XXIII Seminário de Iniciação Científica
XX Jornada de Pesquisa
XVI Jornada de Extensão
V Mostra de Iniciação Científica Júnior
V Seminário de Inovação e Tecnologia

Modalidade do trabalho: Relatório técnico-científico
Evento: XXIII Seminário de Iniciação Científica

SUPLEMENTAÇÃO COM GLUTAMINA EM MODELO EXPERIMENTAL DE SEPSE[1]

Maicon Machado Sulzbacher[2], Lucas Machado Sulzbacher[3], Analú Bender Dos Santos[4], Mirna Stela Ludwig[5], Thiago Gomes Heck[6].

[1] Trabalho de inicação científica realizado pelo grupo de pesquisa em fisiologia (GPeF) da Unijuí.
[2] Acadêmico do 7o semestre de enfermagem da UNIJUÍ. Bolsista de iniciação cientifica PIBIC-CNPQ.Integrante Grupo de pesquisa em Fisiologia (GPeF) da Universidade Regional do Noroeste do Estado do Rio Grade do Sul (UNIJUÍ); maiconsulzbacher@hotmail.com.
[3] Acadêmico do 1o semestre de Enfermagem da Universidade de Cruz Alta (UNICRUZ), integrante do GPeF; lucas.sulzbacher@hotmail.com.
[4] Aluna de mestrado do Programa de Pós-Graduação emAtenção Integral à Saúde UNICRUZ/UNIJUÍ (PPGAIS). Integrante do GPeF;analu.bender@hotmail.com.
[5] Docente do Departamento Ciências da Vida (DCVida) da UNIJUÍ. Programa de Pós-Graduação em Atenção Integral à Saúde. Integrante do GPeF; ludwig@unijui.edu.br,
[6] Docente do Departamento Ciências da Vida (DCVida) da UNIJUÍ. Programa de Pós-Graduação em Atenção Integral à Saúde. Integrante do GPeF; thiago.heck@unijui.edu.br

Atualmente a sepse pode ser definida como uma síndrome clínica caracterizada por uma resposta inflamatória sistêmica associada a um foco infeccioso, na maioria das vezes, bacteriano que pode determinar a disfunção ou falência de múltiplos órgãos (DELLINGER et al., 2008). Dados recentes, relativos ao ano de 2014, apresentados no Relatório Anual do Instituto Latino Americano de Sepse, mostram que o percentual de mortalidade nos hospitais públicos brasileiros é de 45,8% em casos de sepse grave, e de 72,5% em casos de choque séptico (ILAS, 2014).

O quadro clássico de febre, leucocitose, taquicardia e taquipnéia pode não ser observado em todos os casos clínicos, ocorrendo também alargamento do tempo de pro-trombina e tromboplastina, resistência a insulina e hipotermia (VELASCO, 2007). Sendo na sepse, a hipotermia um preditor de mortalidade em pacientes idosos (TIRUVOIPATI et al., 2010). A hipotermia está presente também na sepse neonatal e se torna um indicador de mortalidade na mesma (SILVEIRA;PROCIANOLY, 2012). E o mesmo parâmetro está associado a maior mortalidade e um risco aumentado de linfocitopenia persistente em pacientes com sepse, e pode ser um preditor clínico precoce da imunossupressão induzida pela patologia (DREWRY et al., 2015).

Muitos estudos são realizados em modelos experimentais com intuito de investigar novas estratégias terapêuticas para casos de sepse. Dentre os modelos de estudo frequentemente utilizados, destacam-se o modelo de administração de lipopolisacarídeos (LPS), o modelo de ligadura e perfuração cecal (CLP) e o modelo de administração de solução fecal, que simula a endotoxemia intestinal. Neste último, bactérias gram-negativas (que são comensais do trato intestinal e, portanto, encontrada em fezes) presentes na solução fecal exercem efeito sobre o metabolismo hepático, diminuindo a atividade da enzima fosfoefenol piruvato carboxiquinase (PEPCK), que é responsável pela gliconeogênese hepática estimulada pelo glucagon (HILL; MCCALLUM, 1991). Na sepse tem-se um quadro de desequilíbrio imunometabólico, inflamatório podendo ocorrer hipoglicemia.

Modalidade do trabalho: Relatório técnico-científico
Evento: XXIII Seminário de Iniciação Científica

Assim como também pode ocorrer hiperglicemia já que devido aos níveis de estresse da patologia provoca alterações no metabolismo dos carboidrato e resistência a insulina (VELASCO, 2007).
Em casos de hiperglicemia na sepse, o tratamento intensivo de terapia com insulina pode desencadear, muitas vezes, quadros hipoglicêmicos. Além disso, este tipo de terapia aparentemente não causa melhora clínica nem reduz mortalidade de pacientes em UTI (SONG et al., 2014). A hipoglicemia, por sua vez, quando analisada em pacientes de UTI acometidos pela sepse acaba aumentando os índices de mortalidade (PARK et al., 2012). Em conjunto, estes dados indicam a fragilidade metabólica a qual o indivíduo com sepse se encontra.
A desnutrição é uma comorbidade muitoo prevalente, e é diretamente associada a elevação do tempo de internação hospitalar e maiores taxas de mortalidade. Sendo necessária uma suplementação nutricional, já se sabe que a primeira opção para suplementação na patologia é pela via enteral, tendo como justificativa primária o melhor controle glicêmico com suplementação pela mesma via do que suplementação nutricional por via parenteral (VELASCO, 2007)
Ainda em quadros infecciosos, ocorre diminuição dos níveis plasmáticos e teciduais de glutamina, indican¬do a necessidade de suplementação deste nutriente (ROGERO;TIRAPEGUI, 2003). Além disso, a glutami¬na é utilizada como fonte de energia por células do sistema imune, potencializando-o (AKAGI et al., 2013). Foi mostrado em um estudo recente que a suplementação com glutamina (Gln) intravenosa foi capaz de melhorar as condições da resposta imune, aumentando quantidades de IgA plasmáticas e diminuindo a apoptose da mucosa intestinal em ratos submetidos à sepse por punção e ligadura do ceco (FAN et al., 2015). Estudos mostram resultados positivos com o uso de glutamina por via endovenosa (HU et al., 2014)(TUNG et al., 2013) no tratamento de sepse, em modelos animais de ratos e camundongos (CRUZAT et al., 2014; SINGLETON, WISCHMEYER, 2007). A suplementação oral com este aminoácido melhora aspectos histológicos hepáticos e do íleo e diminui a apoptose tecidos (MARGARITIS et al., 2005).
A proposição deste estudo foi desenvolver um modelo de sepse que mimetizasse uma situação clínica real avaliada por parâmetros relacionados a risco clínico (TIRUVOIPATI et al., 2010; SILVEIRA, PROCIANOLY, 2012) (PARK et al., 2012). considerando a importância da investigação acerca de novas terapias para controle da sepse. O estudo teve também como objetivo verificar o potencial da suplementação com L-glutamina por via oral, na melhora do quadro de sepse nos parâmetros clínicos de glicemia e temperatura.

Metodologia
Foram utilizados 16 camundongos da linhagem B6129SF2/J (B6) com 90 dias de idade, pesando 30± 2g provenientes do biotério da UNIJUÍ. Estes foram divididos em quatro grupos: controle (C), sepse (S), controle+Glutamina (C+Gln) e sepse + Glutamina (S+Gln). Os animais foram mantidos em gaiolas semi-metabóllicas, em ambiente com temperatura controlada (22 +2ºC), umidade relativa do ar entre 50% e 60% e iluminação artificial com ciclos de 12/12 horas de claro/escuro. Os animais receberam ração padronizada para animais de laboratório (Nuvilab CR-1) e água ad libitum. Os experimentos ocorreram no Laboratório de Ensaios Biológicos da UNIJUÍ (LEBio). Os animais do grupo Sepse receberam injeção de solução fecal 10% via intraperitoneal (i.p) e os

animais do grupo Controle, solução fisiológica 0,9% em uma dose de 5µL/g (PETROIANU et al., 2004). Este protocolo experimental foi desenvolvido pelo período de 48 horas.
A solução fecal 10% foi preparada com fezes frescas dos animais. Após coleta das fezes, se fez um homogeneizado das mesmas em solução fisiológica 0,9% de modo a obtermos uma concentração fecal de 10% (10g de fezes em 100 ml de NaCl 0,9%). Em seguida este homogeneizado foi filtrado através de gaze, para que fossem eliminadas as partículas maiores e em seguida centrifugado em centrífuga para eppendorf a 1000 G por 3s.
A temperatura retal foi mensurada com termômetro retal (Techline), e a glicemia com punção na parte distal da cauda com glicosímetro (Optium Exceeed) nos seguintes períodos: antes da injeção fecal e soro fisiológico(T=0) e uma, quatro, oito, doze, vinte e quatro, trinta e seis e quarenta e oito horas após a injeção fecal (T= 1, 4, 8, 12, 24, 36 e 48 horas). A eutanásia foi realizada ao final do experimento por decapitação.
Os grupos C+Gln e S+Gln foram suplementados com L-Glutamina (1g/Kg por dia), por via oral (gavagem orogástrica) (CRUZAT et al., 2014), 3 vezes por dia com intervalos de 4 horas (9:30; 13:30 e 17:30 horas), iniciando 2 horas após a injeção com solução fecal 10%.
Análise estatística: Utilizou-se o programa GraphPad 3.0. Os resultados foram expressos em média ± desvio padrão, para análise dos resultados foi utilizado teste estatístico ANOVA de uma via seguido de Post-hoc de Tukey, ANOVA de medidas repetidas e ANOVA de duas vias, considerando nível de significância estatística de 5% ($p<0,05$).

Resultados e discussão

A administração da solução fecal levou os animais a diminuição da glicemia (nos grupos S e S+Gln), nos tempos 4, 8, 12 e 24 horas após a administração. Este protocolo mimetiza situações clínicas, como descritas em estudos na qual, a sepse provoca a hipoglicemia, com valores glicêmicos abaixo de 69 mg/dL, chegando a um mínimo de 40 mg/dL em pacientes sépticos em em UTI (PARK et al., 2012).
Em nosso estudo, observamos também a ocorrência de hipotermia nos tempos 1 e 4 horas após a administração da injeção fecal 10%. Possivelmente com a diminuição de substrato energético (glicose) há uma diminuição no pool energético disponível (ATP), com consequente diminuição da termogênese já que a mesma representa 80% da energia térmica produzida explicando a diminuição brusca da temperatura (DOUGLAS, 2002).
Em nosso estudo, o tratamento com L-Glutamina não reverteu o quadro hipoglicêmico e hipotérmico dos animais em sepse. O uso de glutamina em outros estudos mostrou resultados positivos quando suplementado por via endovenosa (HU et al., 2014)(TUNG et al., 2013) no tratamento de sepse, em modelos animais de ratos e camundongos, porém com a sepse sendo induzida por diferentes técnicas como administração de LPS e técnica cirúrgica de CLP, ou ainda, com uso de Gln em diferentes doses (CRUZAT et al., 2014)(SINGLETON; WISCHMEYER, 2007).
São escassos os estudos que avaliam simultaneamente estas variáveis em modelos experimentais, embora sejam variáveis que apontam risco de piora clínica e mortalidade (TIRUVOIPATI et al., 2010); SILVEIRA e PROCIANOLY, 2012; (PARK et al., 2012). Assim, este estudo contribui para

o desenvolvimento de um modelo experimental de sepse que mimetize adequadamente uma situação clínica infecciosa por peritonite, com a administração de fezes via intraperitoneal.

CONCLUSÕES

O modelo experimental proposto mimetiza um quadro infeccioso de sepse e no mesmo o tratamento com Gln não foi capaz de melhorar a situação clínica dos animais submetidos a sepse na dose e nos tempos administrados.

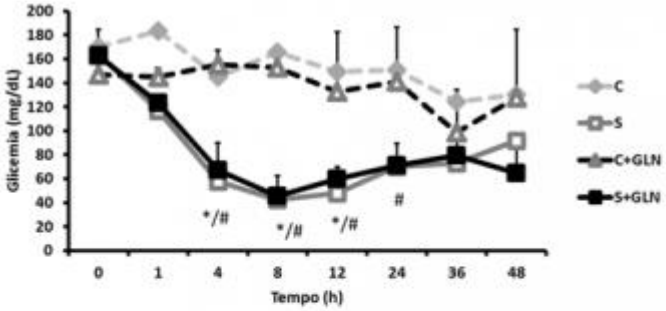

Figura 1. Avaliação glicêmica durante 48 horas do protocolo de indução de sepse por peritonite com solução fecal 10%, e suplementação com L-Glutamina (1g/Kg). * $P < 0.05$, S e S+GLN vs respectivos tempo zero. # $P < 0.05$ S e S+GLN vs respectivos Controles no mesmo tempo.

Modalidade do trabalho: Relatório técnico-científico
Evento: XXIII Seminário de Iniciação Científica

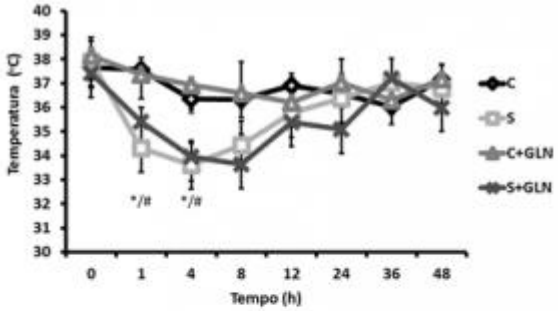

Figura 2. Avaliação da temperatura retal durante 48 horas do protocolo de indução de sepse por peritonite com solução fecal 10%, e suplementação com L-Glutamina (1g/Kg). * $P < 0.05$, S e S+GLN vs respectivos tempo zero. # $P < 0.05$ S e S+GLN vs respectivos Controles no mesmo tempo.