianças com diarréia. As soluções foram administradas (50-100 ml/kg de peso/dia) durante cinco dias em cada grupo experimental. SRO = solução de reidratação oral; SRO-Controle = solução recomendada pela Organização Mundial de Saúde.

Efeito de glutamina na excreção de lactulose em crianças com diarréia

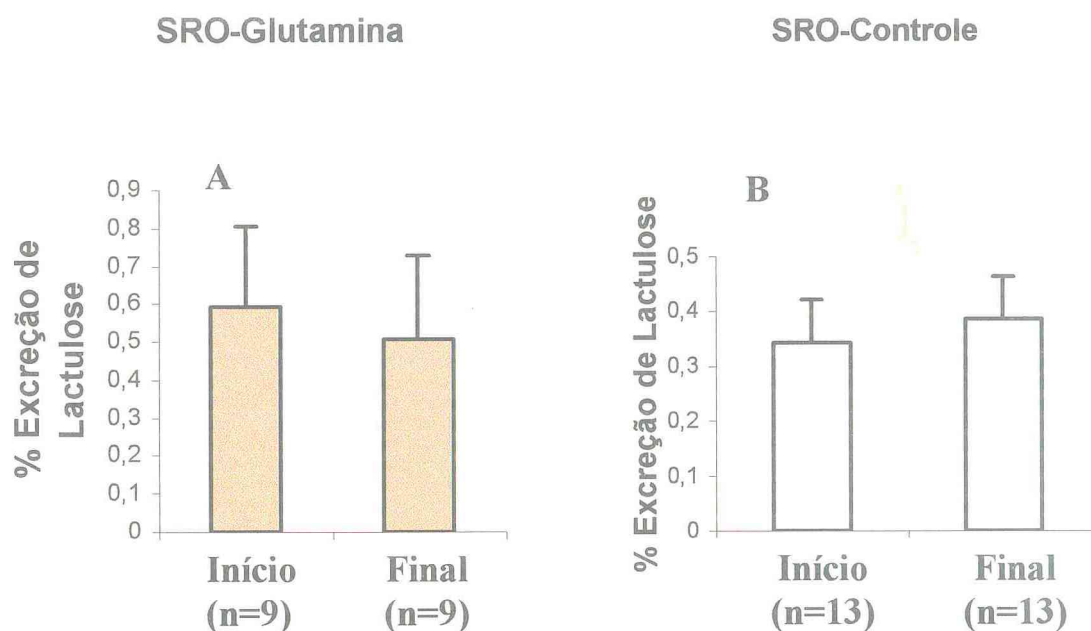


Figura 45 – Os painéis A e B mostram os efeitos das soluções de reidratações orais com e sem glutamina nos percentuais de excreções de lactulose em crianças com diarréia. As soluções foram administradas (50-100 ml/kg de peso/dia) durante cinco dias em cada grupo experimental. SRO = solução de reidratação oral; SRO-Controle = solução recomendada pela Organização Mundial de Saúde.

Efeito de glutamina na excreção de manitol em crianças com diarreia

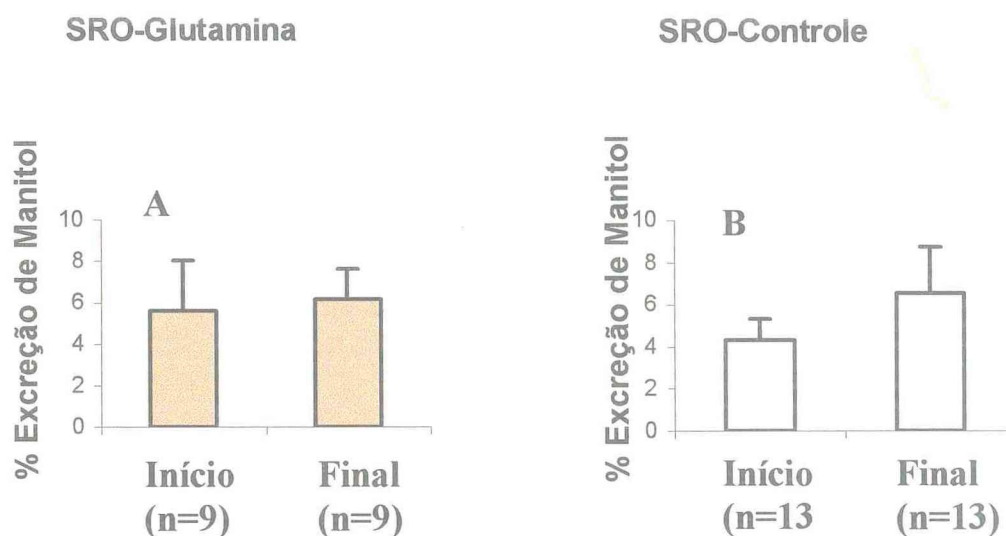


Figura 46 – Os painéis A e B mostram os efeitos das soluções de reidratação orais com e sem glutamina nos percentuais de excreções de manitol em crianças com diarreia. As soluções foram administradas (50-100 ml/kg de peso/dia) durante cinco dias em cada grupo experimental. SRO = solução de reidratação oral; SRO-Controle = solução recomendada pela Organização Mundial de Saúde.

Tabela 16 - Idade, sexo, peso e ingestão de solução das crianças consideradas de alto risco submetidas ao ensaio clínico com glutamina ^a.

Características	Controles (N = 15)	SRO-Gln ^b (N = 15)
Idade (meses)	65,6 ± 13,37	74,0 ± 16,20
Sexo		
Masculino	6	6
Feminino	9	9
Peso na admissão (kg)	17,2 ± 5,53	19,4 ± 2,97
Ingesta de SRO (ml/kg/dia)	36,8 ± 25,03	31,7 ± 13,06

^a Os dados são mostrados em média ± desvio padrão. O grupos não apresentaram diferenças significativas com $p < 0,05$, utilizando o teste *t* de Student ou Qui-quadrado.

^b SRO-Gln = soro de reidratação oral com glutamina; os controles utilizaram a solução-padrão recomendada pela Organização Mundial de Saúde (OMS).

Efeito de glutamina na taxa de lactulose/manitol em crianças de alto risco

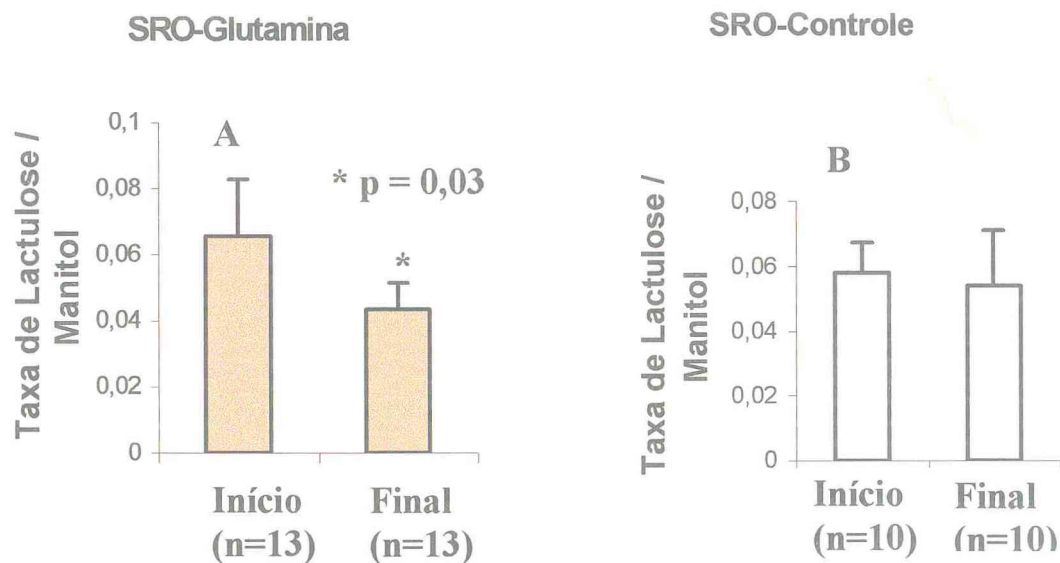


Figura 47 – Os painéis A e B mostram os efeitos das soluções de reidratações orais com e sem glutamina nas taxas de lactulose / manitol. As soluções foram administradas (50-100 ml/kg de peso/dia) durante sete dias em cada grupo experimental. SRO = solução de reidratação oral; SRO-Controle = solução recomendada pela Organização Mundial de Saúde.

Efeito de glutamina na excreção de lactulose em crianças de alto risco

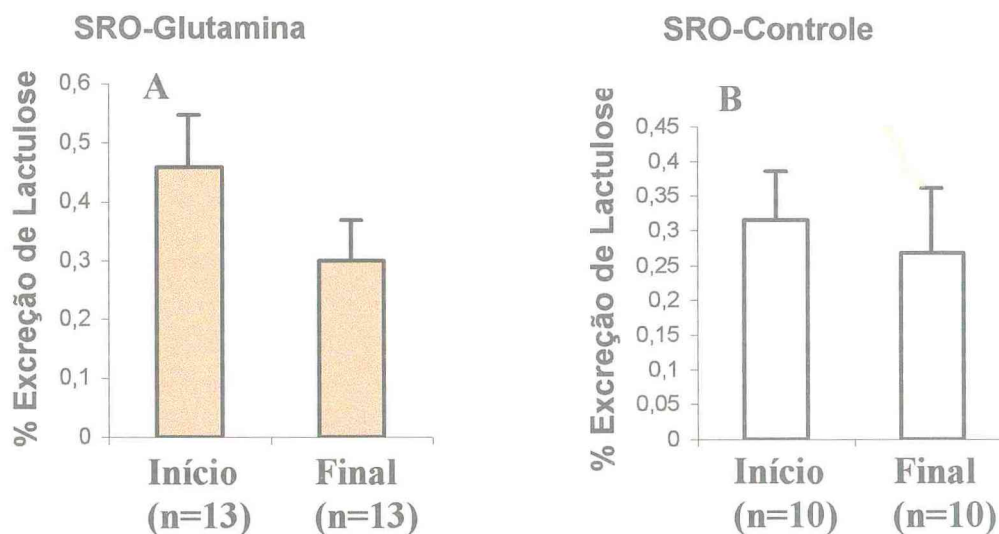


Figura 48 – Os painéis A e B mostram os efeitos das soluções de reidratações orais com e sem glutamina nos percentuais de excreções de lactulose. As soluções foram administradas (50-100 ml/kg de peso/dia) durante sete dias em cada grupo experimental. SRO = solução de reidratação oral; SRO-Controle = solução recomendada pela Organização Mundial de Saúde.

Efeito de glutamina na excreção de manitol em crianças de alto risco

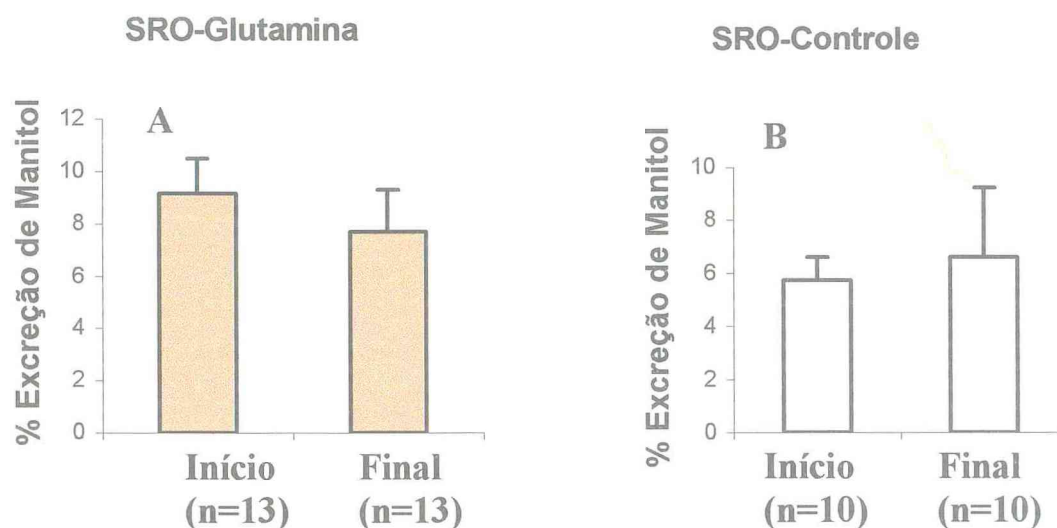


Figura 49 – Os painéis A e B mostram os efeitos das soluções de reidratações orais com e sem glutamina nos percentuais de excreções de manitol. As soluções foram administradas (50-100 ml/kg de peso/dia) durante sete dias em cada grupo experimental. SRO = solução de reidratação oral; SRO-Controle = solução recomendada pela Organização Mundial de Saúde.

DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

5.1 Desenvolvimento e Síntese de Alanil-Glutamil-Glutamina

A glutamina é considerada a principal fonte de energia e nutriente para o intestino delgado. Este aminoácido tem sido utilizado por via parenteral para melhorar o balanço de nitrogênio, inibir o catabolismo protéico, promover o crescimento epitelial e reduzir a atrofia da vilosidade intestinal (SOUBA e cols., 1990). Entretanto, esse aminoácido é quimicamente instável em solução ácida (MEISTER, 1966). Por essa razão, é muito difícil incorporar a glutamina nas misturas com outros aminoácidos para nutrição parenteral, enteral ou saís nas soluções de reidratações orais. É conhecido da literatura que a adição de um aminoácido, alanina ou glicina à molécula original de glutamina resulta em compostos estáveis e de fácil incorporação em soluções parenterais (VAZQUEZ e cols., 1993). A estabilidade química desses compostos resulta da ligação peptídica, a qual é rígida e se mantém numa estrutura plana. Esse tipo de estabilidade química normalmente não é encontrado em alguns aminoácidos livres, como a glutamina. Nesse caso, o aminoácido é instável e tende a formar um composto cíclico (ácido piroglutâmico) quando em pH ácido ou formar glutamato e amônia em temperatura elevada e pH ácido. Por essa razão, a glutamina não é utilizada

em misturas de aminoácidos esterilizados através do aquecimento. Entretanto, dipeptídeos, como a L-alanil-L-glutamina e glicil-L-glutamina, são estáveis a temperaturas elevadas e podem, por exemplo, ser incorporados nessas misturas de aminoácidos (STEHLE e cols., 1984; VAZQUEZ e cols., 1993).

Por outro lado, a idéia da utilização de um composto contendo glutamina para solução de reidratação e terapêutica nutricional em pacientes com diarréia e desnutrição ainda não tinha sido explorada. Por conseguinte, a presente invenção teve como objetivo desenvolver um composto estável a partir da glutamina e que fornecesse ao intestino a capacidade de induzir aumento na absorção de eletrólitos e água, bem como tivesse a capacidade de prevenir e manter a integridade e permeabilidade do epitélio intestinal. Em adição, esse composto deveria ter a vantagem de transportar maior número de moléculas importantes para o metabolismo celular, sem alterar a osmolalidade do lúmen intestinal. É importante lembrar este fato, principalmente quando o objetivo é o tratamento de diarréia e/ou desnutrição.

O composto desenvolvido e sintetizado nesse trabalho foi o tripeptídeo alanil-glutamil-glutamina, o qual se mostrou estável em meio aquoso e em pH igual a 1,0, semelhante àquele encontrado no estômago. A razão para

escolha de alanina e outra molécula de glutamina baseou-se na hipótese de que a alanina liberada no lúmen intestinal, a partir do composto Ala-Gln-Gln, juntamente com a glutamina, teriam uma eficácia máxima para induzir a absorção de sódio e água, conforme demonstrado em experimentos *in vivo* e *in vitro* utilizando câmaras de Üssing. A disponibilidade de duas moléculas de glutamina nesse composto, sem alterar a osmolalidade da solução, fornece ao epitélio intestinal maior suprimento energético e metabólico importante para renegerar e manter a função desse epitélio, especialmente quando associado a diarréia e/ou desnutrição. Essa hipótese teve como base experimentos realizados por outros autores, os quais mostraram o efeito da glutamina na prevenção e regeneração do epitélio intestinal em experimentos com irradiação abdominal, uso de quimioterápicos ou jejum prolongado (GRANT e cols., 1988; HWANG e cols., 1987; FOX e cols., 1988; JACOB e cols., 1987; O'DWYER e cols., 1987; KLIMBERG e cols., 1990; SOUBA e cols., 1990). De fato, como demonstrado em experimentos clínicos nesse trabalho, a glutamina na solução de reidratação oral diminui significativamente o grau de lesão intestinal nos pacientes com ou mesmo sem diarréia, mas com alto risco para diarréia e/ou desnutrição. Assim, glutamina e derivados, como esse novo tripeptídeo Ala-Gln-Gln, são úteis não só para o tratamento de diarréia associada ou não com desnutrição,

como também para o tratamento de pacientes que necessitam de alimentação parenteral ou enteral, bem como naqueles com infecção, quimioterapia e irradiação que resultam em lesão da mucosa intestinal.

Vários estudos realizados em animais inferiores e primatas têm falhado em mostrar alguma toxicidade do uso de glutamina e derivados peptídicos em soluções para alimentação parenteral (LOWE e cols., 1989; SOUBA e cols., 1985; KLIMBERG e cols., 1989; STEINHARDT e cols., 1984; VAZQUEZ e cols., 1988; BRANDL e cols., 1987; HAMMARQVIST e cols., 1990; DRUML e cols., 1991; LOCHS e cols., 1992; STEHLE e cols., 1989; STEININGER e cols., 1989). Esses trabalhos têm mostrado que a nutrição parenteral com soluções contendo glutamina e derivados peptídicos é isenta de efeitos colaterais ou toxicidade para o rim, fígado, sistema cardiovascular, imunológico ou sistema nervoso central. No estudo clínico mostrado nesse trabalho, também não fomos capazes de detectar efeitos colaterais ou toxicidade resultante do uso de glutamina na solução de reidratação oral.

5.2 Glutamina e Derivados no Transporte Intestinal de Eletrólitos e

Água

A base para terapia de reidratação foi pela primeira vez sugerida em 1831, com o trabalho de um químico inglês O'Shaughnessy, o qual sugeriu que os pacientes de cólera deviam ser tratados com a reposição de sais e água equivalentes àquelas das perdas fecais (veja revisão em LIMA e cols., 1994). Apesar de antiga essa observação, a terapêutica de reidratação oral somente veio a evoluir no final da primeira metade do século XX (LIMA e cols., 1996). No final da década de 1940, foi observado que a absorção de sódio no intestino de coelho era aumentada com a adição de glicose no lado luminal do epitélio (FISHER e PEARSON, 1953). Essas observações foram aplicadas com sucesso por DARROW e HARRISON, no final de 1940 e na década de 1950, quando demonstraram com sucesso o uso da solução oral de reidratação para manutenção das perdas de fluido e eletrólitos em crianças desidratadas (DARROW, 1946; DARROW e cols., 1949; HARRISON, 1954; HIRSCHHORN, 1980; FINBERG e cols., 1982).

A solução de reidratação oral com sais e glicose foi também utilizada com sucesso no tratamento de pacientes com cólera na Índia (CHATTERJEE, 1953). Em 1964, PHILLIPS demonstrou que pacientes com cólera podiam absorver a solução de glicose com sais por via oral. Em

seguida, estudos metabólicos foram realizados demonstrando que a infusão oral de soluções com glicose e sais podiam manter o balanço de fluido e eletrólitos em pessoas com cólera (HIRSCHHORN e cols., 1968; NALIN e cols., 1968; PIERCE e cols., 1968). Em 1970, CRANE, SCHULTZ, CURRAN e outros demonstraram o cotransporte de sódio com glicose e outros substratos orgânicos no intestino delgado (SCHULTZ e CURRAN, 1970).

Na década de 1990, nova solução oral contendo glutamina tem sido alvo de vários estudos *in vitro* e investigações clínicas preliminares. RHOADS e cols. (1990) determinaram os efeitos da glutamina no transporte intestinal de eletrólitos em jejuno de porcos montados em câmaras de Üssing. Esses estudiosos demonstraram que a glutamina foi capaz de estimular a absorção eletroneutra de NaCl no intestino delgado. Em adição, mostraram a absorção eletrogênica de sódio em resposta à glutamina. Em 1992, LIMA e cols. mostraram que a absorção de sódio, em ileum de coelho montado em câmaras de Üssing, foi mais eficaz na presença de glutamina ou alanina do que aquela observada para glicose. Adicionalmente, demonstraram que a absorção desses três substratos foram dependentes da presença de sódio, confirmando, assim, observações anteriores citadas por outros pesquisadores (LIMA e cols., 1996; LIMA cols., 1992; SCHULTZ e

CURRAN, 1970; STEVENS e cols., 1984; STEVENS e cols., 1982; SAID e cols., 1989; SMITH, 1998). Entretanto, esses autores pela primeira vez demonstraram *in vitro* que o transporte de sódio com glutamina ou alanina não eram alterados quando o intestino foi tratado com a toxina da cólera (LIMA e cols., 1991). Ao contrário, o cotransporte com glicose parece aumentar sua eficácia quando tratado com a toxina da cólera. Isso, de certa forma, explica a eficácia já demonstrada da solução de reidratação-padrão contendo glicose para o tratamento da cólera e outras doenças diarréicas (BHAN e cols., 1994). Recentemente, GRONDAHL e cols. (1997) demonstraram que o cotransporte de eletrólitos não se altera no intestino de porcos pré-tratados com toxina da cólera. Estes resultados ratificam os achados do nosso estudo em íleo de coelhos.

Os resultados mostrados nesse estudo, utilizando o intestino *in vitro* e a perfusão do intestino *in vivo*, adicionam e confirmam os dados sobre a superioridade da glutamina e seus derivados em reverter os efeitos da toxina da cólera no transporte de sódio, cloro, potássio e água (LIMA e cols., 1991; LIMA e cols., 1992, SOARES, 1996; SILVA e cols., 1998). Como as soluções utilizadas nesse estudo tinham osmolalidades semelhantes, isso reforça a importância de glutamina para melhor absorção de eletrólitos e água. Outros trabalhos têm também demonstrado que a solução oral à base

de glutamina é mais efetiva do que a solução oral à base de glicose em porcos infectados com rotavírus ou *Cryptosporidium* spp (ARGENZIO e cols., 1994; RHOADS e cols., 1991). ARGENZIO e cols. (1994) investigaram o efeito da glutamina no intestino de porcos infectados com *Cryptosporidium* spp e mostraram que a glutamina foi mais eficaz do que a glicose na solução de reidratação oral. RHOADS e cols. (1991) estudaram o transporte intestinal de eletrólitos em resposta à glutamina no intestino de porco infectado com rotavírus. Esse estudo mostrou que a glutamina e a alanina foram mais efetivos do que a glicose para estimular o transporte eletroneuro de NaCl no intestino de porco infectado com rotavirus. NATH e cols. (1992) demonstraram também que a absorção de sódio pode ser aumentada com glutamina no intestino de coelhos infectados com uma cepa de *Escherichia coli* causadora de diarreia.

Várias outras soluções de reidratações orais foram estudadas, utilizando diferentes aminoácidos e polímeros de glicose, como substratos para cotransporte intestinal de sódio. Por exemplo, a solução de reidratação oral contendo glicose e alanina mostrou-se mais eficaz do que a solução-padrão com glicose, recomendada pela OMS no tratamento de pacientes com cólera (PATRA e cols., 1989). Estudos clínicos realizados em pacientes com cólera na Indonésia, utilizando a solução com glutamina (90 mmol/l de glutamine e

glicose) em comparação com a solução-padrão da OMS, mostraram uma redução de 25% no volume total de fezes nas primeiras 24 horas e 30% de redução no volume total de fezes durante todo o tratamento (WHO, 1990; PUNJABI, 1991).

RIBEIRO e cols. (1994) estudaram uma solução de reidratação oral com 90 mmol/L de glutamina e 90 mmol/L de glicose e compararam com a solução-padrão da OMS. Essas duas soluções foram utilizadas em crianças, entre um mês e um ano de idade, com diarreia aguda e desidratação. Esse estudo demonstrou que a solução contendo glutamina foi bem tolerada e apresentou o mesmo efeito que a solução-padrão, utilizando como parâmetro principal o total de perdas fecais durante o tratamento. A solução com glutamina nesse estudo tinha menos glutamina e maior osmolalidade do que nossa solução utilizada nos estudos experimentais em animais. Com base nos resultados apresentados, podemos postular que uma solução de reidratação com menor osmolalidade e maior quantidade de glutamina poderá ter uma eficácia melhor na absorção de eletrólitos e água do que a solução-padrão da OMS, mesmo nas diarreias causadas por outros microorganismos diferentes do *Vibrio cholerae* (SILVA e cols., 1998).

Apesar de estimarmos que a solução contendo glutamina terá um custo maior do que a solução-padrão da OMS, postulamos que a mesma tenha um

benefício importante para recuperação da integridade e/ou lesão intestinal resultante da ação de vários agentes infecciosos causadores da diarreia (SILVA e cols., 1998).

5.3 Caracterização e Importância do Teste de Permeabilidade com Lactulose e Manitol

Os trabalhos de FORDTRAN e cols. (1965) foram pioneiros no uso de marcadores moleculares para determinação da permeabilidade intestinal em seres humanos. Desde então, tem-se aceito que um marcador ideal não deva ser reconhecido pelo sistema imune, seja biologicamente inerte e atóxico. Por outro lado, o processo para medida desse marcador deve ser sensível, preciso e de fácil reprodução. Adicionalmente, esse marcador deve ser excretado por via renal, através do processo de filtração glomerular exclusiva, possibilitando, assim, sua detecção e adequada medida na urina.

Alguns dissacarídeos e monossacarídeos apresentam características próximas das ideais para marcadores dos testes de permeabilidade intestinal. PEARSON e cols. (1982) utilizaram lactulose e manitol para o estudo de permeabilidade intestinal em várias doenças, como doença celíaca, doença de Crohn, diarreia e síndrome de malabsorção. Nesses estudos, foi

demonstrado que a permeabilidade dos dissacarídeos estava aumentada e que a absorção de manitol estava diminuída.

O uso de duplo açúcar para o teste diferencial de permeabilidade intestinal tem minimizado vários problemas quando comparado com àqueles utilizando somente um marcador. MENZIES (1983) demonstrou que fatores como motilidade intestinal, área de absorção, clearance renal e acurácia na medida do volume urinário, podiam modificar os resultados avaliados com único marcador. Entretanto, no uso de duplos açúcares como marcadores, esses fatores não alteravam a taxa de absorção desses marcadores, uma vez que ambos eram alterados pelos mesmos fatores.

Os dois principais açúcares utilizados com essa finalidade são lactulose e manitol (UKABAM e COOPER, 1984; JUBY e cols., 1989; ANDRE e cols., 1988). Eles diferem no tamanho molecular e pela via de permeação no epitélio gastrintestinal. O manitol tem um raio de 0,4 nm e é absorvido via transcelular, através dos poros hidrofílicos da membrana. A lactulose, por apresentar um raio de 0,52 nm, é absorvida via paracelular, dependente das zônulas de oclusões e/ou lesão celular (PEARSON e cols., 1982).

O teste combinando os dois açúcares tem a vantagem de ser não invasivo, entretanto, o seu uso tem sido limitado pelas dificuldades da

medida e análise de carboidratos com diferentes estruturas químicas, e em baixa concentração na urina (TRAVIS e MENZIES; BAO e cols., 1996).

O método de cromatografia líquida de alta pressão com detecção amperométrica (HPLC-PAD) parece resolver esse problema. Através dessa técnica, lactulose e manitol podem ser separados, bem como isolados de outros açúcares na urina. A sensibilidade é melhor do que o método de cromatografia em gel de camada fina (TRAVIS e MENZIES, 1992; BAO e cols., 1996). Adicionalmente, a preparação das amostras para o método de HPLC-PAD é extremamente rápida e simples, excedendo assim, qualquer outro método utilizando degradação enzimática (TRAVIS e MENZIES, 1992; BAO e cols., 1996; BEHRENS e cols., 1983).

A linearidade do método que utilizamos foi estabelecida pela adição de quantidades conhecidas de oito açúcares no volume de 50 μ l. A relação de linearidade foi mantida em concentrações variando, para cada açúcar, de 0,01 a 1,0 mM, mostrando considerável reprodutibilidade.

Os tempos de retenção foram bem separados nos dois grupos de açúcares utilizados, com um mínimo de dois minutos de intervalo, e um tempo de nove minutos entre os tempos de retenções de manitol e lactulose. A sensibilidade do método foi comprovada quando avaliamos os tempos de retenções e as quantidade recuperadas na variação intra-experimentos,

verificando um desvio padrão menor do que 1,2% e 2%, respectivamente. A reprodutibilidade e a detecção de pequena quantidade de lactulose e manitol confirmam a precisão e sensibilidade desse método de cromatografia. As condições cromatográficas, como retenção, seletividade e eficiência mostradas dentro dos padrões de variação normal, sugerem que a técnica utilizada foi apropriada para separação e detecção dos açúcares-padrões.

Recentemente, nosso grupo e outros têm utilizado a cromatografia líquida de alta pressão para determinação de lactulose e manitol e o uso desses marcadores no teste de permeabilidade intestinal (BAO e cols., 1996; FLEMING e cols., 1990). Estudos em voluntários sadios para avaliar o teste de permeabilidade têm demonstrado a linearidade do método com concentrações acima de 3g/l dos açúcares, e detecção possível com concentrações de 0,3 mg de lactulose por litro (FLEMING e cols., 1990). A quantidade recuperada de açúcares variou de 90 a 107%, mostrando correlação significativa com o método de cromatografia gasosa ($r = 0,993$ para lactulose; e $r = 0,984$ para manitol). Nossos dados e de outros autores comprovam a indicação desse método de cromatografia para o uso na detecção de açúcares utilizados no teste de permeabilidade intestinal. Esse teste tem a vantagem de ser inócuo, não invasivo, facilmente aplicável, altamente preciso e sensível.

Várias doenças como celíaca, de Crohn, gastroenterite e alergia alimentar são capazes de causar lesão na mucosa intestinal (BRUNSER e cols., 1966; WYATT e cols., 1993; TRAVIS e MENZIES, 1992). Entretanto, os testes para avaliar a estrutura e função do intestino delgado são ainda insatisfatórios. Muitas variáveis influenciam os testes que utilizam somente um marcador para medida da absorção intestinal, o que invalida os resultados. A biópsie e procedimentos para perfusão intestinal são métodos invasivos e podem influenciar os resultados obtidos. Os métodos utilizando dois açúcares como marcadores foram usados com sucesso para avaliar a estrutura e função do intestino delgado na doença celíaca (COBDEN e cols., 1978; MENZIES e cols., 1979). Nesse estudo, demonstramos que o método de cromatografia líquida foi sensível e acurado para determinação de lactulose e manitol, e que podem ser utilizados como marcadores intestinais no teste de permeabilidade. Assim, avaliamos esse teste de permeabilidade em crianças e adultos com diarreia.

Nas crianças com diarreia aguda, o teste de permeabilidade se mostrou adequado para detecção de alterações na estrutura e função do intestino delgado. Nossos resultados mostraram significativa lesão intestinal nas crianças com diarreia em relação aos controles saudáveis. A área de absorção intestinal não foi diferente nas crianças com e sem diarreia nesse estudo.

Dois outros estudos também têm mostrado alterações na permeabilidade intestinal em crianças com diarreia aguda, utilizando marcadores com dois ou mais açúcares, o que ratifica e valida nossos achados para este estudo (BEHRENS e cols., 1987; FORD e cols., 1985). BEHRENS e cols. (1987) estudaram 68 crianças abaixo de 18 meses de idade, incluindo crianças com diarreia, e concluíram que a lesão intestinal contribui significativamente para a associação de desnutrição nessas crianças. FORD e cols. (1985) estudaram 39 crianças (1 mês a 3 anos de idade) com diarreia e 28 (6 meses a 15 anos idade) crianças-controles e mostraram que aquelas com diarreia apresentavam alterações significativas na permeabilidade intestinal.

Diarreia persistente ou crônica é uma complicação comum nos pacientes infectados com o vírus HIV. Nossos dados confirmam essas observações e acrescentam novos conhecimentos na associação de etiologias específicas e alterações na integridade e permeabilidade intestinal. Apenas *C. parvum* e *Microsporidium* spp. foram os parasitas intestinais associados com diarreia nos pacientes HIV⁺. Estudos anteriores no mesmo hospital, também, demonstraram a associação desses parasitas com diarreia em pacientes HIV⁺ (WUHIB e cols., 1994). Adicionalmente, nossos dados mostraram que, freqüentemente, os pacientes apresentavam diarreia por mais de 30 dias de duração.

O teste diferencial de permeabilidade intestinal com lactulose/manitol foi utilizado nesses pacientes para sua validação, bem como para estudar o impacto de etiologia específica para diarreia e suas alterações na integridade e permeabilidade intestinal. Pacientes HIV⁺ com diarreia tiveram aumento na absorção de lactulose e diminuição na absorção de manitol, quando comparados com pacientes HIV⁺ e sem diarreia (LIMA e cols., 1997). Adicionalmente, detectamos aumento na relação lactulose/manitol em HIV⁺ com ou sem diarreia, o que valida o teste de permeabilidade intestinal e confirma achados de outros pesquisadores (LIMA e cols., 1997; FLEMING e cols., 1993; TEPPER e cols., 1994; LIM e cols., 1993; KAPEMBWA e cols., 1991). Observamos tanto perda da integridade e alteração na permeabilidade intestinal como diminuição na área de absorção (LIMA e cols., 1997).

Pacientes com *C. parvum* aumentaram em seis vezes a taxa de lactulose/manitol, quando foram comparados com voluntários sadios. Essa diferença foi decorrente do aumento na absorção de lactulose e diminuição na absorção de manitol. Esses dados estão de acordo com os resultados *in vitro* causados pela infecção por *C. parvum* (ADAMS e cols., 1994; PLANCHON e cols., 1994). GOODGAME e cols. (1995) demonstraram

também malabsorção e lesão intestinal associadas com infecção pelo *C. parvum* em pacientes HIV⁺.

Caquexia e diarreia crônica são complicações comuns observadas em pacientes HIV⁺ e refletem diretamente insultos de vários agentes na mucosa intestinal, os quais afetam profundamente a qualidade de vida desses pacientes (ULLRICH e cols., 1989; HARRIMAN e cols. 1989; MILLER e cols., 1988; EHRENPREIS e cols., 1992). Esse estudo mostrou que infecções por *C. parvum* causam severa lesão intestinal, com potenciais conseqüências para o estado nutricional (LIMA e cols., 1997). Adicionalmente, documentamos diminuição na área de absorção e alteração da integridade e lesão da mucosa intestinal em pacientes HIV⁺, mesmo sem diarreia, sugerindo que a infecção pelo HIV causa alterações profundas na mucosa intestinal. Apesar da natureza específica dessas alterações nutricionais nesses pacientes permanecer desconhecida, acreditamos que o impacto das infecções por *C. parvum* e *Microsporidium* spp. na integridade e permeabilidade intestinal mereçam atenção por parte dos clínicos que assistem esses pacientes (LIMA e cols., 1997). Por outro lado, acreditamos, também, que a terapêutica abordando a recuperação da lesão e área de absorção intestinal possam ajudar na melhora da qualidade de vida desses pacientes (LIMA e cols., 1997).

5.4 Impacto da Glutamina na Integridade e Permeabilidade Intestinal

Doenças diarréicas constituem as principais causas de morbidade e mortalidade, principalmente em países em desenvolvimento. BERN e cols. (1992) têm demonstrado estimativas globais da incidência de diarréia, a qual atinge 2,5 episódios por criança-ano de observação. A mortalidade relacionada com essa doença atinge 3,3 milhões de crianças por ano, com idade abaixo de cinco anos. Em Fortaleza, temos documentado uma morbidade de 3,6 episódios de diarréia por criança-ano de observação, o que supera a estimativa média mundial. Essa doença é considerada no nosso meio como uma das principais causas de mortalidade, principalmente em crianças abaixo de 12 meses de vida (LIMA e cols., 1992). As principais complicações resultantes de doenças diarréicas são desidratação e desnutrição (BHAN e cols., 1994; SCHORLING e cols., 1990). A solução de reidratação oral recomendada pela OMS constitui-se numa terapêutica segura e efetiva para a prevenção e tratamento da desidratação; entretanto, seu benefício para a integridade e permeabilidade do epitélio intestinal continua sendo questionado. Recentemente, três experimentações clínicas têm sido realizadas com a finalidade de medir a eficácia de soluções contendo glicose e glutamina nos parâmetros de perdas fecais, severidade e

duração da diarreia (BHAN e cols., 1994). Nas soluções contendo glicose e glutamina, normalmente os dois substratos são absorvidos eficientemente e de uma forma independente, o que pode favorecer o potencial aumento da absorção de sódio e água. Os resultados desses três estudos foram publicados preliminarmente e envolveram pacientes adultos com cólera e dois grupos de crianças com diarreia aguda causada por outros agentes (BHAN e cols., 1994; RIBEIRO e cols., 1994). O estudo com pacientes adultos com cólera utilizou a solução contendo 90 mmol/L de glicose e 90 mmol/L de glutamina (380 mOsm/L). Os dois grupos de crianças utilizaram a solução contendo 50 mmol/L de glicose e 50 mmol/L de glutamina (300 mOsm/L).

Nos pacientes com cólera, ocorreu uma redução significativa nas perdas fecais e duração da diarreia, mas, nos dois grupos com crianças, não houve diferença dos parâmetros clínicos entre a solução da OMS e a outra contendo glutamina e glicose (BHAN e cols., 1994; RIBEIRO e cols., 1994).

Nosso grupo e outros têm demonstrado significativas alterações na integridade e permeabilidade intestinais resultantes de doenças diarreicas e/ou desnutrição (LIMA e cols., 1997; BEHRENS e cols., 1987; NATH e cols., 1992; GOODGAME e cols., 1995). Nesse estudo, temos demonstrado que crianças com diarreia aguda estão associadas com significativa redução

na taxa de latulose/manitol, e que essa taxa estava aumentada, resultante, principalmente, da perda da integridade e lesão da mucosa intestinal. Esses dados são consistentes com outros publicados sobre crianças com diarréia na Gâmbia (BEHRENS e cols., 1987). Nesse estudo, os autores sugerem que a lesão intestinal detectada através do teste de permeabilidade pode ser importante para o desenvolvimento de desnutrição em crianças naquele País (BEHRENS e cols., 1987).

Dois estudos em animais experimentais têm demonstrado o efeito da glutamina no aumento do transporte de sódio, no intestino previamente tratado com uma cepa enteropatogênica de *Escherichia coli* ou *Cryptosporidium* spp. (NATH e cols., 1992; ARGENZIO e cols., 1994). No entanto, o impacto de glutamina na permeabilidade intestinal não foi avaliado nesses estudos.

Estudos em animais e humanos têm mostrado que a estrutura e função do intestino são preservadas quando do uso da terapia parenteral com glutamina. No entanto, o impacto da glutamina por via oral na preservação e recuperação da estrutura e função do intestino nas doenças diarréicas não tem sido ainda avaliado.

Nesse estudo, demonstramos que a solução contendo 90 mmol/L de glicose e 90 mmol/L de glutamina foi eficaz em reduzir a taxa de

lactulose/manitol, sugerindo um efeito desta na recuperação da estrutura e função do intestino na diarreia aguda. A recuperação ocorre na lesão do epitélio resultante da diarreia, mas não na área de absorção intestinal. Consistente com os trabalhos citados anteriormente (BHAN e cols., 1994; RIBEIRO e cols., 1994), essa solução, por outro lado, não foi capaz de diminuir os dias com diarreia quando comparada com a solução-padrão da OMS.

Essa solução, quando utilizada em crianças sem diarreia, mas com alto risco para outros episódios de diarreia e/ou desnutrição, mostrou-se também eficaz na recuperação da lesão do epitélio, mas não na área de absorção intestinal. O efeito protetor intestinal da glutamina demonstrado nesses dois grupos experimentais é bastante promissor e encoraja o delineamento de novos experimentos para avaliar melhor o impacto dessa substância na prevenção e tratamento de doenças diarreicas e outras patologias intestinais comumente associadas com desnutrição.

CONCLUSÕES

6 CONCLUSÕES

- 6.1 Esse estudo demonstrou o desenvolvimento e síntese química de um composto derivado da glutamina, alanil-glutamil-glutamina, o qual mostrou-se estável em meio aquoso e ácido.
- 6.2 Os resultados demonstraram que glutamina e alanina são mais eficazes na indução da absorção intestinal de sódio do que a glicose.
- 6.3 A SRO-Gln foi mais eficaz do que a SRO-OMS ou SR na indução de absorção intestinal de eletrólitos e água.
- 6.4 A SRO-Gln foi mais eficaz do que a SRO-OMS ou SR na indução da absorção intestinal de eletrólitos e água na diarreia secretória induzida pela toxina da cólera
- 6.5 Alanil-glutamil-glutamine foi mais eficaz, em baixa concentração, na indução da absorção intestinal de água e potássio do que a SRO-Gln ou a SRO-OMS.

- 6.6 O método de HPLC-PAD foi sensível e acurado para detecção de mono e dissacarídeos. Ademais, o método mostrou-se adequado para investigar mudanças na permeabilidade intestinal de crianças e adultos HIV⁺ com e sem diarreia.
- 6.7 Os resultados mostraram que crianças com diarreia aguda apresentam lesão do epitélio intestinal em relação ao grupo-controle sadio.
- 6.8 Pacientes HIV⁺ foram associados com lesão e disfunção do intestino delgado mesmo sem apresentar sintoma de diarreia.
- 6.9 Pacientes HIV⁺ com diarreia, especialmente com cryptosporidiosis ou microsporidiosis, apresentaram alto grau de lesão e disfunção intestinal.
- 6.10 A solução de reidratação oral à base de glutamina parece recuperar a mucosa intestinal lesada em crianças com diarreia e crianças com alto risco para novos episódios de diarreia e/ou desnutrição.

REFERÊNCIAS

7- REFERÊNCIAS

1. AABAKKEN, L. Cr-Ethylenediaminetetraacetic acid absorption test: methodologic aspects. **Scand. J. Gastroenterol.** 24:351-358, 1989.
2. ADIBI S.A. Intestinal transport of dipeptides in man: relative importance of hydrolysis and intact absorption. **J. Clin. Invest.** 50:2266-2275, 1971.
3. ADAMS, R.B., GUERRANT, R.L., ZU, S., et al. *Cryptosporidium parvum* infection of intestinal epithelium: Morphologic and functional studies in an *in vitro* model. **J. Infect. Dis.** 169:170-177, 1994.
4. AHMED, A., TAYLOR, P.M., RENNIE, M.J. Characteristics of glutamine transporte in rat sarcolemmal vesicles from rat skeletal muscle. **Am. J. Physiol.** 259:E284-E289, 1990.
5. AINSWORTH, M., ERIKSEN, J., RASMUSSEN, J.W., SCHAFFALITZKY-DE-MUCKADELL, O.B. Intestinal permeability of ⁵¹Cr-labelled ethylenediaminetetra-acetic acid in patients with Crohn's diseases and their health relatives. **Scand. J. Gastroenterol.** 24: 993-998, 1989.

6. ALVERDY, J.C., AOYS, E., WEISS-CARRINGTON, P. et al. The effect of glutamine-enriched TPN on gut immune cellularity. **J. Surg. Res.** 52:34-38, 1992.
7. ANDERSON, N.M., BENNETT, F.I., ALLEYNE, G.A.O. Ammonia production by the small intestine of the rat. **Biochem. Biophys. Acta** 437:238, 1976.
8. ANDRE, F., ANDRE, C., EMMERY, Y. et al. Assessment of the lactulose-mannitol test in Crohn's disease. **Gut** 29:511-515, 1988.
9. ARDAWI, M.S.M. The transport of glutamine and alanine into rat colonocytes. **Biochem. J.** 238:131-135, 1986.
10. ARGENZIO, R.H., RHOADS, J.M., ARMSTRONG M.M., GOMEZ, G. Glutamine Stimulates prostaglandin-sensitive $\text{Na}^+\text{-H}^+$ exchange in experimental porcine cryptosporidiosis. **Gastroenterology** 106:1418-1428; 1994.
11. ASHY, A.A., ARDAWI, M.S.M. Glucose, glutamine, and ketone body metabolism in human enterocytes. **Metabolism** 37:602-609, 1988.
12. AUSTGEN, T.R., CHEN, M.K., DUDRICK, P.S., et al. Cytokine regulation of intestinal glutamine metabolism in vivo. **Am. J. Surg.** 163:174-180, 1992.

13. AUSTGEN, T.R., SALLOUM, R.M., FLYNN, T.C., et al. The effects of endotoxin on splanchnic metabolism of glutamine and related substrates *in vivo*. **J. Trauma** 31:742-752, 1991.
14. BAO, Y., SILVA, T.M.J., GUERRANT, R.L., LIMA, A.A.M., FOX, W. Direct analysis of mannitol, lactulose and glucose in urine samples by high performance anion-exchange chromatograph with pulse amperometric detection: clinical evaluation of intestinal permeability in human immunodeficiency virus infection. **J. Chromatog B. Biomedical Appl.** 685:105-112, 1996.
15. BARBER, A.E., JONES, W.G., MINEI, J.P. et al. Glutamine or fiber supplementation of a defined formula diet: impact on bacterial translocation, tissue composition, and response to endotoxin. **J. Parenter. Enteral Nutr.** 14:335-343; 1990.
16. BEHRENS, R., DOCHERTY, H., ELIA, M., NEALE, G. A simple enzymatic assay for urinary lactulose. **Clin Chim. Acta** 134:361-367, 1983.
17. BEHRENS, R., LUNN, P.G., NORTHROP, C.A., et al. Factors affecting the integrity of the intestinal mucosa of Gambian children. **Am. J. Clin. Nutr.** 45:1433-1441, 1987.

18. BERN, C., MARTINES, J., DE ZOYSA, I., GLASS, R.I. The magnitude of the global problem of diarrheal disease: a ten-year update. **Bull World Health Organ.**, 70:705-714, 1992.
19. BJARNASON, I., O' MORAUN, C., LEVI, A.J., PETERS, T.J. Absorption of Cr-labelled ethylenediaminetetra-acetate in inflammatory bowel disease. **Gastroenterology** 85:318-322, 1983.
20. BJARNASON, I., PETERS, T. J., VEALL, N.A. Persistent defect in coeliac disease demonstrated by a Cr-labelled EDTA absorption test. **Lancet** i:323-325, 1983.
21. BJARNASON, I., ZANELLI, G., PROUSE, P. et al. Effect of non-steroidal antiinflammatory drugs on the human small intestine. **Gut** 27:1292-1297, 1986.
22. BHAN, M.K., MAHALANABIS, D., FONTAINE, O., PIERCE, N.F. Clinical trials of improved oral rehydration salt formulations: a review. **Bull. World Health Org.** 72:945-955, 1994.
23. BODE, B.P., TAMARAPPOO, B.K., MAILLIARD, M., et al. Characteristics and regulation of hepatic glutamine transport. **J. Parenter. Enteral Nutr. Suppl.** 14:51S-55S, 1990.
24. BRANDL, M., SAILER, D., LANGER, K., et al. Parenteral nutrition with an amino acid solution containing a mixture of dipeptides in

- humans. In ADIBI SA, FEKL W, FRIST P et al, Eds. Dipeptides as new substrates in nutrition therapy. **Karger: Basal, Switzerland**, 103-17, 1987.
25. BRASITUS, T.A., DUDEJA, P.K., WORMAN, H.J., FOSTER, E.S. The lipid fluidity of rat colonic brush border membrane vesicles modulates Na:H exchange and osmotic water permeability. **Biochim. Biophys. Acta** 855:16-24, 1986.
26. BRUNSER, O., REID, A., MONCKBERG, F., MACCIONI. A., CONTRERA, I. Jejunal biopsies in infantil malnutrition with special reference to mitotic index. **Pediatrics** 38:605, 1966.
27. BULUS, M.N., ALUMRAD, N.N., GHISHAN, F.K. Characteristics of Glutamine transport in dog jejunal brush border membrane vesicles. **Am. J. Physiol.** 257:G80-G85, 1989.
28. BURKE, D., ALVERDY. J.C., AOYS, E. et al. Glutamine supplemented TPN improves gut immune function. **Arch. Surg.** 124: 1396-1399, 1989.
29. CASELLAS, F., AGUADE, S., SORIANO, B. et al. Intestinal permeability to Tc diathylenetriaminopentaacetic acid in inflammatory bowel disease. **Am. J. Gastroenterol.** 81:767-770, 1986.

30. CEREIJIDO, M., PONCE, A., GONZALEZ-MARISCAL, L. Tight junctions and apical/basolateral polarity. **J. Membr. Biol.** 110:1-9, 1988.
31. CERSOSIMO, E., WILLIAMS, P.E, RADOSEVICH, P.M, et al. Role of glutamine in adaptations in nitrogen metabolism during fasting. **Am. J. Physiol.** 250:E622-E628, 1986.
32. CHADWICK, V.S., PHILLIPS, S.F, HOFFMAN, A.F. Measurement of intestinal permeability using low molecular weight polyethylene glycols. **Gastroenterology** 73:241-51, 1977.
33. CHATTERJEE, H.N. Control of vomiting in cholera and oral replacement fluid. **Lancet** ii:1063-1068, 1953.
34. CHRISTENSEN, H.N. Role of amino acid transport and countertransport in nutrition and metabolism. **Phys. Rev.** 70:43-77, 1990.
35. CITI, S., SABANAY, H., JAKES, R., GEIGER, B., KENDRICK JONES, J. Cingulin, a peripheral component of tight junctions. **Nature** 333:272-276, 1988.
36. CLARKSON, T.W. The transport of salt and water across isolated rat ileum. **J. Gen. Physiol.** 50:695-727, 1967.

37. COBDEN, I., DICKINSON, R.I., ROTHWELL, J., AXON, A.T.R. Intestinal permeability assessed by excretion ratios of two molecules: results in coeliac disease. **Br. Med. J.** i:1060, 1978.
38. COBDEN, I., HAMILTON, I., TOTHWELL, J., AXON, A.T.R. Cellobiose/mannitol test: physical proprieties of probe molecules and influence of extraneous factors. **Clin. Chim. Acta.** 148:53-62, 1985.
39. COBDEN, I., ROTHWELL, L.J., AXON, A.T.R. Intestinal permeability and screening tests for coeliac disease. **Gut** 21:512-518, 1980.
40. COLTART, R.S., HOWARD, G.C., WRAIGHT, E.P., BLEEHAND, N.M. The effect of hyperthermia and radiation on small bowel permeability using Cr-EDTA and C-Mannitol in man. **Int. J. Hyperthermia** 4:467-77, 1988.
41. COOK, G.C, MENZIES, I.S. Intestinal absorption and unmediated permeation of sugars in post-infective tropical malabsorption (tropical sprue). **Digestion** 33:109-116, 1986.
42. COOPER, B.T., UKABAM, S.O., O'BRIEN, I.A., HARE, J.P., CORRALL, R.J. Intestinal permeability in diabetic diarrhoea. **Diabetic Med.** 4:49-52, 1987.

43. DALQVIST, A. Method for assay of intestinal disaccharidases. **Anal. Biochem.** 7:18-25, 1964.
44. DARMAUN, D., MESSING, B., JUST, B., et al. Glutamine metabolism after small intestinal resection in humans. **Metabolism.** 40:42-44, 1991.
45. DARROW, D.C. The retention of electrolyte during recovery from severe dehydration due to diarrhea. **J. Pediatr.** 28:515-540, 1946.
46. DARROW, D.C., PRATT, E.L., FLETT, J.R.J., GAMBLE, A.H., WIESE, H.F. Disturbances of water and electrolytes in infantile diarrhea. **Pediatrics** 3:129-129, 1949.
47. DAVIS, G., SANTA ANA, C., MORAWSKI, S., FORDTRAN, J. Permeability characteristics of human jejunum, ileum, proximal colon and distal colon: results of potential difference measurements and unidirectional fluxes. **Gastroenterology** 83:844-850, 1982.
48. DE, S.N., CHATTERJE, D.N. Na experimental study of the mechanism of action of *Vibrio cholerae* on the intestinal mucous membrane. **J. Path. Bact.** 66:559-562, 1953.
49. DELAHUNTY, T., HOLLANDER, D. A new liquid-chromatographic method for measuring polyethylene glycol in urine. **Clin. Chem.** 32: 351-353, 1986.

50. DRUML, W., LOCHE, H., ROTH, E. et al. Utilization of tyrosine dipeptides and acetyltyrosine in normal and uremic humans. **Am. J. Physiol.** 260:E280-E285, 1991.
51. DUFFEY, M.E., HAINAN, B., HO, S., BENTSEL, C.J. Regulation of epithelial tight junction permeability by cyclic AMP. **Nature** 294:451-453, 1981.
52. EAGLE, H. Nutritional needs of mammalian cells in tissue culture. **Science** 122:501-504, 1935.
53. EHRENPREIS, E.D., GANGER, D.R., KOCHVAR, G.T. et al. D-xylose malabsorption: characteristic finding in patients with the AIDS wasting syndrome and chronic diarrhea. **J. Acquir. Immune Defic. Syndr.** 5:1047-1050, 1992.
54. ELIA, M., BEHRENS, R., NORTHROP, C., WRAIGHT, P., NEALE, G. Evaluation of mannitol, lactulose and Cr-labelled ethylenediaminetetra-acetate as markers of intestinal permeability in man. **Clin. Sci.** 73:197-204, 1987.
55. ELLIOTT, E.J., WATSON, A.J.M., WALKER-SMITH, J.A., FARTHING, M.J.G. Search for the ideal oral rehydration solution: studies in a model of secretory diarrhoea. **Gut** 32:1341-1320, 1991.

56. FARMER, R., MICHENER, W. Prognosis of Crohn's disease in childhood and adolescence. **Dig. Dis. Sci.** 24:752, 1979.
57. FARQUHAR, M.G., PALADE, G.E. Junctional complexes in various epithelia. **J. Cell Biol.** 17:375-412, 1963.
58. FIELD, M. Intestinal secretion: effect of cyclic AMP and its role in cholera. **N. Engl. J. Med.** 284:1137-1144, 1971.
59. FINBERG, L., HARPER, P.A., HARRISON, H.E., SACK, B. Oral rehydration for diarrhea. **J. Pediatr.** 101:497-499, 1982.
60. FISHER, R.B., PEARSONS, D.S. Glucose movement across the wall of the rat small intestine. **J. Physiol.** 119:210-223, 1953.
61. FLEMING, S.C., KAPEMBWA, M.S, LAKER, M.F. et al . Rapid and simultaneous determination of lactulose and mannitol in urine, by HPLC with pulsed amperometric detection, for use in studies of intestinal permeability. **Clin. Chem.** 36:797-799, 1990.
62. FLEMING, S.C., KYNASTON, J.A., LAKER, M.F., et al. Analysis of multiple sugar probes in urine plasma by high-performance anion-exchange chromatography with pulsed electrochemical detection. **J. Chromatogr.** 640:293-297, 1993.

63. FORD, R.P.K., MENZIES, I.S., PHILLIPIS, A.D., et al. Intestinal sugar permeability: relationship to diarrhoeal disease and small bowel morphology. **J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.** 4:568-574, 1985.
64. FORDTRAN, J.S. Stimulation of active and passive sodium absorption by sugars in the human jejunum. **J. Clin. Invest.** 47:728-737, 1975.
65. FORDTRAN, J.S., RECTOR, F.C., EWTON, M.F., SOTER, N., KINNEY, J. Permeability characteristics of the human small intestine. **J. Clin. Invest.** 44:1935-4944, 1965.
66. FOX, A.D., KRIPKE, S.A., BERMAN, J.M., et al. Dexamethasone administration induces increased glutamine specific activity in the jejunum and colon. **J. Surg. Res.** 44:391-396, 1988.
67. FOX, A.D., KRIPKE, S.A., De PAULA, J., et al. Effect of a glutamine supplemented enteral diet on methotrexate-induced enterocolitis. **J. Parenter. Enteral Nutr.** 12:325-331, 1988.
68. FROMTER, E, DIAMOND, J. Route of passive ion permeation in epithelia. **Nature New Biol.** 235: 9-13, 1972.
69. GEBHARDT, R., KLEEMANN, E. Hormonal regulation of aminoacid transport system N in primary cultures of rat hepatocytes. **Eur. J. Biochem.** 16:339-344, 1987.

70. GHISHAN, F.K., SUTTER, W., SAID, H., et al. Glutamine transport by rat basolateral membranes. **Biochem. Biophys. Acta.** 979:77-81, 1989.
71. GOODGAME, R.W., KIMBALL, K. OU C.N, et al. Intestinal function and injury in acquired immunodeficiency syndrome-related cryptosporidiosis. **Gastroenterology** 108:1075-1082, 1995.
72. GRANT, J. Use of Glutamine in total parenteral nutrition. **J. Surg.** 44:506-513, 1988.
73. GRONDAHL, M.L., MUNCK, L.K., SKADHAUGE, E. Regional differences in the effect of mucosal glucose and amino acids on ion transport in normal and cholera toxin-stimulated porcine small intestine. **Scand. J. Gastroenterol.** 32:478-484, 1997
74. GRYBOSKI, J.D., THAYER, W.R., GABRIELSON, I.W., SPIRO, H.M. Disacchariduria in gastrointestinal disease. **Gastroenterology** 45:633-637, 1963.
75. HAMMARQVIST, F., WERNERMAN, J., VON DER DECKEN, A., et al. Alanyl-glutamine counteracts the depletion of free glutamine and the postoperative decline in protein synthesis in skeletal muscle. **Ann. Surg.** 212:637-644, 1990.

76. HANSON, P.J., PARSON, S.D.S. Metabolism and transport of glutamine and glucose in vascularly perfused rats small intestine. **Biochem. J.** 166:509-519, 1977.
77. HARRIMAN, G.R., SMITH, P.D., HORNE, M.K., et al. Vitamin B12 malabsorption in patients with acquired immunodeficiency syndrome. **Arch. Intern. Med.** 149:2039-2041, 1989.
78. HARRISON, H.E. The treatment of diarrhea in infancy. **Pediatr. Clinics N. Am.** 1:335-348, 1954.
79. HEITMAN, R.N., BERGMANN, A.E. Glutamine metabolism interorgan transport and glucogenicity in the sheep. **Am. J. Physiol.** 234:E197-E203, 1978.
80. HERSKOWITZ, K., BODE, B.P., BLOCK, E.R., et al. Characterization of L-glutamine transport by pulmonary artery endothelial cells. **Am. J. Physiol.** 360:L241-L246, 1991.
81. HERSKOWITZ, K., MARTIN, T.D., AUSTGEN, T.R., et al. The effects of hypothermic anesthesia on gut fuel metabolism. **Surg. Forum** 41:300-302, 1990.
82. HIRSCHHORN, N. The treatment of acute diarrhea in children: an historical and physiological perspective. **Am. J. Clin. Nutr.**, 33:637-663, 1980.

83. HIRSCHHORN, N., KINZIE, J.L., SACHAR, D.B., NORTHRUP, R.S., TAYLOR, J.O., AHMAD, S.Z., et al. Decrease in net stool output in cholera during intestinal perfusion with glucose-containing solutions. **N. Engl. J. Med.** 279:276-181, 1968.
84. HOBBER, R. Ueber resorption im darm. **Plügers Arch. Gesamte Physiol. Menschen Tiere** 56:199-214, 1901.
85. HOBBER, R., HOBBER, J. Experiments on the absorption of organic solutes in the small intestine of rats. **J. Ceil. Comp. Physiol.** 10:401-410, 1937.
86. HOLLANDER, D., VADHEIM, C.M., BRETTHOLZ, E., et al. Increased intestinal permeability in patients with Crohn's diseases and their relatives. **Ann. Inten Med.** 105:883-885, 1986.
87. HOLLANDER, D., RICKETTS, D, BOYD, C.A.R. Importance of probe molecular geometry in determining intestinal permeability. **Can. J. Gastroenterol.** 2 (Suppl. A), 35-38, 1988.
88. HUDSON, J. Solid phase peptide synthesis. **J. Org. Chem.** 53:617-624, 1988.
89. HWANG, T.L., O'DWYER, S.T., SMITH, R.J., et al. Preservation of small bowel mucosa using glutamine-enriched parenteral nutrition. **Surg. Forum** 38:56, 1987.

90. JACKSON, P.G., LESSOF, M.H., BAKER, R.W., FERRETT, J., MACDONALD, D.M. Intestinal permeability in patients with eczema and food allergy. **Lancet** i: 1285-1286, 1981.
91. JACOBS, D.O., EVANS, D.A., O'DWYER, S.T., et al. Disparate effects of 5-fluorouracil on the ileum and colon of enterally fed rats with protection by dietary glutamine. **Surg. Forum** 38:45-47, 1987.
92. JENKINS, R.T., GOODACRE, R.L., ROONEY, P.J., et al. Studies of intestinal permeability in inflammatory diseases using polyethylene glycol 400. **Clin. Biochem.** 19:298-302, 1986.
93. JENKINS, R.T., RAMAGE, J.R., JONES, D.B., et al. Small bowel and colonic permeability to Cr-EDTA in patients with active inflammatory bowel disease. **Clin. Invest. Med.** 11:151-155, 1988.
94. JENKINS, A.P., TREW, D.R., CRUMP, B.J., et al. Do non-steroidal antiinflammatory drugs increase colonic permeability? **Gut** 32:66-69, 1991.
95. JUBY, L.D., ROTHWELL, J., AXON, A.T.R. Lactulose/mannitol test: an ideal agree test for coeliac disease. **Gastroenterology** 96:79-85, 1989.
96. KAPEMBWA, M.S., FLEMING, S.C., SEWANKAMBO, N., et al. Altered small intestinal permeability associated with diarrhea in human

- immuno-deficiency-virus-infected Causasian and African subjects. **Clin. Sci.** 81:327-334, 1991.
97. KILBERG, M.S., HANDLOGTEN, M.E., CHRISTENSEN, H.N. Characteristics of an amino acid transport system in rat liver for glutamine, asparagine, histidine, and closely related analogs. **J. Biol. Chem.** 355:4011-4019, 1980.
98. KIRKWOOD, B.R. Ed. Essentials of medical statistics. Blackwell Scientific Publications, London, pgs 234, 1988.
99. KLIMBERG, V.S., SALLOUM, R.M., KASPER, M., et al. Oral glutamine accelerats healing of the small intestine and improves outcome following whole abdominal radiation. **Arch. Surg.** 125:1040-1045, 1990.
100. KLIMBERG, V.S., SOUBA, W.W., DOLSON, D.J., et al. Prophylactic glutamine protects the intestinal mucosa from radiation injury. **Cancer** 66:62-68, 1990.
101. KLIMBERG, V.S, SOUBA, W.W., SITREN, H., et al. Glutamine-enriched total parenteral nutrition supports gut metabolism. **Surg. Forum** 40:175-177, 1989.
102. KREBS, H.A. Metabolism of amino acids. IV. The synthesis of glutamine form glutamic acid and ammonia and the enzymatic

- hydrolysis of glutamine in animal tissues. **Biochem. J.** 33:1951-1969, 1935.
103. KREBS, H.A. Glutamine metabolism in the animal body. In Mora J, Palacios R (eds): Glutamine: Metabolism, Enzymology, and Regulation. **New York, Academic Press** 319-329, 1980.
104. LAKER, M.F., MENZIES, I.S. Increase in human intestinal permeability following ingestion of hypertonic solutions. **J. Physiol.** 265:881-894, 1977.
105. LISTER, M.A Letter. **Philos. Trans. R. Soc. London.** 8:6060-6065, 1673.
106. LIFSCHITZ, C.H., MAHONEY, D.H. Low dose methotrexate induced changes in intestinal permeability determined by polyethylene glycol polymers. **J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.** 9:301-306, 1989.
107. LIM, G., MENZIES, I.S., LEE, C.A., et al. Intestinal permeability and function in patients infected with human immunodeficiency virus. **Scand. J. Gastroenterol.** 28:573-80, 1993.
108. LIMA, A.A.M. Cholera: Molecular epidemiology, pathogenesis, immunology, treatment, and prevention. **Curr. Opin. Infect. Dis.** 7:592-601, 1994.

109. LIMA, A.A.M., FANG, G., SCHORLING, J.B., DE ALBUQUERQUE, L., MCAULIFFE, J.F., MOTA, S., LEITE, R., GUERRANT, R.L. Persistent diarrhea in northeast Brazil: etiologies and interactions with malnutrition. **Acta Paediatr.** 381:39-44, 1992.
110. LIMA, A.A.M., GUERRANT, R.L. Persistent diarrhea in children: Epidemiologic, risk factors, pathophysiology, nutritional impact and management. **Epidemiol. Rev.** 14:222-242, 1992.
111. LIMA, A.A.M., KHIN-MAUNG, U., GUERRANT, R.L. The physiologic basis for oral rehydration therapy and its improvements. In: Guerrant, R.L, Souza A.A; Nations, M, eds. At the Edge of Development: Health Crisis in a Transitional Society. **Oxford, UK: Caroline Academic** 109-125, 1996.
112. LIMA, A.A.M., MAHALANABIS, D. New approaches to oral rehydration therapy. **Baillieres Clin. Trop. Med. Com. Dis.**, 3:627-636, 1988.
113. LIMA, A.A.M., SILVA, T.M., GIFONI, A.M., et al. Mucosal injury and disruption of intestinal barrier function in HIV-infected individuals with and without diarrhea and cryptosporidiosis in northeast Brazil. **Am. J. Gastroenterol.** 92:1861-1866, 1997.

114. LIMA, A.A.M., SOARES, A.M., FREIRE-JUNIOR, J.E., GUERRANT, R.L. Cotransport of sodium with glutamine, alanine and glucose in the isolated rabbit ileal mucosa. **Braz. J. Med. Biol. Res.** 25:637-640, 1992.
115. LIMA, A.A.M., SOARES A.M., FREIRE J.E. Jr., et al. Glutamine increases intestinal sodium absorption despite cholera toxin-induced secretion: a potential improved oral rehydration therapy. **Proceedings of The 27th Joint Conference US-Japan Cooperative Medical science Program, Cholera and Related Diarrheal Diseases**, National Institutes of Health, Betesda, MD, 140-144, 1991..
116. LOCHS, H., HUBL, W., GASIC, S., et al. Glycylglutamine: metabolism and effects on organ balances of amino acids in postabsorptive and starved subjects. **Am. J. Physiol.** 282:E-155-60, 1992.
117. LOWE, D.L., BENFELL, K., SMITH, R.J., et al. Glutamine-enriched total parenteral nutrition is safe in normal humans. **Surg. Forum** 40:9-11, 1989.
118. MA, T.Y., HOLLANDER, D., KRUGLIAK, P., KATZ, K. PEG-400, a hydrophic molecular probe for measuring intestinal permeability. **Gastroenterology** 98:39-46, 1990.

119. MADARA, J.L. Intestinal absorptive cell tight junctions are linked to the cytoskeleton. **Am. J. Physiol.** 253:C171-C175, 1987.
120. MADARA, J.L., PARKOS, C., COLGAN, S., et al. The movement of solutes and cells across tight junctions. **Ann. N. Y. Acad. Sci.** 664:47-60, 1992.
121. MADARA, J.L., STAFFORD, J. Interferon-gamma directly affects barrier function of culture intestinal epithelial monolayers. **J. Clin. Invest.** 83:724-727, 1989.
122. MARCIAL, M.A., CARLSON, S.L., MADARA, J.L. Partitioning of paracellular conductances along the ileal crypt-villus axis: a hypothesis based structural analysis with detailed consideration to tight-junction structure- function relationships. **J. Membr. Biol.** 80:59-70, 1984.
123. MARTINES, D. MORRIS, A.I., GILMORE, I.T. , et al. Comparison between cellobiose/mannitol and ⁵¹Cr-labeled ethylenediaminetetraacetate absorption tests in the detection of coeliac disease. **Clin. Sci.** 75:375-378, 1988.
124. MAXTON, D.G., BJARNASON, I., REYNOLDS, A.P., et al. Lactulose, Cr-labelled ethylenediaminetetra-acetate, L-rhamnose and polyethyleneglycol 400 as probe markers for assessment *in vivo* of human intestinal permeability. **Clin. Sci.** 71:71-80, 1986.

125. MAXTON, D.G., CATT, S.D., MENZIES, I.S. Combined assessment of intestinal disaccharidases in congenital asucrasia by differential urinary disaccharide excretion. **J. Clin. Pathol.** 43:406-409, 1990.
126. MAXTON, D.G., MENZIES, I.S., SLAVIN, B., THOMPSON, R.P.H. Small intestinal function during enteral feeding and starvation in man. **Clin. Sci.** 77:401-406, 1989.
127. MCCANCE, R.A., MADDERS, K. Comparative rates of absorption from human intestine. **Biochem. J.** 24:795-804, 1930.
128. MCNEIL, P.L., ITO, S. Gastrointestinal cell plasma membrane wounding and resealing *in vivo*. **Gastroenterology** 96:1238-1248, 1989.
129. MEDDINGS, J.B. Lipid permeability of the intestinal microvillus membrane may be modulated by membrane fluidity in the rat. **Biochim. Biophys. Acta** 984:158-166, 1989.
130. MEISTER, A. Biochemistry of amino acids. Vol 1. New York: **Academic. Press.**, 1-57, 1966.
131. MENZIES, I.S. Urinary excretion of sugars related to oral administration of disaccharides in adult coeliac disease. **Clin. Sci.** 42:18P, 1972.

132. MENZIES, I.S. Alimentary disacchariduria in adults related to the osmolality of ingested solution. **Biochem. J.** 126:19-20, 1972.
133. MENZIES, I.S. Absorption of intact oligosaccharide in health and disease. **Biochem. Soc. Trans.** 2:1024-1027, 1974.
134. MENZIES, I.S. Transmucosal passage of inert molecules in health and disease. In: Skadhauge, E. & Heintze, K., Eds. Intestinal absorption and secretion. Falk Symposium 36. Lancaster: MTP Press Ltda, 527-543, 1983.
135. MENZIES, I.S. JENKINS, A.P., HEDUAN, E., et al. The effect of poorly absorbed solute on intestinal absorption. **Scand. J. Gastroenterol.** 35:1257-1264, 1990.
136. MENZIES, I.S., LAKER, M.F., POUNDER, R.E., et al. Abnormal intestinal permeability to sugars in villous atrophy. **Lancet** ii:1107-1109, 1979.
137. MILKS, L.C., BRONTOLI, M.J., CRAMER, E.B. Epithelial permeability and the transepithelial migration of human neutrophils. **J. Cell. Biol.** 96:1241-1247, 1986.
138. MILLER, A.R., GRIFFIN, G.E., BATMAN, P., et al. Jejunal mucosal architecture and fat absorption in male homosexuals infected with human immunodeficiency virus. **Q. J. Med.** 69:1009-1019, 1988.

139. MOORE, R., CARLSON, S., MADARA, J.L. Villus contraction aids repair of intestinal epithelium after injury. **Am. J. Physiol.** 357:G274-G283, 1989.
140. MULLIN, J.E., O'BRIEN, T.G. Effects of tumour promoters on LLC-PK renal epithelial tight Junctions and transepithelial fluxes. **Am. J. Physiol.** 251:C597-C602, 1986.
141. NAFTALIN, R.J., TRIPATHI, S. Passive water flows draw across rabbit ileum by osmotic, hydrostatic and electrical gradients. **J. Physiol.** 360:27-50, 1985.
142. NALIN, D.R., CASH, R.A., ISLAM, R., MOLLA, M. Phillips R.A. Oral maintenance therapy for cholera in adults. **Lancet** ii:370-373, 1968.
143. NATH, S.K, DECHELOTTE, P., DARMAUN, D., et al. {¹⁵n} and {¹⁴C} glutamine fluxes across rabbit ileum in experimental diarrhea. **Am. J. Physiol.** 262:G312-G318, 1992.
144. NELL, G., RUMMELL, W., WANITSCHKE, R. Characterization of the paracellular pathway by test moleculares in the colonic mucosa. In: Intestinal permeation. Kramer, H., ed. Hoeschst workshop 4. Amsterdam: **Excerpta Medica**, 413-418, 1977.
145. NEWSHOLME, E.A., NEWSHOLME, P., PHIL, D., CURI, R., CHALLONER, M.A., et al. A role for muscle in the immune system

- and its importance in surgery, trauma, sepsis, and burns. **Nutrition.** 4:261-268, 1988.
146. NEWSHOLME, E.A., PARTY-BILLING, M. Properties of glutamine release from skeletal muscle and its importance to the immune system. **J. Parenter. Enteral Nutr. Suppl.** 14:63S-67S, 1990.
147. NOONE, C., MENZIES, I.S., BANATVALA, J.E., SCOPES, J.W. Intestinal permeability and lactose hydrolysis in human rotaviral gastroenteritis assessed simultaneously by non-invasive differential sugar permeation. **Eur. Clin. Invest.** 16:217-225, 1986.
148. O'DWYER, S.T., SCOTT, T., SMITH, J.R., WILMORE, D.W. 5-fluorouracil toxicity on small intestinal mucosa but not white blood cells is decreased by glutamine (abstract). **Clin. Res.** 35:369, 1987.
149. OSTERHOUT, W.J.V. The permeability of protoplasm to ions and the theory of antagonism. **Science** 35:112-115, 1912.
150. PACHECO, S. HILLIER, K., SMITH, C. Increased arachidonic acid levels in phospholipids of human colonic mucosa in inflammatory bowel disease. **Clin. Sci.** 73:361-364, 1987.
151. PALANT, C.E., DUFFY, M.E., MOOKERJEE, B.K., S, BENTZEL, C.J. Ca^{++} regulation of tight junction permeability and structure in necturus gallbladder. **Am. J. Physiol.** 245:C203-C212, 1983.

152. PAPPENHEIMER, J.R. Paracellular intestinal absorption of glucose, creatinine and mannitol in normal animals: relation to body size. **Am. J. Physiol.** 259:G290-G299, 1990.
153. PAPPENHEIMER, J.R., RENKIN, E.M., BORRERO, L.M. Filtration, diffusion and molecular sieving through capillary membranes. A contribution to the pore theory of capillary permeability. **Am. J. Physiol.** 167:13-46, 1951.
154. PELED, Y., WATZ, C & GILAT. T. Measurement of intestinal permeability using Cr-EDTA. **Am. J. Gastroenterol.** 80:770-773, 1985.
155. PEARSON, A.D.J., EASTHAM, E.J., LAKER, M.F., CRAFT, A.W., NELSON. R. Intestinal permeability in children with Crohn's disease and ulcerative colitis. **Br. Med. J.** 285:20-21, 1982.
156. PHILIPSEN, E.K., BATSBERG, W., CHRISTENSEN, A.B. Gastrointestinal permeability to polyethylene glycol: an evaluation of urinary recovery of an oral load of polyethylene glycol as a parameter of intestinal permeability in man. **Eur. J. Invest.** 18:139-145, 1988.
157. PIERCE, N.F., BANWELL, J.G., RUPAK, D.M., MITRA, R.C. CARANASOS, G.J., KEIMOWITZ, R.I., et al. Effect of intragastric

- glucose-electrolyte infusion upon water and electrolyte balance in Asiatic cholera. **Gastroenterology** 55:333-343, 1968.
158. PIGNATA, C., BUDILLON, G., MONACO, G., et al. Jejunal bacterial overgrowth and intestinal permeability in children with immunodeficiency syndromes. **Gut** 31:879-882, 1990.
159. PINKUS, L.M., WINDMUELLER, H.G. Phosphate-dependent glutaminase of small intestine and localization and role in intestinal glutamine metabolism. **Arch. Biochem. Biophys.** 182:506-517, 1977.
160. PLANCHON, S.M., MARTINS, C.A.P., GUERRANT, R.L., et al. Regulation of intestinal epithelial barrier function by TGF-beta 1: Evidence for its role in abrogating the effect of a T cell cytokine. **J. Immunol.**, 153:1-10, 1994.
161. PLUMLEY, D.A., AUSTGEN, T.R., SALLOUM, R.M., SOUBA, W.W. Role of the lungs in maintaining amino acid homeostasis. **J. Parenter. Enteral Nutr.** 14:569-573, 1990.
162. PATRA, F.C., SACK, D.A., ISLAM, A., et al. Improved oral rehydration formula with L-alanine and glucose in cholera and cholera-like diarrhea: a controlled trial. **Br. Med. J.** 298:1353-1356, 1989.

163. PUNJABI, N.H., KUMULA, S., RASIDI, C., et al. Glutamine supplemented ORS is superior to standard citrate glucose ORS for maintenance therapy of adult cholera patients in jakarta (abstract). **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 45(Suppl):114, 1991.
164. REID, E.W. Report on experiments upon absorption without osmosis. **Br. Med. J.** i:323-326, 1892.
165. REID, E.W. Intestinal absorption of solutions. **J. Physiol.** 27:241-256, 1902.
166. RIBEIRO, H.J.R., RIBEIRO, T., MATTOS, A., et al. Treatment of acute diarrhea with oral rehydration solutions containing glutamine. **J. Am. Coll. Nutr.** 13:251-5, 1994.
167. RHOADS, J.M., KEKU, E.O., BENNETT, L.E., QUINN, J., LEECE, J.G. Development of L-glutamine-stimulated electroneutral sodium absorption in piglet jejun. **Am. J. Physiol.** 259:G99-G107, 1990.
168. RHOADS, J.M., KEKU, E.O., QUINN, J., et al. L-Glutamine stimulates jejunal sodium and chloride absorption in pig rotavirus enteritis. **Gastroenterology** 100:683-691, 1991.
169. ROEDIGER, W.E.W. Utilization of nutrients by isolated epithelial cells of the rat colon. **Gastroenterology** 83:424-429, 1982.

170. ROSE, W.C. The nutritive significance of the amino acids. **Physiol. Rev.** 18:109-136, 1938.
171. RYBOLT, A.H., LAUGHON, B.E., BENNETT, R.G., et al. Protein-losing enteropathy associated with *Clostridium difficile* infection. **Lancet** i:1343-1355, 1989.
172. SAID, H.M., Van VOORHIS, K., GHISHAN, F.K., et al. Transport characteristics of glutamine in human intestinal brush-border membrane vesicles. **Am. J. Physiol.** 256:G240-G245, 1989.
173. SANDLE, G.I., HIGGS, N., CROW, P., et al. Cellular basics for defective electrolyte transport in inflamed human colon. **Gastroenterology** 99:97-105, 1990.
174. SARANTOS, P., ABOUHAMZE, A., SOUBA, W.W. Glucocorticoids regulate intestinal glutaminase expression. **Surgery** 112:278-283, 1992.
175. SALLOUM, R.M., COPELAND, E.M., SOUBA, W.W. Brush border transport of glutamine and other substrates during sepsis and endotoxemia. **Ann. Surg.** 213: 401-410, 1991.
176. SALLOUM, E.M., SCHULTZ, G.S., STEVENS, B.R., et al. Regulation of small intestinal glutamine transport by epidermal growth factor. **Surgery** 113:552-559, 1993.

177. SALLOUM, R.M., STEVENS, B.R., SOUBA, W.W. Adaptive regulation of brush border amino acid transport in a chronic excluded jejunal limb. **Am. J. Physiol.** 261:G22-G27, 1991.
178. SALLOUM, R.M., SOUBA, W.W., FERNANDEZ, A., et al. Dietary modulation of small intestine transport in intestinal brush border membrane vesicles of rats. **J. Sur. Res.** 48, 635-638, 1990.
179. SALLOUM, R.M., SOUBA, W.W., KLIMBERG, V.S., et al. Glutamine is superior to glutamine in supporting gut metabolism, stimulating intestinal glutamine activity and preventing bacterial translocation. **Surg. Forum** 40:6-8, 1989.
180. SCHAEERER, E., NEUTRA, M.R., KRAEHENBUHL, J. P. Molecular and cellular mechanisms involved in trans epithelial transport. **J. Membr. Biol.** 123:93-103, 1991.
181. SCHEDL, D.P., CLIFTON, J.A. Small intestinal absorption of steroids. **Gastroenterology** 41:491-499, 1961.
182. SCHORLING, J.B., McAULIFFE, J.F., DE SOUZA, M.A., et al. Malnutrition is associated with increased diarrhoea incidence and duration among children in an urban Brazilian slum. **Int. J. Epidemiol.** 19:728-735, 1990.

183. SCHORLING, J.B., WANKE, C.A., SCHORLING, S.K., et al. A prospective study of persistent diarrhea among children in an urban Brazilian slum: patterns of occurrence and etiologic agents. **Am. J. Epidemiol.** 132:144-156, 1990.
184. SCHRANDER, J.J., UNSALAN-HOOYEN, R.W., FORGET, R.P., JANSEN, J. ⁵¹Cr-EDTA intestinal permeability in children with cow's milk intolerance. **J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.** 10:189-192, 1990.
185. SCHULTZ, S.G., CURRAN, P.F. Coupled transport of sodium and organic solutes. **Physiol. Rev.** 50:637-718, 1970.
186. SCHULTZ, S.G., SOLOMON, A.K. Determination of the effective hydrodynamic radii of small molecules by viscometry. **J. Gen. Physiol.** 44:1189-1199, 1961.
187. SCHULTZ, S.G., ZALUSKY, R. Ion transport in rabbit ileum. I. Shortcircuit current and sodium fluxes. **J. Gen Physiol.** 47:567-583, 1964.
188. SCHULZKE, J.D., SCHULZKE, I., FROMM, M., BENTZEL, C.J., RIECKEN, E.O. Impaired epithelial barrier in celiac sprue. **Gastroenterology** 100:A702, 1991.

189. SHOTWELL, M.A., KILBERG M.S., OXENDER, D.L. The regulation of neutral amino acid transport in mammalian cells. **Bioch. Biophysica Acta** 737:267-284, 1983.
190. SIBER, G.R., MAYER, R.J. Increased gastrointestinal absorption of large molecules in patients after 5-fluourouracil therapy for metastatic colon carcinoma. **Cancer Res.** 40:3430-3436, 1980.
191. SILVA, A.C., SANTOS-NETO, M.S., SOARES, A.M. et al. Efficacy of a glutamine-based oral rehydration solution on the electrolyte and water absorption in a rabbit model of secretory diarrhea induced by cholera toxin. **J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.** 26:513-519, 1998 (Accompanied by an editorial).
192. SMITH, M.W. Aspects of sugar transport relevant to oral rehydration therapy. **J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.** 26:336-342, 1998.
193. SNYDER, J.D., MERSON, M.H. The magnitude of the global problem of acute diarrheal disease: a review of the active surveillance data. **Bull World Health Organ.** 60:605-613, 1982.
194. SOARES, A.M. Secreção paracelular de Na^+ durante a absorção de substrato/ Na^+ -dependente em mucosa ileal de coelho montada em câmara de Üssing. Tese de doutorado em farmacologia, pgs 167, 1996.

195. SOUBA, W.W. Physiologic and biochemical importance of glutamine: na overview. In SOUBA, W.W. Ed. Glutamine: physiology, biochemistry and nutrition in critical illness. R.G. Landes Company, Austin, 3-7, 1992.
196. SOUBA, W.W., COPELAND, E.M. Cytokine modulation sodium-dependent glutamine transport across the brush border membrane of monolayers of human intestinal Caco-2 cells. **Ann. Surg.** 215:536-545, 1992.
197. SOUBA W.W., HERSKOWITZ, K., KLIMBERG, V.S., et al. The effects of sepsis and endotoxemia on gut glutamine metabolism. **Ann. Surg.** 211:543-551, 1990.
198. SOUBA, W.W., KLIMBERG, V.S., PLUMLEY, D.A., SALLOUM, R.M., et al. The role of glutamine in maintaining a health gut and supporting the metabolic response to injury and infection. **J. Surg. Res.** 48:383-391, 1990.
199. SOUBA, W.W., SCOTT, T.E., WILMORE, D.W. Intestinal consumption of intravenously administered fuels. **J. Parenter. Enteral Nutr.** 9:18-22, 1985.

200. SOUBA, W.W., SMITH, R.J., WILMORE, D.W. Glutamine metabolism by the intestinal tract. **J. Parenter. Enteral Nutr.** 9:608-617, 1985.
201. SOUBA, W.W., SMITH, R.J., WILMORE, D.W. Effects of glucocorticoids on glutamine metabolism in visceral organs. **Metabolism** 34:450-456, 1985.
202. SOUBA, W.W., WILMORE, D.W. Postoperative alterations of arteriovenous exchange of amino acids across the gastrointestinal tract. **Surgery** 94:342-350, 1983.
203. STEHLE, P., FUST, P. Isotachophoretic control of peptide synthesis and purification. A novel approach using ultraviolet detection at 206 nm. **J. Chromatogr.** 346:271-279, 1985.
204. STEHLE, P., MERTAS, N., ALBERS, S., et al. Effect of parenteral glutamine peptide supplements on muscle glutamine loss and nitrogen balance after major surgery. **Lancet** i:231-233, 1989.
205. STEHLE, P., PFAENDER, P., FURST, P. Isotachophoretic analysis of a synthetic dipeptide L-alanyl-L-glutamine: evidence for stability during heat sterilization. **J. Chromatogr.** 294:507-512, 1984.
206. STEINHARD, H.J., PALEOS, G.A, BRANDL, M., et al. Efficacy of a synthetic dipeptide mixture as the source of amino acids for total

- parenteral nutrition in a subhuman primate (baboon). **Gastroenterology** 86:1582-1589, 1984.
207. STEININGER, R., KARNER, J. ROTH, E., et al. Infusion of dipeptides as nutritional substrates for glutamine, tyrosine and branched-chain amino acids in patients with acute pancreatitis. **Metabolism** 38(Suppl 1):78-81, 1989.
208. STEVENS, B.R., FERNANDEZ, A., HIRAYAMA, B., et al. Intestinal brush border membrane Na⁺ glucose cotransporter functions in situ as a homotetramer. **Proc. Natl. Acad. Sci.** 87:1456-1460, 1990.
209. STEVENS, B.R., KAUNOTZ, J., WRIGHT, E.M. Intestinal transport of amino acids and sugars; advances using membrane vesicles. **Ann. Rev. Physiol.** 47:417-433, 1984.
210. STEVENS, B.R., WRIGHT, E.M. Kinetics of the intestinal brush border proline (Imino) carrier. **J. Biol. Chem.** 262:6546-6551, 1987.
211. STEVENS, B.R., WRIGHT, S.H., HIRAYANA, B.S., et al. Organic and inorganic solute transport in renal and intestinal membrane vesicles preserved in liquid nitrogen. **Membrane Biochem.** 4:271-281, 1982.
212. STEVENSON, B.R., SILICIANO, J.D., MOOSEKER, M.S., GOODENOUGH, D.A. Identification of ZO-1: a high molecular weight

polypeptide associated with the tight junction (zonula occludens) in variety of epithelia. **J. Cell. Biol.** 103:755-766, 1986.

213. TEPPER, R.E., SIMON, D., BRANDT, L.J., et al. Intestinal permeability in patients with the human immunodeficiency virus. **Am. J. Gastroenterol.** 89:878-82, 1994.
214. TRAVIS, S., MENZIES, I. Intestinal permeability: functional assessment and significance. **Clin. Sci.** 82:471-488, 1992.
215. TRAVIS, S.P.L., MENZIES, I.S., CREAMER, B. Differential D-xylose/3-0-methyl-D-glucose absorption in coeliac disease. **Gut** 30:A1508-1509, 1989.
216. UKABAM, S.O., CLAMP, J.R., COOPER, B.T. Abnormal small intestinal permeability to sugars in Crohn's disease of the terminal ileum and colon. **Digestion** 27:70-74, 1983.
217. UKABAM, S.O., COOPER, B.T. Small intestinal permeability to mannitol, lactulose and polyethylene glycol 400 in coeliac disease. **Dig. Dis. Sci.** 29:809-816, 1984.
218. ULLRICH, R., SEITZ, M., HEISE, W., et al. Small intestinal structure and function in patients infected with human immunodeficiency virus (HIV): evidence of HIV-induced enteropathy. **Am. Intern. Med.** 11:15-21, 1989.

219. USSING, H.H., WINDHAGE, E.F. Nature of shunt path and active sodium transport path through skin epithelium. **Acta Physiol. Scand.** 61:484-504, 1964.
220. USSING, H.H., ZERAHN, K.A. Active transport of sodium as the source of electrical current in the short circuited frog skin. **Acta Physiol. Scand.** 23:110-117, 1951.
221. VARDY, P., LEBANTHAL, E., SCHWACHMAN, H. Intestinal lymphangiectasia: a reappraisal. **Pediatrics** 55:842-851, 1975.
222. VAZQUEZ, J.A., DANIEL, H., ADIBI, S.A. Dipeptides in parenteral nutrition: from basic science to clinical applications. **Nutr. Clin. Pract.** 8:95-108, 1993.
223. VAZQUEZ, J.A., PALEOS, G.A, STEINHARDT, H.J, et al. Protein nutrition and amino acid metabolism after 4 weeks of total parenteral nutrition with a mixture of 14 dipeptides: serendipitous observations on effects of sepsis in baboons. **Am. J. Clin. Nutr.** 44:24-32, 1988.
224. VERKMAN, A.S. Mechanisms and regulation of water permeability in renal epithelia. **Am. J. Physiol.**, 257:C837-C850, 1989.
225. WALKER, W.A., ISSELBACHER, K.J. Uptake and transport of macromolecules by the intestine: possible role in clinical disorders. **Gastroenterology** 67:531-550, 1974.

226. WESER, E., SLEISENGER, M.H. Lactosuria and lactase deficiency in adult celiac disease. **Gastroenterology** 48:571-578, 1965.
227. WINDMUELLER, H.G. Glutamine utilization by the small intestine. **Adv. Enzymol.** 53:202, 1982.
228. WHEELER, P.G., MENZIES, I.S., CREMER, B. Effect of hyperosmolar stimuli and coeliac disease on the permeability of the human gastrointestinal tract. **Clin. Sci. Mol. Med.** 54:495-501, 1978.
229. WINDMUELLER HG, SPAETH AE. Respiratory fuels and nitrogen metabolism *in vivo* small intestine of fed rats. **J. Biol. Chem.** 255:207, 1980.
230. WINDMUELLER HG, SPAETH AE. Uptake and metabolism of plasma glutamine by the small intestine. **J. Biol. Chem.** 249:5070-5079, 1974.
231. WINDMUELLER, H.G, SPAETH, A.E. Intestinal metabolism of glutamine and glutamate from the lumen as compared to glutamine from blood. **Arch. Biophys. Biochem.** 171:662-672, 1975.
232. World Health Organization. Program for Control of Diarrhoeal Diseases. WHO Interim Programme Report. Geneva: **World Health Organization**, CDD; 91:36, 1990.

233. WUHIB, T., SILVA, T.M.J., NEWMAN, R.D., et al. Cryptosporidial and microsporidial infections in human immunodeficiency virus-infected patients in northeastern Brazil. **J. Infect. Dis.** 170: 494-497, 1994.
234. WYATT, J., VOGELSANG, H., HÜBL, W., et al. Intestinal permeability and the prediction of relapse in Crohn's disease. **Lancet** 341:1437-1439, 1993.
235. ZIEGLER, T.R., BENFELL, K., SMITH, R.J., et al. Safety and metabolic effects of L-glutamine administration in human. **J. Parenter. Enteral Nutr. Supp** 14:137S-146S, 1990.

ANEXOS

8 – ANEXOS

8.1 PUBLICAÇÕES RESULTANTES DESTE TRABALHO

Soares, A.M.; Freire, J.E.; and **Lima, A.A.M.**: Transport of glutamine, alanine and glucose by rabbit intestinal membrane. Brazilian J. Med. Biol. Res. 24:111-113, 1990.

Lima, A.A.M., Soares, A.M., Freire, J.E.Jr. and Guerrant, R.L.: Glutamine increases intestinal sodium absorption despite cholera toxin-induced secretion: a potential improved oral rehydration therapy. XVII Joint Conference on Cholera and Related Diseases, Charlottesville, VA pp. 140-144, 1991.

Lima, A.A.M., Soares, A.M., Freire-Junior, J.E., and Guerrant, R.L. Cotransport of sodium with glutamine, alanine and glucose in the isolated rabbit ileal mucosa. Braz. J. Med. Biol. Res. 25:637-640, 1992

Lima, A.A.M.; Fang, G.; Schorling, J.B.; Albuquerque, L.; McAuliffe, J.F.; Mota, S.; Leite, R.; Guerrant, R.L.: Persistent diarrhea in northeast Brazil: etiologies and interactions with malnutrition. Acta Paediatrica Scandinavica, Suppl 381:39-44, 1992.

Soares, A.M.; Freire, J.E., Jr., and **Lima, A.A.M.**: Mathematical dose-response model in sodium intestinal cotransport with glutamine and glucose on isolated rabbit ileum mucosal. Brazilian J. Med. Biol. Res., 25:1141-1144, 1992.

Lima, A.A.M. and Guerrant, R.L.: Persistent diarrhea in children: epidemiology, risk factors, pathophysiology, nutritional impact and management. Epidemiologic Reviews. 14: 222-242, 1992.

Walser, B.L., Newman, R., Weikel, C.S., **Lima, A.A.M.** and Guerrant, R.L.: Pathogen and subject differences in bacterial adherence to human buccal epithelial cells in a favela environment in northeastern Brazil. Infect. Immun. 60(11): 4793-4800,1992.

Lima, A.A.M. and Guerrant, R.L.: The management of cholera today. Mediguide To GI Diseases 5(4):1-5, 1992.

Lima, A.A.M.: Cholera: molecular epidemiology, pathogenesis, immunology, treatment, and prevention. Curr. Op. Infect. Dis. 7(5): 592-601, 1994.

Fang, G., **Lima, A.A.M.**, Martins, M.C.V., Nataro, J.P., and Guerrant, R.L.: Etiology and epidemiology of persistent diarrhea in northeastern Brazil: a hospital-based, prospective, case-control study. J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr., 21:137-144, 1995.

Bao Y., Silva, T. M. J., Guerrant, R. L., **Lima, A. A. M.** and Fox J. W.: Direct analysis of mannitol, lactulose, and glucose in urine samples by high-performance anion-exchange chromatography with pulse amperometric detection. Journal of Chromatography B: Biomedical Applications. 685:105-112, 1996.

Guerrant, R.L., **Lima, A.A.M.**, Thielman, N.M., Steiner, T.S. and Fonteles, M.C.: Diarrhea, demography and cell signaling: lessons from microbial toxin. Transactions of the American Clinical and Climatological Association, 108: 01-13, 1996.

Lima, A.A.M., Silva, T.M., Gifoni, A.M., Barrett, L.J., McAuliffe, I.T., Bao, Y., Fox, J.W., Fedorko, D.P., Guerrant, R.L.: Mucosal injury and disruption of intestinal barrier function in HIV-infected individuals with and without diarrhea and cryptosporidiosis in northeast Brazil. Am. J. Gastroenterol., 92 (10): 1861-1866, 1997.

Silva, A.C., Santos-Neto M.S., Soares A.M., Fonteles, M.C., Guerrant, R.L. and **Lima, A.A.M.**: Efficacy of a glutamine-based oral rehydration solution on the electrolyte and water absorption in a rabbit model of secretory diarrhea induced by cholera toxin. J. Ped. Gastroenterol. Nutr. 26:513-519, 1998 with accompanying editorial.

Agnew, D.G., **Lima, A.A.M.**, Newman, R.D., Wuhib, T., Moore, R.D., Guerrant, R.L., and Sears, S.L.: Cryptosporidiosis in northeastern Brazilian children: association with increased diarrheal morbidity. J. Infect. Dis. 177: 754-760, 1998.

Guerrant, R.L., Steiner, T.S., **Lima, A.A.M.**, and Bobak, D.A.: How intestinal cause disease. J. Infect. Dis. 000:0000-0000, 1998 (In Press).

Barbosa Jr., M.S., Silva, T.M.J., Guerrant, R.L., and **Lima, A.A.M.**:

Intestinal permeability test using mannitol and lactulose: clinical evaluation in children with diarrheal diseases. Brazilian J. Med. Biol. Res. 00:000-000, 1998 (Submitted).

Soares, A.M. and **Lima, A.A.M.**: Loosening tight junction on cotransport of sodium with glutamine, alanine and glucose in the isolated rabbit ileal mucosa. 1998 (In Prepration).

8.2 CAPÍTULOS DE LIVROS PUBLICADOS

Wanke, C.A., **Lima, A.A.M.**, and Guerrant, R.L. Infectious diarrhea in tropical and subtropical regions. In the book: International Clinical Gastroenterology from Baillière Tindall, U.K., vol 1(2), Ch. 7, pp 335-359, 1987.

Lima, A.A.M., Mahalanabis, D. New approaches to oral rehydration therapy. In the book: Baillière's Clinical Tropical Medicine and Communicable Diseases by Baillière Tindall, London, Vol 3(3), Ch. 13, pp 627-636, 1988.

Lima, A.A.M.; Khin Maung, U and Guerrant, R.L. The physiologic basis for oral rehydration therapy and its improvements. In the book: At The Edge Of Development: Health Crisis in a Transitional Society. Edited by: R.L. Guerrant, M.A. de Souza, and M. Nations, Caroline Academic Press, 109-126, 1996.

Wilson, M.E., **Lima, A.A.M.** and Guerrant, R.L.: Infection caused by

vibrios. In: Internal Medicine, Second Edition, Joy H. Stein, Editor-in-Chief, Fifth Edition, 1997, p. 2132-2139.

8.3 PATENTE

Título da patente: Use of oral solution containing glutamine, di and tripeptides in the treatment of diarrheal diseases. US Patent nº 5.561.111, October 1, 1996). The University of Virginia Patent Foundation, Towers Office Building, Suite 1-110, 1224 West Main Street, Charlottesville, VA, USA 22903 (Tel.: (804) 924-2173 / 924-2175; Fax (804) 982-1583 / 982-HEAR V/TDD)..

8.4 PRÊMIOS

Menção Honrosa do Quinto Prêmio Sendas de Saúde - Casas Sendas Comércio e Indústria S.A., São João de Meriti, RJ., 1995.

Prêmio de 1º lugar na Área de Ciências da Vida - Subárea (Fisiologia e Farmacologia), com o trabalho “Eficácia da solução de reidratação à base de glutamina na absorção de água e eletrólitos no modelo de diarréia secretória induzida pela toxina da cólera”, apresentado no XIV ENCONTRO UNIVERSITÁRIO DE INICIAÇÃO À PESQUISA, realizado nos dias 08 a 10 de novembro de 1995 na UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ.

Prêmio de 2º lugar de melhor trabalho apresentado no Congresso Outubro Médico, 1995.

Prêmio Nacional pelas Sociedades Brasileiras de Infectologia e Medicina Tropical de 1º lugar do I Prêmio Bristol-Myers Squibb de Immunovirologia-1996, melhor trabalho abordando a infecção pelo HIV
 “Lima, A.A.M., Silva, T.M.J., Gifoni, A.M.R., Barrett, L.J., McAuliffe M. I., Bao, Y., Fox, J.W., Fedorko D.P., and Guerrant R.L. Cryptosporidial and microsporidial impact in intestinal permeability changes and enteric protein loss in human immunodeficiency virus-infected patients in northeastern – Brazil, 1996.

Prêmio de Melhor Patente do Ano de 1997 da University of Virginia –
 Título: Stable glutamine derivatives for oral and intravenous rehydration and nutrition therapy, The Henderson Inventor of the Year Award, University of Virginia Patent Foundation.

8.5 PROJETOS

ICIDR Project 1 Title - Epidemiology, predisposing factors, etiologies and pathogenesis of prolonged diarrhea. International Collaboration in Infectious Diseases Research (ICIDR) - National Institute of Health, USA. Grant number 5 P01 AI26512-02 from THE U.S. DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES (DHHS), for support of a project entitled "RECOGNITION AND EXPRESSION OF TROPICAL INFECTIOUS DISEASES" (Período 89/93).

ICIDR Project 2 Title - *Cryptosporidium*: disease expression, epidemiology and humoral immunity. International Collaboration in Infectious

Diseases Research (ICIDR) - National Institute of Health, USA. Grant number 5 P01 AI26512-02 from THE U.S. DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES (DHHS), for support of a project entitled "RECOGNITION AND EXPRESSION OF TROPICAL INFECTIOUS DISEASES" (Período 89/93).

Recognition, pathogenesis and control of enteric infections causing persistent diarrhea in northeastern Brazil. Rockefeller Foundation, USA (Período 88/92)

Renovação do projeto de International Collaboration in Infectious Diseases Research (ICIDR)- National Institute of Health, USA. Grant number 2 U01-AI26512-06 from THE U.S. DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES (DHHS), for support of a project entitled "RECOGNITION AND EXPRESSION OF TROPICAL INFECTIOUS DISEASES". Project I Title: New and emerging pathogens causing persistent diarrhea: epidemiology, pathophysiology and novel approaches to therapy (Período 1995-1999).

Renovação do projeto TDR/Rockefeller Foundation: Pathophysiology and novel approaches to therapy of Cryptosporidiosis in the northeast of Brazil (Período 1995-1996).

Projeto de Tropical Medicine Research Center (TMRC)- National Institute of Health, USA. Grant number 2 P50 AI30639-06 from THE U.S. DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES (DHHS), for support of a project entitled "PATHOGENESIS AND THERAPY OF

TROPICAL DISEASES". Project V Title: Role of Cytokines, Cellular Determinants and New Approaches to Treating Persistent Diarrhea in Populations at High Risk for Cryptosporidium, Enteroaggregative E. coli and Other Enteric Infections (Período 1996-2.001).

Projeto da FINEPE. Referência 3556/96: Neurofisiologia e Imunofarmacologia do Trato Gastrointestinal: Implicações para Diarréias Inflamatórias e Secretórias. Período: 1998-2.002.

Programa Internacional de Treinamento em Pesquisas de Doenças Infecciosas Emergentes. National Institute of Health, Fogarty Center USA. Período: 1998-2.002.

Programa Internacional de Colaboração Científica e Tecnológica entre a Universidade Federal do Ceará e University of Virginia, UV-USA. Período: 1988-Presente.

8.6 FOLHAS DE CONSENTIMENTOS, MAPA E FICHA DE VISITA SEMANAL

CONSENTIMENTO PARA PARTICIPAÇÃO NO ESTUDO DE DIARRÉIA

TMRC – PROJETO V (Comunidade Gonçalves Dias)

Convidamos você e seu filho (a), _____ a participar de um estudo sobre as causas de diarreia.

Gostaríamos de acompanhar a saúde de seu filho em visitas semanais por uma enfermeira ou agente de saúde para observar se o seu filho teve diarreia, se está mamando, alimentando-se e crescendo bem. Se o seu filho tiver diarreia, gostaríamos de colher esse material para verificar possíveis causas da diarreia e daremos medicamentos para possíveis causas que derem no exame. A cada 3(três) meses seu filho será medido, pesado e avaliado seu estado nutricional. Também será colhido exame de fezes e de sangue para ver se a criança tem anemia e anticorpos e para testar a absorção de açúcares colhendo a urina por 5 horas depois de beber água e açúcares. Se a criança tiver anemia ela será tratada.

A adição de glutamina na SRO tem o benefício potencial de prover uma melhor nutrição e rápida recuperação com riscos insignificantes. O tratamento alterativo é a solução padrão de reidratação oral recomendado pela Organização Mundial da Saúde. Seu prontuário será guardado com confidência da sua identidade pessoal. Em caso de dúvida contactar o Dr. Aldo Angelo Moreira Lima, Unidade de Pesquisas Clínicas, HUWC, CCS-UFC, tel:223.6982.

Você poderá deixar o estudo quando desejar, sem nenhum prejuízo para sua saúde, apenas comunicando ao médico ou enfermeira responsável pelo estudo.

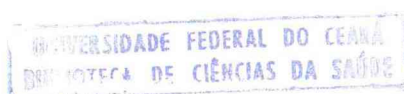
Tem alguma dúvida?

Ass. do participante

Ass. do membro do estudo

Ass. da testemunha

Data: ___/___/___



**CONSENTIMENTO PARA PARTICIPAÇÃO NUM ESTUDO DUPLO-CEGO
COMPARATIVO DA SOLUÇÃO DE REIDRATAÇÃO ORAL BASEADA NA
GLUTAMINA E BASEADA NA GLICOSE PARA TRATAMENTO DE ADULTOS COM
DIARRÉIA PERSISTENTE.**

Projeto ICIDR (Hospital São José)

Nós o convidamos, _____, visto que você foi diagnosticado como tendo diarreia crônica por seus médicos, a participar num projeto para avaliar a eficácia e o ganho nutricional com a solução de reidratação oral (SRO) baseada na glutamina e a SRO padrão no tratamento da diarreia persistente. Recentemente a solução baseada na glutamina tem sido usada para cólera e outros tipos de diarreia aguda e pode melhorar a diarreia crônica em adultos.

Durante sua Hospitalização, manteremos registro cuidadoso da qualidade de SRO e o total de excreção de fezes e urina. Gostaríamos também de colher amostra de fezes para exame e ainda fazer uma avaliação de seu estado tirando seu peso e medidas. Gostaríamos também de colher amostras de gangue para anemia e teste com anticorpos e coletar urina por 5 horas para testar a absorção de açúcares.

A adição de glutamina na SRO tem o benefício potencial de prover uma melhor nutrição e rápida recuperação com riscos insignificantes. O tratamento alternativo é a solução padrão de reidratação oral recomendada pela Organização Mundial da Saúde. Seu prontuário será guardado com confidência da sua identidade pessoal. Em caso de dúvida contactar o Dr. Aldo Ângelo Moreira Lima, Unidade de Pesquisas Clínicas, HUWC, CCS-UFC, tel.223.6982.

Você poderá deixar o estudo em qualquer época que desejar apenas comunicando ao seu médico e/ou pesquisador encarregado pelo estudo.

Tem alguma dúvida?

Assinatura do participante

Assinatura do membro do estudo

Assinatura da testemunha

Data: ___/___/___



RUA DAMIAO FERNANDES

RUA NESTOR BARBOSA

HOSPITAL S. JOSÉ

RUA CONEIRO

PENAFORTE

3c

COLÉGIO REDENTORISTA

IGREJA SÃO RAMUNDO

LAGOA DE PORANGABUSSU

3b

RUA CESAR FONTENELE

500

RUA XAVIER OLIVEIRA

INAMPS

R. LOPES FILHO

MARCELO

RUA DES. SAMPAIO

FRANCISCA

PRAÇA MEL FRANCEZ

RUA VERE. YVES

RUA PEDRO GALVA

RUA

FRANCISCA

RUA GUSTAVO

RUA MAIOR

RUA PROFESSOR

JUNIOR

MATERNOAS ESCOLA

EMERG.

MELO

BARBOSA

RUA FARIAS

MOSENHOR

FURTADO

PEDRO

RUA VALENTIM

CAVALARI

RUA LAVAREZ

TRACEMA

RUA PAPI

RUA COSTA

RODRIGUES

RUA CORONA

MELO

BIBLIOTECA

HOSPITAL UNIVERSITARIO

RUA CAETANA

ODONTOLOGIA

ESCALA DE

FRANCISCO

RUA HENRI DE

VASCONCELOS

UPC-UFC

HEMOCE

JOSE

BASTOS

ENIDA

8.7 COMISSÃO DE ÉTICA



Universidade Federal Ceará
Comitê de Ética em Pesquisa Clínica do Centro
de Ciências da Saúde e do Complexo Hospitalar

DECLARAÇÃO

Declaramos para os devidos fins que o projeto intitulado: “Role of Cytokines, Cellular Immunologic Determinants and New Approaches to Treating Persistent Diarrhea in Populations at High Risk for Cryptosporidium Enteroaggregative E. coli and other Enteric Infections” tendo como responsável o Dr. Aldo Ângelo Morcira Lima, foi reapresentado e reaprovaado pelo Comitê de Ética em Pesquisa, na reunião do dia 05 de março de 1998.

Fortaleza, 06 de março de 1998

Dra. Maria Elisabete Amaral de Moraes
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa



8.8 QUESTIONÁRIO

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
 UNIDADE DE PESQUISAS CLÍNICAS- HUWC, CCS
 DEPTo. DE FISILOGIA E FARMACOLOGIA
 EXTENSÃO COMUNIDADE GONÇALVES DIAS

Ficha de entrada da criança

Ficha no.: _____ GD no.: _____ / _____ SRONT no.: _____

A. Dados demográficos:

Nome: _____ Sexo: M/F Idade: _____ Meses Data nasc.: __/__/__

B. Acompanhamento clínico:

1. Diarréia: S/N Se SIM, duração até hoje: _____ dias

2. Evolução: Se diarréia, Dia de início: __/__/__ Dia de término: __/__/__

3. Terapêutica utilizada: _____ Dose _____

SROTN: Dia de início: __/__/__ Dia do Término: __/__/__ _____

Vitamina A: Dia de início: __/__/__ (dose única) _____

Zinco: Dia de início: __/__/__ Dia de término: __/__/__ _____

Complexo B Dia de início: __/__/__ Dia de término: __/__/__ _____

4. Balanço hídrico diário:

Dias de evolução 1°.dia 2°. dia 3°. dia 4°. dia 5°. dia 6°. dia 7°. dia

Ingestão de 24 hs (ml): _____

SROTN (50-100 ml/kg/d) _____

Outros líquidos _____

Soro endovenoso _____

Total _____

Obs: _____

Perda de 24 hs (ml):

Fezes _____

Urina _____

Vômitos _____

TOTAL _____

Obs: _____

C. Teste de permeabilidade com Lactulose e Manitol:

Solução de lactulose (4g) e manitol (1g) em 20 ml de água. Dose de 2ml/kg-máximo 20ml

Dias do teste de Lact/Man 1° dia 7°. dia 14°. dia 28°. dia 60°. dia 90°. dia

Data __/__/__ __/__/__ __/__/__ __/__/__ __/__/__ __/__/__

Início : ____ hs : ____ hs : ____ hs : ____ hs : ____ hs : ____ hs

Final : ____ hs : ____ hs : ____ hs : ____ hs : ____ hs : ____ hs

Urina total (ml) _____

Peso (kg; hidratado) _____

Altura (mts) _____

Prega cutânea (cm) _____

Circ. braquial (cm) _____

D. Laboratório:

Amostras (1. Sim; 2. Não)

1. Fezes _____ Data: __/__/__ Alfa1-Antitripsina: _____ mg/dl

Data: __/__/__ Alfa1-Antitripsina: _____ mg/dl

2. Sangue: _____ Data: __/__/__ Uréia/dl Creat: _____ mg/dl

Data: __/__/__ Uréia/dl Creat: _____ mg/dl

Obs: _____

Investigador: _____ Data: __/__/__

Coordenador: Dr. Aldo Angelo Moreira Lima. Tel.: 243.9440, Fax.: 281.5212, E.mail: