

Luciana Teixeira de Siqueira



Avaliação dos níveis de citrulina no plasma de camundongos infectados por *Schistosoma mansoni* na forma hepatoesplênica



Recife
2009



Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Cirurgia

Luciana Teixeira de Siqueira

Avaliação dos níveis de citrulina no plasma de camundongos infectados por *Schistosoma mansoni* na forma hepatoesplênica

Dissertação apresentada ao Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Cirurgia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em Cirurgia.

Orientador Interno

Dr. Álvaro Antônio Bandeira Ferraz

Prof. Adjunto do Departamento de Cirurgia, CCS-UFPE

Orientador Externo

Dr. Josemberg Marins Campos

Prof. do Departamento de Cirurgia, CCS-UFPE

Linha de Pesquisa

Esquistossomose Mansônica Clínica e Experimental
Infecção Cirúrgica

Siqueira, Luciana Teixeira de

Avaliação dos níveis de citrulina no plasma de camundongos infectados por *Schistosoma mansoni* na forma hepatoesplênica / Luciana Teixeira de Siqueira. – Recife : O Autor, 2009.

xiii, 86 folhas: il., fig., tab.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCS. Cirurgia, 2009.

Inclui bibliografia, anexos e apêndices.

1. Esquistossomose mansônica. 2. Hipertensão porta. 3. Citrulina. I. Título.

616.995.122
616.963

CDU (2.ed.)
CDD (22.ed.)

UFPE
CCS2010-006

Universidade Federal de Pernambuco

REITOR

Prof. Amaro Henrique Pessoa Lins

VICE-REITOR

Prof. Gilson Edmar Gonçalves e Silva

PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

DIRETOR

Prof. José Thadeu Pinheiro

HOSPITAL DAS CLÍNICAS

DIRETOR SUPERINTENDENTE

Prof. George da Silva Telles

DEPARTAMENTO DE CIRURGIA

CHEFE

Prof. Salvador Vilar Correia Lima

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIRURGIA

NÍVEL MESTRADO E DOUTORADO

COORDENADOR

Prof. Carlos Teixeira Brandt

VICE-COORDENADOR

Prof. Álvaro Antônio Bandeira Ferraz

CORPO DOCENTE

Prof. Álvaro Antônio Bandeira Ferraz

Prof. Carlos Teixeira Brandt

Prof. Cláudio Moura Lacerda de Melo

Prof. Edmundo Machado Ferraz

Prof. Fernando Ribeiro de Moraes Neto

Prof. Frederico Teixeira Brandt

Prof. José Lamartine de Andrade Aguiar

Prof. Salvador Vilar Correia Lima

Prof. Sílvio Caldas Neto

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIRURGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIRURGIA

Relatório da Defesa de Dissertação do Dr.^a Luciana Teixeira de Siqueira, Aluna de Mestrado do Programa de Pós-graduação em Cirurgia, Área de Concentração: Cirurgia: Clínica e Experimental.

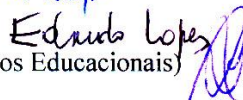
Às oito horas do dia vinte de julho de dois mil e nove no Auditório João Alfredo da Universidade Federal de Pernambuco, tiveram início os trabalhos de defesa de tese da Dr.^a Luciana Teixeira de Siqueira, para obtenção do grau de Mestre em Cirurgia. A comissão Julgadora – eleita pelo Colegiado do Programa e homologada pela Câmara de Pesquisa e Pós-graduação – foi integrada pelos professores: Dr. Edmundo Machado Ferraz, Doutor do Departamento de Cirurgia do CCS/UFPE (Presidente da Banca Examinadora); Dr. Fernando Ribeiro de Moraes Neto, Doutor do Departamento de Cirurgia do CCS/UFPE; Dr. Edmundo Pessoa de Almeida Lopes Neto, Doutor do Departamento de Medicina Clínica do CCS/UFPE; e, para suplentes: interno: Sílvio da Silva Caldas Neto, Doutor do Departamento de Cirurgia do CCS/UFPE; e, finalmente, externo, Dr. José Luiz de Lima Filho, Doutor do Departamento de Bioquímica e Biofísica do CCS/UFPE; tendo, como orientador interno, o Dr. Álvaro Antônio Bandeira Ferraz, Doutor do Departamento de Cirurgia do CCS/UFPE. A tese apresentada pela Mestranda Luciana Teixeira de Siqueira versou sobre: “AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DE CITRULINA NO PLASMA DE CAMUNDONGOS INFECTADOS POR *SCHISTOSOMA MANSONI* NA FORMA HEPATOESPLÊNICA”. Após, a explanação de 30(Trinta) minutos, Pela candidata, justificando a escolha, o objetivo da pesquisa, a metodologia empregada e os resultados obtidos, baseados na análise estatística, ilustrados com datashow, foram realizadas as arguições na seguinte ordem: Prof. Dr. Edmundo Machado Ferraz (Presidente da Banca Examinadora), Prof. Dr. Fernando Ribeiro de Moraes Neto, Prof. Dr. Edmundo Pessoa de Almeida Lopes Neto; todas as arguições foram feitas no tempo regulamentar, e respondidas pela candidata. Ao término das mesmas, a Comissão Julgadora proferiu o seguinte resultado: Prof. Dr. Edmundo Machado Ferraz (Presidente da Banca Examinadora), menção “Aprovado”, Prof. Dr. Fernando Ribeiro de Moraes Neto, menção “Aprovado”, Prof. Dr. Edmundo Pessoa de Almeida Lopes Neto, menção “Aprovado”. Nada mais havendo a registrar foram encerrados os trabalhos e, para constar, elaborei o presente relatório que vai por mim, Isabela Nogueira Pimentel, Técnica em Assuntos Educacionais, assinados depois do Senhor Presidente, e demais integrantes da Comissão Examinadora. Recife, 20 de julho de 2009.

Prof. Edmundo Machado Ferraz

Prof. Fernando Ribeiro de Moraes Neto

Prof. Edmundo Pessoa de Almeida Lopes Neto

Sra. Isabela Nogueira Pimentel (Técnica em Assuntos Educacionais)



Dedicatória

A **Philipe**, amado esposo, pelo constante apoio.

Aos meus pais, **Noêmia** e **José Alves** (in memoriam).

Pelo exemplo de caráter, honestidade e luta.

Agradecimentos

A **Deus**, presença constante em minha vida. Sem Ele, nada é possível.

A minha **família**, pela compreensão nos momentos de ausência.

Ao meu orientador, **Prof. Álvaro Antônio Bandeira Ferraz**, pela coerência e perspicácia na condução de trabalhos científicos, pela amizade, confiança e cumplicidade conquistadas diariamente ao longo desses três anos, por sempre me lançar desafios, acreditando que ao final tudo dará certo.

Ao meu orientador-externo, **Dr. Josemberg Marins Campos**, por ser a primeira mão estendida ao término da minha residência, pela competência na orientação metodológica deste trabalho, especial amizade, bom senso e por sempre acreditar na minha capacidade. Minha eterna gratidão.

Ao **Prof. Edmundo Machado Ferraz**, pelos ensinamentos e apoio, que me conduziram à admiração pelo profissional dedicado às atividades científicas, contribuindo efetivamente na formação de vários cirurgiões.

Ao coordenador da Pós-graduação em Cirurgia, **Prof. Carlos Teixeira Brandt**, pela dedicação reconhecida ao Programa.

Ao **Dr. Djalma Agripino de Melo Filho**, pela atenciosa ajuda na análise estatística e competência com os números.

Aos Professores do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA), **José Luiz de Lima**, **Mônica Albuquerque** e **Taciana Soares**, pela disponibilidade, atenção e ajuda durante a elaboração da metodologia deste trabalho.

Meu especial agradecimento a **Felipe Viegas** e a **Profa. Maria Helena Ribeiro**, biotério do LIKA, sempre prestativos, competentes e grandes companheiros nos procedimentos com os animais.

Ao coordenador da Pós-graduação em Patologia, **Prof. Nicodemos T. de Pontes Filho**, pela grata surpresa do reencontro anos após o curso de graduação em Medicina, inteligência e sábias palavras de conforto no momento mais difícil da elaboração deste trabalho.

A **Carmelita**, pela paciência, grandiosa e inesquecível ajuda na confecção das lâminas histológicas

Ao aluno do mestrado em Medicina Tropical, **André Lima**, pela fundamental ajuda na infecção dos animais.

A todos os amigos que me apoiaram, em especial **Luis Fernando Evangelista, João Paulo Martins, José Guido Corrêa de Araújo Júnior e Dras. Teresa Cristina Barros, Maria Lúcia Melo e Isadora Hetzel**, pelas horas de paciência a mim dedicadas.

A **Dra. Raquel Kelner**, pela amizade e importante ajuda na orientação metodológica deste trabalho.

Aos preceptores do Serviço de Cirurgia Geral, **Ricardo Machado, Pedro Arruda, Tércio Bacelar, Francisco Eduardo de Lima, Horácio Ferreira, Maria Ivna Vanderlei, Carlos Mathias, Miguel Arcanjo, Geraldo Wanderley, Marcelo Sette**, pelos ensinamentos.

A **Márcia e Mércia**, pelo incentivo e apoio.

Normatização

Esta dissertação está de acordo com:

Referências: adaptado: Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals: Writing and Editing for Biomedical Publication. *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver), *Updated October 2008*. Disponível no endereço eletrônico <http://www.icmje.org>.

Universidade Federal de Pernambuco. Serviço de Biblioteca e Documentação. *Estrutura de apresentação de dissertação e teses, sob forma de artigos científicos*, conforme 'Proposta dos Programas de Pós-Graduação do Centro de Ciências da Saúde, CCS da Universidade Federal de Pernambuco'. Recife: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2004.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

Sumário

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	ix
LISTA DE TABELAS.....	x
LISTA DE FIGURAS.....	xi
RESUMO.....	xii
ABSTRACT.....	xiii
INTRODUÇÃO.....	14
1.1 Apresentação do problema.....	15
REFERÊNCIAS.....	18
ARTIGO DE REVISÃO.....	22
Utilização da citrulina plasmática como marcador de função intestinal: Aplicações no transplante de intestino e outras doenças digestivas.....	23
Resumo.....	24
Introdução.....	25
Metabolismo da citrulina.....	26
Importância clínica da citrulina.....	29
Doenças intestinais relacionadas à citrulina.....	30
Outras situações clínicas relacionadas à citrulina.....	34
Citrulina como suplementação oral.....	36
Técnicas de dosagem da citrulina plasmática.....	38
Considerações finais e perspectivas.....	39
Referências.....	41

ARTIGO ORIGINAL.....	48
Análise da citrulina plasmática e morfometria intestinal em camundongos infectados com <i>Shistosoma mansoni</i> na forma hepatoesplênica.....	49
Resumo.....	50
Abstract.....	51
Introdução.....	52
Materiais e métodos.....	54
Resultados.....	60
Discussão.....	64
Conclusão.....	70
Referências.....	71
 APÊNDICE.....	 79
Apêndice A - Estatística descritiva da pesquisa.....	80
 ANEXOS.....	 81
Anexo I: Declaração do Comitê de Ética em Pesquisa com Animais.....	82
Anexo II: Normas da Revista Colombiana de Cirurgia.....	83
Anexo III: Normas da Revista Surgical Infections.....	85

Lista de Abreviaturas e Siglas

AIV	Apoproteína IV
ASA	Ácido argininosuccínico
ASL	Argininosuccinato liase
ASS	Argininosuccinato sintetase
ASP	Aspartato
CCS	Centro de Ciências da Saúde
CEEA	Comissão de Ética em Experimentação Animal
CIT	Citrulina
CP	Carbamoilfosfato
CPS	Carbamoilfosfato sintetase
EHE	Esquistossomose hepatoesplênica
HCO₃	Ácido carbônico
LIKA	Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami
OCT	Ornitinacarbamoil transferase
OMS	Organização Mundial da Saúde
ORN	Ornitina
PRO	Prolina
P5CS	Δ 1-Pirrolina-5-carboxilate sintetase
P5C	Δ 1-Pirrolina-5-carboxilate
RCA	Rejeição Celular Aguda
RPM	Rotações por minuto
SPSS	<i>Statistical Program for Social Sciences</i>
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco

Lista de Tabelas

Tabela 1	Comparação de médias da citrulina em $\mu\text{mol/mL}$ entre os grupos estudados.....	63
Tabela 2	Comparação entre as médias de citrulina pré e pós-operatória em $\mu\text{mol/mL}$ nos grupos estudados. Influência da esplenectomia sobre os níveis de citrulina.....	63
Tabela 3	Comparação de médias da análise morfométrica em pixel da mucosa jejunal entre os grupos estudados.....	63
Tabela 4	Correlação entre citrulina em $\mu\text{mol/mL}$ e dados morfométricos da mucosa jejunal em pixel no grupo experimental.....	63

Lista de Figuras

Figura 1	Metabolismo da citrulina.....	28
Figura 2	Análise morfométrica: lâminas histológicas coradas com HE...	58
Figura 3	Placa de Petri acondicionando os vermes recolhidos do sistema mesentérico. Identificados vermes machos e casais..	61
Figura 4	Presença de granuloma na lâmina própria formado por neutrófilos e linfócitos em sua grande maioria.....	62

Resumo

Introdução: A hipertensão porta encontrada na forma hepatoesplênica da esquistossomose mansônica traz repercussões sobre a mucosa do intestino delgado e, conseqüentemente, sobre a função dos enterócitos, que constituem a principal fonte de produção da citrulina circulante. Esse aminoácido é utilizado como marcador de função intestinal em algumas doenças que acometem o aparelho digestivo, podendo aplicá-lo em morbidades que levam à perda da integridade do epitélio do intestino delgado como a esquistossomose.

Objetivos: Avaliar os níveis de citrulina no plasma de camundongos infectados com *Schistosoma mansoni* na forma hepatoesplênica, assim como investigar as repercussões morfológicas sobre a mucosa do intestino delgado, correlacionando os valores da citrulina com as alterações morfométricas da mucosa intestinal (área e altura de vilosidades e perímetro da superfície) e avaliar a influência da esplenectomia sobre os níveis plasmáticos desse aminoácido.

Métodos: Foram estudados 46 camundongos, albino-Swiss, adultos, fêmeas, peso médio 40g. O estudo foi analítico, de intervenção, prospectivo. Foram selecionados dois grupos: controle - 23 animais sadios - e experimental - 23 animais infectados pelo *Schistosoma mansoni*, com a forma hepatoesplênica. Foram coletadas amostras de sangue para dosagem da citrulina antes e após a esplenectomia e ressecado segmento de jejuno para análise histológica e morfométrica. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco.

Resultados: A média de peso corporal do grupo controle foi maior em relação ao experimental com significância estatística ($p=0,00062$). O valor médio da citrulina no grupo experimental, antes e após a esplenectomia, foi menor que o do grupo controle ($p=0,000$). Após a esplenectomia houve, no grupo experimental, diminuição significativa nos valores da citrulina ($p=0,004$). A avaliação histológica do jejuno evidenciou ovos de *Schistosoma mansoni*, alguns degenerados, na serosa, submucosa e lâmina própria, envoltos por granulomas formados por neutrófilos e linfócitos. Na análise morfométrica do jejuno, o grupo experimental apresentou, em média, menor altura e área das vilosidades bem como menor perímetro da superfície mucosa ($p=0,003$; $0,000$ e $0,001$, respectivamente). No grupo experimental, observou-se correlação direta entre o valor médio da citrulina após a esplenectomia e a altura e área das vilosidades ($p=0,003$ e $0,04$, respectivamente). Não foi evidenciado correlação entre a citrulina e o perímetro da superfície da mucosa jejunal ($p>0,05$).

Conclusão: Os níveis de citrulina estão diminuídos no plasma de camundongos esquistossomóticos e apresentaram correlação direta com as alterações das vilosidades da mucosa jejunal. Além disso, após a esplenectomia, observou-se diminuição na concentração plasmática de citrulina no grupo experimental.

Palavras-chave: Esquistossomose; Hipertensão porta; Intestino delgado; Citrulina; Esplenectomia.

Abstract

Introduction: Portal hypertension, in the hepatosplenic schistosomiasis, affects the small bowel mucosa and, as a consequence, the enterocytes, which are the most important source of circulating citrulline. This amino acid is used as a marker of intestinal function in some diseases which affect the digestive system, and is also applicable to morbidities that lead to a loss of integrity of the small bowel epithelium as in mansonic schistosomiasis.

Objectives: Evaluate citrulline levels in the plasma of mice infected with *Schistosoma mansoni* in the hepatosplenic schistosomiasis, as well as investigate morphological repercussions on the mucosa of the small bowel, correlating citrulline levels with morphometric changes in the intestinal mucosa (area and height of villous and perimeter of the surface) and evaluate splenectomy influence on the plasmatic levels of this amino acid.

Method: 46 adult female albino Swiss mice, (mean weight 40g). It was an experimental prospective study where two groups were selected: a control – 23 healthy mice; and an experimental – 23 mice infected with the hepatosplenic schistosomiasis. Blood samples were collected to investigate citrulline levels before and after splenectomy. Jejunum segments were resected for histologic and morphometric analyses. This study was approved by the Committee of Ethics on Animal Experimentation of the Center of Biological Sciences of the Federal University of Pernambuco.

Results: The mean corporal weight of control group was greater than that in the experimental, with statistical significance ($p=0.00062$). The average citrulline level in the control group was greater than in the experimental before and after splenectomy ($p=0.000$). After splenectomy there was for experimental group, a significant reduction in citrulline levels ($p=0.004$). Histological evaluation of the jejunum showed *schistosoma* eggs, some of them degenerated, in the serosa, submucosa and lamina propria, involved in granulomas, composed of neutrophils and lymphocytes. The morphometric analysis of the jejunum revealed, in the experimental group, less height and area of villous as well as smaller perimeter of mucosa surface ($p=0.003$; 0.000 e 0.001 , respectively). A direct correlation between the mean citrulline level and height and area of villous was shown in the experimental group ($p=0.003$ and 0.04 , respectively). A correlation between citrulline and perimeter of the jejunal mucosa surface was not found ($p>0.05$).

Conclusion: Citrulline levels are diminished in the plasma of schistosomal mice and revealed direct correlation with changes in the villous of jejunal mucosa. In addition to that, after splenectomy, a reduction in plasmatic concentration of citrulline was noticed in the experimental group.

Key words: Schistosomiasis; Portal hypertension; Small bowel; Citrulline; Splenectomy.



Introdução

1.1 Apresentação do problema

A infecção pelo *Schistosoma mansoni* acomete mais de 200 milhões de indivíduos no mundo, sendo 20 milhões com doença grave.¹ No Brasil, estima-se que, pelo menos, 2,5 milhões de pessoas estejam acometidas pela enfermidade, sobretudo no Nordeste e norte de Minas Gerais.² Apesar da redução na mortalidade pela doença, ainda há transmissão e a prevalência não é menor do que 5%.^{3,4}

A esquistossomose na forma hepatoesplênica é caracterizada por fibrose hepática e hipertensão porta, que, ao se propagar aos ramos intestinais terminais, pode levar a alterações na arquitetura da mucosa intestinal como atrofia de vilosidades.⁵⁻⁸ Isso pode repercutir sobre a função dos enterócitos, resultando em quadros de má-absorção.^{5,9-11} Entretanto, parece haver uma recuperação do padrão mucoso intestinal após redução da pressão porta através do tratamento cirúrgico.¹² Por outro lado, as alterações estruturais na mucosa intestinal associadas à imunodeficiência na esquistossomose poderiam predispor à translocação bacteriana para os linfonodos mesentéricos, condição que pode levar à sepse e falência de múltiplos órgãos e sistemas nos pacientes esquistossomóticos.^{13,14} Estas alterações intestinais têm sido objeto de poucos estudos e a imunodeficiência na esquistossomose ainda não possui um mecanismo bem definido.

Pesquisas experimentais têm mostrado a estreita relação entre a citrulina e o enterócito, não apenas com a massa de células existente, mas também com o seu estado funcional, o que a tornaria um biomarcador não invasivo da função intestinal em algumas doenças que acometem a mucosa do intestino delgado.¹⁵⁻¹⁸

Alguns marcadores têm sido propostos para avaliação da função digestiva, mas diante da baixa sensibilidade e especificidade, além da difícil aplicação clínica,^{19,20} a citrulina vem se mostrando como uma ferramenta útil de monitorização da massa e funcionalidade dos enterócitos.

Diante desse grupo de evidências, são lançadas as seguintes perguntas condutoras:

- 1) Há influência da esquistossomose sobre os níveis plasmáticos de citrulina?
- 2) Há alteração da morfometria na mucosa intestinal por esta doença?
- 3) Existe correlação direta entre a morfometria da mucosa intestinal e os níveis plasmáticos de citrulina?
- 4) Há influência da esplenectomia sobre a concentração sérica da citrulina?

O corpo desta dissertação foi composto de quatro seções: Introdução; Referências; Artigo de revisão 1; Artigo original 2.

O **artigo de revisão** aborda a citrulina como marcador de função intestinal e sua utilização na prática clínica, destacando seu metabolismo, aplicações no transplante de intestino e algumas morbidades intestinais, além de perspectivas de sua utilidade em outras doenças digestivas. O artigo foi organizado conforme as normas da Revista Colombiana de Cirurgia, visando à submissão e posterior publicação.

O **artigo original**, que será o conteúdo principal da dissertação, descreve um estudo analítico em modelo experimental (camundongos), sendo utilizado como banco de dados o *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS) (Apêndice A).

Os objetivos são analisar os níveis de citrulina plasmática na esquistossomose com a forma hepatoesplênica e as repercussões morfológicas sobre a mucosa do intestino delgado, correlacionando valores da citrulina com as alterações morfométricas. O artigo foi formatado de acordo com as normas da Revista “Surgical Infections”, visando à submissão e posterior publicação.

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (CEE-UFPE), sob o processo nº 23076.012970/2008-36, de acordo com as normas vigentes no Brasil, especialmente a Lei 9.605 – art. 32 e Decreto 3.179 – art. 17, de 21/09/1999, que trata da questão do uso de animais para fins científicos (Anexo I).



Referências

1. OMS. Organización Mundial de la Salud. Prevención y controle de la esquistosomiasis y las geohelmintiasis: Informe de un comité de expertos de la OMS; Serie de informes técnicos 912, Ginebra, Suiza;2005.
2. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Vigilância e controle de moluscos de importância epidemiológica: diretrizes técnicas: Programa de Vigilância e Controle da esquistossomose (PCE) / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. 2. ed. Brasília: Editora do Ministério da Saúde;2008.
3. Ferreira ILM, Silva TPT. Mortalidade por esquistossomose no Brasil: 1980-2003. Rev Patol Trop. 2007;36(1):67-74.
4. Brandt CT, Leite CRC, Manhães-de-Castro FM, Macedo EMC, Silva RPP, Castro CMMB. Nitric oxide monocyte production levels in patients with the hepatosplenic form of *Schistosoma mansoni* infection who underwent splenectomy, ligation of the left gastric vein and auto implantation of spleen tissue in the major omentum. Acta Cirur Bras. 2006;21(5):285-9.
5. Enquist IF, Golding MR, Aiello RG, Fierst SM, Solomon NA. The effect of portal hypertension on intestinal absorption. Surg Gynecol Obstet. 1965;120(1):87-91.
6. Mott CB, Neves DP, Betarello A. Absorção intestinal na forma hepatoesplênica de esquistossomose mansônica. Rev Hosp Clin Fac Med S Paulo. 1971;26(2):55-60.
7. Nigro SP, Miszputen S, Hayashi H, Saad FA. Estudo morfométrico da mucosa jejunal na esquistossomose mansônica humana. Rev Ass Med Bras. 1984;30(3-4):61-3.

8. Penna FJ, Brasileiro Filho G. Lack of correlation between jejunal mucosal morphology and intestinal absorption in the hepatoesplenic form of schistosomiasis mansoni. *Arq Gastroenterol.* 1988;25(4):224-8.
9. El-Rooby A, Gad-el-mawla N, Galil N, Abdalla A, Shakir M. Studies on the malabsorption syndrome among egyptians malabsorptions in bilharzial hepatic fibrosis. *J Egypt Med Assoc.* 1963;46:777-82.
10. Pucci H, Vilela MP, Miszputen SJ, Carvalho N, Secaf F, Saad FA. Estudo da absorção intestinal das gorduras na esquistossomose mansônica humana. *Rev Ass Med Bras* 1978;24(10):341-4.
11. Coutinho EM, Ferreira HS, Assunção ML, Carvalho SL, Oliveira SA, Francelino AA. The use of protein hydrolysate improves the protein intestinal absorption in undernourished mice infected with *Schistosoma mansoni*. *Rev Soc Bras Med Trop* 2002;35(6):585-90.
12. Machado RJC, Amorim AG, Lira V, Machado ACC, Kelner S. Análise morfométrica de intestino delgado de esquistossomóticos. *An Fac Med Fed Pernamb.* 1996;41(1):34-42.
13. Spath G, Hirner A. Microbial translocation and impairment of mucosal immunity induced by an elemental diet in rats in prevented by selective decontamination of the digestive tract. *Eur J Surg.* 1998;164(3):223-8.
14. Ferraz AAB, Campos JM, Araújo Júnior JG, Albuquerque AC, Ferraz EM. Gut bacterial translocation and postoperative infections: A prospective study in schistosomal patients. *Surg Infect.* 2005;6(2):197-201.

15. Yu YM, Burke JF, Tompkins RG, Martin R, Young VR. Quantitative aspects of interorgan relationships among arginine and citrulline metabolism. *Am J Physiol.* 1996;271(6 Pt 1):E1098-109.
16. Dillon EL, Knabe DA, Wu G. Lactate inhibits citrulline and arginine synthesis from proline in pig enterocytes. *Am J Physiol.* 1999;276(5 Pt 1):G1079-86.
17. Sandstrom P, Trulsson L, Gasslander T, Sundqvist T, von Döbeln U, Svanvik J. Serum amino acid profile in patients with acute pancreatitis. *Amino Acids* 2008;35(1):225-31.
18. Luiking YC, Poeze M, Ramsay G, Deutz NE. Reduced citrulline production in sepsis is related to diminished de novo arginine and nitric oxide production. *Am J Clin Nutr.* 2009;89(1):142-52.
19. Curis E, Crenn P, Cynober L. Citrulline and the gut. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2007;10(5):620-6.
20. Crenn P, Messing B, Cynober L. Citrulline as a biomarker of intestinal failure due to enterocyte mass reduction. *Clin Nutr.* 2008;27(3):328-39.



Artigo de Revisão

Utilização da citrulina plasmática como marcador de função intestinal: aplicações no transplante de intestino e outras doenças digestivas

LUCIANA TEIXEIRA DE SIQUEIRA^{*}, ÁLVARO ANTÔNIO BANDEIRA FERRAZ^{*}, JOSEMBERG MARINS CAMPOS^{*}, EDMUNDO MACHADO FERRAZ^{*}, JOSÉ LUIZ DE LIMA FILHO^{**}

*Cirurgião do Departamento de Cirurgia, Serviço de Cirurgia Geral do Hospital das Clínicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife - Pernambuco, Brasil

** Chefe do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA) da Universidade Federal de Pernambuco

Palavras chave: Glutamina; Citrulina; Intestino delgado; Transplante de intestino

Correspondência do autor: Luciana Teixeira de Siqueira
Rua João Sales de Menezes, 419 – Apto. 501 – Várzea
50740-110 - Recife - PE - Brasil

RESUMO

O intestino delgado é responsável não apenas pela digestão e absorção de nutrientes, mas também pelo metabolismo de vários aminoácidos, entre eles a glutamina, principal precursor da citrulina plasmática. O metabolismo único da citrulina tem atraído interesse científico na aplicação clínica como marcador de função intestinal em algumas doenças e após procedimentos cirúrgicos como transplante de intestino delgado e ressecções intestinais extensas, que desencadeiam a Síndrome do intestino curto. Marcadores têm sido propostos para avaliação da função intestinal, mas diante da baixa sensibilidade e especificidade, além da difícil aplicação clínica, a citrulina vem se mostrando uma ferramenta não invasiva de monitorização da massa e funcionalidade dos enterócitos. O objetivo desta revisão é descrever a importância da citrulina nas principais doenças e cirurgias do intestino delgado, destacando seu metabolismo, aplicações no transplante intestinal, bem como perspectivas de sua aplicação clínica em outras doenças digestivas.

INTRODUÇÃO

Por muitos anos, o intestino delgado foi considerado um órgão responsável apenas pela digestão terminal e absorção de nutrientes. Contudo, o enterócito também exerce função decisiva no catabolismo de aminoácidos da dieta logo na primeira passagem no jejuno⁽¹⁾. Estes substratos, ao contrário da glicose, são considerados combustíveis para a mucosa intestinal de forma que alguns são precursores essenciais para a síntese de outros aminoácidos, dentre eles, a citrulina⁽²⁾.

Aproximadamente 100% da citrulina plasmática é liberada pelos enterócitos na circulação portal através do metabolismo da glutamina, principalmente na região apical das vilosidades⁽³⁾. Entretanto, não é absorvida pelos hepatócitos, chegando intacta aos tecidos periféricos. Essa característica é fundamental para a síntese de proteínas em situações de estresse metabólico como sepse, pós-operatório, pancreatite aguda e para a formação de arginina nos rins, principal precursora do óxido nítrico, que responde pela manutenção do sistema imunológico, regulação do fluxo sanguíneo e cicatrização de feridas^(1,4).

Essa particularidade colocou a citrulina em destaque, atraindo o interesse científico, sobretudo no que se refere à monitorização da funcionalidade do intestino delgado.

O objetivo desta revisão é descrever a utilização da citrulina como marcador de função intestinal, destacando seu metabolismo, aplicações no transplante de intestino, bem como perspectivas de sua utilidade em outras doenças digestivas.

Os autores valorizaram os artigos científicos publicados em revistas médicas indexadas, utilizando o sistema de busca dos principais bancos de dados da

internet, tais como Medline, Lilacs, Cochrane, Pubmed e Scielo.

Esta revisão incluiu todos os artigos publicados no período compreendido entre 1960 e 2009, utilizando os seguintes descritores ou palavras-chave em português e inglês, nos sistemas de busca: citrulina, glutamina, arginina, óxido nítrico, metabolismo, intestino delgado, técnicas de dosagem, transplante de intestino.

Metabolismo da citrulina

A citrulina é encontrada como aminoácido livre no plasma, podendo estar presente em outros fluidos fisiológicos, tais como urina, líquidos cefaloraquidiano e amniótico e suor. Também apresenta funções que diferem entre as diversas espécies.

Nos mamíferos, a citrulina pode ser encontrada em todos os tecidos. Sua concentração plasmática varia com a idade, mas não com a alimentação⁽⁵⁾. Em humanos saudáveis, sem insuficiência renal ou intestinal, as concentrações de citrulina sérica variam entre 20 e 60 $\mu\text{mol/L}$, com média de 40 $\mu\text{mol/L}$ ^(6,7).

A distribuição tissular do metabolismo da citrulina envolve, sobretudo, o intestino delgado, fígado e rins, mas com diferentes funções. No fígado, a citrulina é um metabólito intermediário envolvido na eliminação de um componente tóxico através do ciclo da uréia. Essa é uma via metabólica compartimentalizada, desconectada de outras vias que a envolvem porque toda citrulina sintetizada na mitocôndria do hepatócito é convertida no citoplasma em outros produtos do ciclo da uréia, não havendo sua liberação na circulação sanguínea⁽⁸⁾. No intestino, sobretudo no jejuno, a glutamina proveniente da alimentação (66%) ou do sangue arterial que

irriga os tecidos periféricos como o sistema músculo-esquelético (33%), é absorvida e metabolizada, produzindo a maioria da citrulina circulante⁽¹⁾. Aproximadamente 83% da citrulina plasmática será catabolisada nos túbulos proximais renais em arginina⁽⁹⁾, precursora essencial do óxido nítrico.

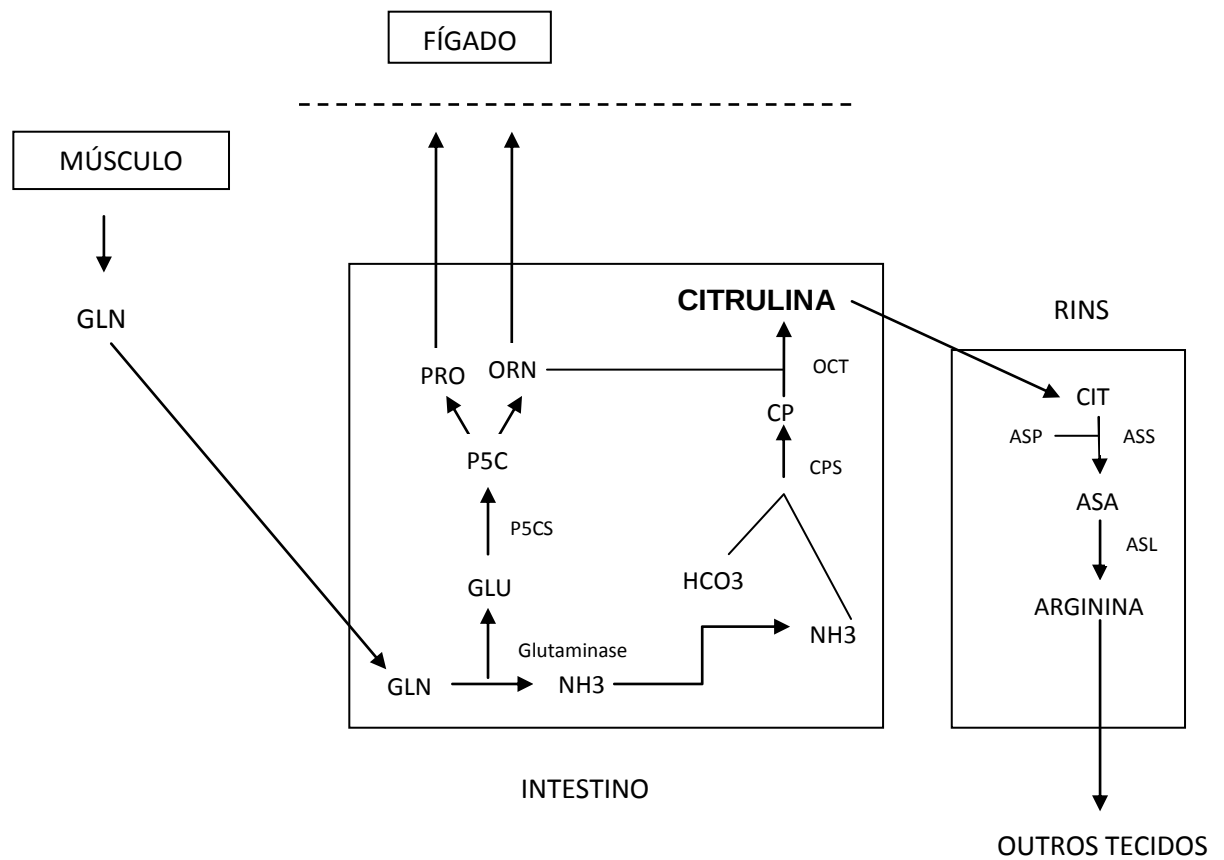
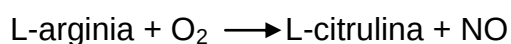


Fig. 1: Metabolismo da citrulina: Glutamina (GLN); Glutamato (GLU); Amônia (NH₃); Δ1-pirrolina-5-carboxilato sintetase (P5CS); Δ1-pirrolina-5-carboxilato (P5C); Prolina (PRO); Ornitina (ORN); Ácido Carbônico (HCO₃); Carbamoilfosfato sintetase (CPS); Carbamoilfosfato (CP); Ornitinacarbamoil transferase (OCT); Ácido argininosuccínico (ASA); Aspartato (ASP); Argininosuccinato sintetase (ASS); Argininosuccinato liase (ASL)

A citrulina também é considerada um precursor do óxido nítrico, já que células, como macrófagos e células endoteliais, que utilizam a arginina para produzi-lo também absorvem citrulina, formando o ciclo do óxido nítrico no citoplasma. No homem, a excreção urinária de nitrato pode ser um bom indicador da quantidade de citrulina sintetizada por esta via:



Importância clínica da citrulina

Alguns biomarcadores têm sido propostos para avaliar a função intestinal, incluindo a diaminooxidase, apoproteína IV (AIV), beta caroteno e testes de permeabilidade. A mais estudada é a diaminooxidase, uma enzima envolvida no catabolismo das poliaminas que parece ser largamente produzida em tecidos com alto “turnover” celular na mucosa intestinal. Entretanto, é um teste de baixa sensibilidade e especificidade⁽³⁾. Exames de avaliação funcional do intestino como D-xylose, teste de absorção com 3-O-metilglicose e razão da área de digestão dos nutrientes são exames demorados e de difícil aplicação na prática clínica⁽¹⁰⁾. A calpoptrectina fecal, uma proteína ligada ao cálcio e presente em neutrófilos, tem se mostrado como um sensível marcador de inflamação intestinal por infiltração de neutrófilos no lúmen como ocorre na doença de Crohn, mas tem pouca especificidade e não avalia a função da mucosa intestinal⁽³⁾. A endoscopia com magnificação de imagem, muito utilizada após transplante intestinal para avaliar a rejeição celular do enxerto, tem importante aplicação na visualização da mucosa intestinal porque permite o reconhecimento das lesões características da rejeição

auxiliando no início imediato do tratamento. Todavia, é um método examinador dependente^(11,12).

A concentração plasmática de citrulina pode avaliar a massa funcional de enterócitos e identificar quadros de falência intestinal, já que o intestino delgado é a principal fonte de citrulina circulante. Desta forma, a citrulina sérica seria considerada um indicador do metabolismo do enterócito^(6,7,10,13). Por outro lado, é provável que a concentração de citrulina não possa refletir os vários aspectos da função intestinal. Ela reflete a integridade das células epiteliais intestinais com um sítio predominante de produção no jejuno proximal, enquanto a absorção é uma função complexa integrada, relacionada à mucosa intestinal, secreção bilio-pancreática, motricidade digestiva, luz intestinal e absorção colônica. Além disso, o processo de absorção é variável na capacidade e localização de acordo com os nutrientes considerados. Assim, a concentração de citrulina é um indicador de massa funcional metabólica, mas não de função digestiva por si⁽²⁾.

Doenças intestinais relacionadas à citrulina

Enterite actínica: O uso da citrulina tem sido proposto como um marcador quantitativo de lesão do epitélio intestinal após radioterapia e mielossupressão, estando diminuída nessas condições clínicas. Parece ser mais específica e sensível, além de mais simples, do ponto de vista metodológico, e mais barata que os testes de absorção de açúcar para detectar danos intestinais causados pelo tratamento quimio e radioterápico de neoplasias hematológicas e outras terapias como

transplantes de medula óssea^(14,15), onde a diminuição dos níveis plasmáticos de citrulina parece ser um fator de risco para o desenvolvimento de infecções⁽¹⁴⁾.

Síndrome do intestino curto: A citrulina plasmática pode ser utilizada como fator prognóstico para definir falência intestinal transitória e permanente na síndrome do intestino curto, condição definida como síndrome de má-absorção e de grandes perdas digestivas causada por ressecção intestinal extensa, cujo remanescente apresenta um comprimento não maior que 150-200 cm. Assim, as concentrações plasmáticas de citrulina determinariam quais os pacientes que teriam sucesso no desmame da nutrição parenteral após dois anos da última cirurgia digestiva^(3,7). Além disso, parece haver forte correlação entre os níveis de citrulina e o comprimento do intestino remanescente, estando mais baixa quanto menor essa extensão^(6,7). Valores abaixo de 20 $\mu\text{mol/L}$ identificaria os pacientes portadores de falência intestinal permanente e, portanto, dependentes de nutrição parenteral e possíveis candidatos ao transplante de intestino.

Outros autores demonstraram a importância da citrulina sérica como marcador não invasivo de gravidade de falência intestinal na síndrome do intestino curto com vantagem sobre os testes de absorção intestinal, bem como marcador para efeitos tróficos do intestino nas terapias de reabilitação intestinal, não estando sua concentração relacionada ao status nutricional^(3,7,10).

Doença do microvilos: A citrulina funciona como marcador de massa de enterócitos (severidade e extensão) em doenças intestinais relacionadas à atrofia de vilosidades sem ressecção intestinal, que habitualmente são investigadas através de múltiplas biópsias sob enteroscopia. Valores abaixo de 10 $\mu\text{mol/L}$ diagnosticam atrofia vilosa extensa, independente da etiologia, sendo um fator preditivo para o uso

de nutrição parenteral. Além disso, os níveis de citrulina plasmática podem ser mais úteis que a albumina sérica como índice de extensão e resposta ao tratamento na doença do microvilo⁽³⁾.

A doença celíaca é o principal exemplo de doença do microvilo em países ocidentais. Nos países em desenvolvimento, destacam-se o sprue tropical e as enterites bacterianas⁽³⁾. Essas doenças envolvem principalmente o jejuno proximal, onde ocorre a maior produção de citrulina. Os principais agentes etiológicos das enterites são o *Mycobacterium tuberculosis* e parasitas como *Strongyloides stercoralis* e *Leishmania donovani*⁽¹⁶⁾. Outras condições associadas à atrofia de vilosidades incluem as síndromes de imunodeficiência primária ou secundária, sprue refratário e linfoma de células T^(6,7,17).

Da mesma forma, enteropatias agudas que levam à significativa perda de enterócitos, como na enterite por adenovírus, a citrulinemia pode estar reduzida, mas rapidamente volta aos níveis normais após 1-3 semanas⁽²⁾.

Doença inflamatória intestinal: A doença de Crohn não tem grande influência sobre as concentrações plasmáticas de citrulina, já que não há dano importante aos enterócitos.

Transplante intestinal: A história do transplante de intestino delgado começou com os experimentos realizados por Alexis Carrel no começo do século passado. Em 1959, Lillehei et al.⁽¹⁸⁾ publicaram o sucesso da retirada, preservação e reinserção do intestino em caráter experimental. No Brasil, Okumura et al.⁽¹⁹⁾ realizaram o primeiro transplante intestinal em 1968, utilizando-se imunossupressão com azatioprina, prednisona e soro anti-linfocitário em uma paciente de 34 anos com trombose da artéria mesentérica. O enxerto permaneceu por 10 dias e foi retirado, devido à

rejeição grave com necrose intestinal. O tempo de sobrevida foi de 12 dias e a receptora faleceu por sepse. O êxito com o transplante de intestino tornou-se possível a partir de 1990, devido ao desenvolvimento de um novo imunossupressor (Tacrólimus – PROGRAF).

As principais indicações do transplante em crianças são: gastrosquise, enterocolite necrotizante, doença de Hirschsprung, atresia intestinal e volvo de intestino delgado⁽¹⁹⁾, enquanto que nos adultos são: trombose de artéria mesentérica, trauma, doença de Crohn, volvo e tumor desmóide⁽²⁰⁾.

Atualmente, as técnicas reconhecidas incluem:

- ❖ Transplante isolado do intestino;
- ❖ Fígado e intestino;
- ❖ Fígado, intestino e pâncreas;
- ❖ Multivisceral.

O transplante multivisceral modificado vem sendo utilizado com indicações restritas e envolve todos os órgãos do transplante multivisceral, com exceção do fígado⁽²¹⁾.

A sobrevivência do doente e do enxerto após o transplante de intestino tem melhorado nos últimos anos, devido, sobretudo, à experiência adquirida na técnica cirúrgica e ao seguimento dos pacientes no pós-operatório imediato e tardio⁽¹²⁾.

Estudos preliminares têm mostrado o potencial da citrulina sérica como marcador de rejeição celular aguda (RCA) após o transplante intestinal⁽²²⁻²⁹⁾.

Pappas et al.⁽²²⁾, em 2001, compararam os valores da citrulina entre doentes pré-transplante de intestino e voluntários saudáveis, sendo que os níveis dos primeiros foram significativamente menores. Em 2004, foi analisado o impacto da

RCA sobre os níveis séricos de citrulina, concluindo-se que a concentração desse aminoácido diminui com o aumento do grau de rejeição com significância estatística⁽²⁴⁾.

David et al.^(12,28) analisaram o valor crítico da citrulina que confirma a presença das principais complicações do enxerto intestinal (rejeição e infecção), concluindo que, após três meses, período habitual para que ocorra a normalização dos níveis desse aminoácido após o transplante, a citrulina pode ser usada como método não invasivo para avaliar a evolução do enxerto, afastando os episódios de RCA moderada e/ou grave quando o valor da citrulina for maior que 13 μ mol/L, devido ao alto valor preditivo negativo.

Outras situações clínicas relacionadas à citrulina

Situações que aumentam a citrulina: ocorrem por aumento da produção ou diminuição da utilização. No primeiro, pode ser decorrente do aumento da produção intestinal por diminuição da ingesta protéica e o segundo corresponde à diminuição do clearance na urina em casos de insuficiência renal⁽³⁾.

Deficiências enzimáticas herdadas: argininosuccinato sintetase (ASS), argininosuccinato liase (ASL), arginase e piruvato-carboxilase - levam a um prejuízo da transformação de uréia ou arginina. Essa situação resulta em aumento da citrulina e amônia, com conseqüente insuficiência do ciclo da uréia, podendo evoluir para coma e óbito. Ocorre também aumento da glutamina⁽⁸⁾.

Dessa forma, existem três tipos hereditários de citrulinemia, I, II e III, sendo a I mais freqüente e grave. Esse tipo ocorre devido a uma mutação recessiva no gene da ASS⁽⁸⁾.

Nos casos de deficiência de ASL e/ou ASS, o transplante hepático é proposto como tratamento e permite a correção da hiperamonemia e seus efeitos deletérios⁽²⁹⁾.

A deficiência de piruvato-carboxilase ocorre por diminuição da síntese de aspartato, induzindo um efeito inibitório sobre a atividade da ASS. Há dois tipos, A e B, ambas caracterizadas por hiperlactoacidemia⁽⁸⁾.

Síndrome do triplo H (hiperornitinemia, hiperamonemia e homocitrulinúria): caracteriza-se por um aumento no plasma de ornitina e amônia e presença de homocitrulina na urina e ocorre devido a uma disfunção da troca mitocondrial ornitina-citrulina⁽³⁰⁾.

Situações que diminuem a citrulina: está relacionada a um defeito na síntese intestinal, que pode ser decorrente de uma significativa redução da massa de enterócitos, como já descrito, ou ocorrer por deficiência das enzimas mitocondriais do ciclo da uréia: N-acetilglutamato sintase (NAG sintase), carbamoilfosfato sintetase (CPS) e ornitinacarbamoil transferase (OCT)⁽³¹⁾.

Deficiência de $\Delta 1$ pirrolina-5-carboxilate sintetase: leva a defeito da síntese de ornitina e conseqüente diminuição de citrulina e arginina com aumento de amônia⁽²⁹⁾.

Stress metabólico grave: está associado à diminuição dos níveis de citrulina, como ocorre na pancreatite aguda e sepse, por diminuição da glutamina ou da atividade da glutaminase⁽³¹⁾. Os níveis de citrulina não são alterados em situações de desnutrição grave⁽³⁾.

A citrulina plasmática, em relação a outros aminoácidos, está diminuída em pacientes portadores de glucagonoma e hiperinsulinemia e em alguns pacientes que apresentam síndrome de Pearson⁽³²⁾.

Brandt et al.⁽³³⁾, em 2006, publicaram artigo analisando os níveis de óxido nítrico produzidos por monócitos em portadores de esquistossomose hepatoesplênica, observando, de forma coletiva, um restabelecimento na normalidade da produção de óxido nítrico nos pacientes que receberam tratamentos clínico e cirúrgico, sobretudo os que receberam auto-implante de fragmentos de tecido esplênico no omento maior, dando suporte à hipótese de que esse procedimento é importante para o restabelecimento da função imune com a qual o óxido nítrico se relaciona. A citrulina, bem como a L-arginina, podem agir como precursores do óxido nítrico, formados no ciclo da uréia.

Citrulina como suplementação oral

Poucos estudos têm sido realizados a respeito da farmacocinética da citrulina, mas confirmam que ela é eficientemente absorvida quando administrada por via oral⁽³⁾.

A citrulina é um farmaconutriente candidato a manter o metabolismo de proteínas em doenças intestinais e em idosos malnutridos com resistência à renutrição. A administração de citrulina pode constituir estratégia terapêutica para o controle das anormalidades no metabolismo do óxido nítrico nos macrófagos, que desempenham importante papel na defesa contra agentes invasores⁽⁶⁾.

A arginina torna-se essencial em condições de stress por sua significativa degradação pela arginase, levando à diminuição da imunidade⁽³⁴⁾. Tal situação pode melhorar pelo fornecimento de citrulina aos linfócitos T, que a utilizam para formar arginina⁽⁸⁾.

Pacientes que apresentam distúrbios hematológicos relacionados à forma das hemácias (anemia falciforme) podem evoluir com melhora clínica após suplemento com citrulina, que age como precursor do óxido nítrico, o qual promove vasodilatação e vasoproteção, permitindo adequada circulação das hemácias falciformes nos vasos sanguíneos⁽⁸⁾.

Nos idosos, bem como em cerca de 30-60% dos pacientes hospitalizados, a desnutrição é freqüente, sendo acompanhada por um prejuízo no metabolismo das proteínas, devido a um maior seqüestro esplâncnico de aminoácidos, sobretudo no período pós-prandial. Tal situação também acontece no trauma, câncer e diabetes tipo 2. Como consequência, a concentração de aminoácidos no plasma torna-se inadequada. Logo, como não há hiperaminoacidemia (balanço nitrogenado negativo), não há estímulo para síntese protéica o que torna esses pacientes especialmente resistentes à tentativa de nutrição. Considerando que a citrulina não é extraída pelo fígado através da circulação esplâncnica, ela chega intacta aos rins, onde é transformada em arginina, a qual é liberada para os demais tecidos, a fim de se promover a síntese protéica, além de se estimular a secreção de insulina, que é outro fator positivo da síntese de proteínas. O fornecimento de citrulina ao suporte nutricional desses indivíduos poderia levar ao aumento da disponibilidade de arginina nos tecidos periféricos de forma mais eficiente que a arginina oral, pois esta sofre intensa degradação nos hepatócitos pela atividade da arginase hepática⁽³⁵⁾.

Smith et al.⁽³⁶⁾, em 2006, analisaram a segurança de uma suplementação oral com citrulina em crianças submetidas a *bypass* cardiopulmonar, concluindo que a citrulina pode ser efetiva em reduzir a hipertensão pulmonar pós-operatória ao aumentar a concentração plasmática de citrulina e, conseqüentemente, de arginina, que é precursora do óxido nítrico.

A glutamina fornecida através de nutrição enteral ou parenteral pode ser utilizada para síntese de citrulina, quando fornecida livre ou como dipeptídeo (alanina-glutamina), parecendo que a dieta exógena bem como a glutamina endógena (arterial) podem ser fontes de citrulina com melhor eficiência da dieta enteral^(2,37,38).

Técnicas de dosagem da citrulina plasmática

Fisiologicamente, a concentração de aminoácidos no plasma é difícil de ser aferida, pois o “pool” celular é maior que o “pool” plasmático.

Nas décadas de 70 e 80, foram publicados alguns métodos de análise da atividade da *Ornitina carbamoyl transferase*, enzima que promove a condensação da ornitina com carbamílfosfato em citrulina. Tal atividade é medida por colorimetria. Assim, o valor da citrulina plasmática é analisado por espectrometria (absorbância), sem desproteinização, garantindo boa reprodutibilidade, baixo custo e fácil técnica de realização. Entretanto, exige ótimas condições para que possa ser realizada eficazmente, envolvendo temperatura e luminosidade⁽³⁹⁻⁴⁴⁾.

A cromatografia por troca de íons é uma coluna trocadora de íons que serve para purificar soluções através das cargas presentes na solução. A solução de ninhidrina reage com todos os aminoácidos e derivados livres, mas com afinidades diferentes. Neste processo, inicialmente, a solução é purificada e depois os

aminoácidos reagem com a ninhidrina, sendo detectados no cromatógrafo. É considerada um método referencial para análise de aminoácidos, sendo sua limitação a baixa sensibilidade, o que a torna inadequada para medições de diferenças arteriovenosas⁽²⁾.

Atualmente, a cromatografia líquida de alta performance, que permite a desproteinização do soro, é um método mais sensível, permitindo medições de diferenças arteriovenosas, mas não apresenta boa reprodutibilidade⁽²⁾.

A citrulina tem sido analisada também pela interação hidrofílica de cromatografia/espectrometria de massa/ espectrometria de massa em gota de sangue ressecada para monitorizar a função intestinal após transplante⁽⁴⁵⁾.

O método *Ultra-performance liquid chromatography-tandem mass Spectrometry* (UPLC-MS/MS) é rápido e uma ferramenta ideal para monitorizar a capacidade do enterócito em pacientes com algumas condições patológicas⁽⁴⁶⁾.

Peters et al.⁽⁴⁷⁾, em 2008, propuseram um teste de geração de citrulina para avaliar a função dos enterócitos, a qual estaria lentificada ou atenuada em pacientes com doença celíaca e síndrome do intestino curto. Segundo os autores, a citrulina plasmática funciona apenas como biomarcador de função intestinal nos casos mais extremos da doença.

Considerações finais e perspectivas

A concentração de citrulina plasmática está relacionada com a massa de enterócitos existente e também com o estado funcional dessas células, permitindo sua utilização na prática clínica pela facilidade das técnicas atuais de dosagem e por sua sensibilidade relacionada a doenças intestinais, o que pode, futuramente,

aplicá-la em outras morbidades que levam à perda da integridade do epitélio intestinal como a esquistossomose mansônica. Apesar de ser uma doença milenar e de ter sua prevalência diminuída nos últimos anos, a esquistossomose ainda constitui grave problema de saúde pública pela mortalidade e incapacidade produtiva na faixa etária mais jovem. Há poucos estudos a respeito da relação entre os efeitos da hipertensão porta esquistossomótica sobre a mucosa do intestino delgado. Por outro lado, sabe-se que a translocação bacteriana através da barreira mucosa intestinal tem sido postulada como fonte de sepse em pacientes suscetíveis, incluindo cirróticos, portadores de hipertensão porta, vítimas de trauma ou após transplante de intestino^(48,49). Ferraz et al.⁽⁵⁰⁾, em 2005, determinaram a prevalência de bactérias aeróbicas nos linfonodos mesentéricos de pacientes com esquistossomose na forma hepatoesplênica e possível associação com infecções pós-operatórias, cujos resultados sugeriram que a presença de bactérias aeróbicas nos linfonodos mesentéricos, como consequência de translocação bacteriana, poderiam ter um papel no desenvolvimento de complicações pós-operatórias, particularmente em pacientes esquistossomóticos. Como a imunodeficiência, nesses pacientes, não possui um mecanismo bem definido, talvez a dosagem de citrulina sérica nessa doença possa desempenhar importante papel na tentativa de esclarecer sua fisiopatologia, já que a citrulina está relacionada com a produção de óxido nítrico, importante substância para a manutenção e integridade do sistema imunológico.

Além disso, procedimentos que criam má-absorção intestinal proximal, como o *bypass* gástrico, poderão ser avaliados pelos níveis séricos de citrulina, o que a

torna uma ferramenta válida para análise do intestino delgado nas síndromes disabsortivas.

A citrulina plasmática é um indicador de funcionalidade do enterócito e, portanto, de prognóstico nutricional de um trato digestivo comprometido. Por outro lado, relaciona-se com o sistema imunológico por meio da produção de óxido nítrico a partir da arginina. Dessa forma, a perspectiva é que a dosagem sérica da citrulina possa ser aplicada como método não invasivo da função intestinal e imunológica em doenças com acometimento do intestino delgado e com repercussões sobre o sistema imune.

REFERÊNCIAS

1. WU G. Intestinal mucosal amino acid catabolism. *J Nutr.* 1998;128:1249-52.
2. CURIS E, CRENN P, CYNOBER L. Citrulline and the gut. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2007;10:620-6.
3. CRENN P, MESSING B, CYNOBER L. Citrulline as a biomarker of intestinal failure due to enterocyte mass reduction. *Clin Nutr* 2008;27:328-39.
4. FLYNN NE, MEININGER CJ, HAYNES TE, WU G. The metabolic basis of arginine nutrition and pharmacotherapy. *Biomed Pharmacother* 2002;56:427-38.
5. CHIH-KUANG C, SHUAN-PEI L, SHYUE-JYE L, TUAN-JEN W. Plasma free amino acids in Taiwan Chinese: the effect of age. *Clin Chem Lab Med* 2002;40:378-82.
6. CRENN P, COUDRAY-LUCAS C, THUILLIER F, CYNOBER L, MESSING B. Postabsorptive plasma citrulline concentration is a marker of absorptive enterocyte mass and intestinal failure in humans. *Gastroenterology* 2000;119:1496-505.

7. CRENN P, VAHEDI K, LAVERGNE-SLOVE A, CYNOBER L, MATUCHANSKY C, MESSING B. Plasma citrulline: A marker of enterocyte mass in villous atrophy-associated small bowel disease. *Gastroenterology* 2003;124:1210-9.
8. CURIS E, NICOLIS I, MOINARD C, et al. Almost all about citrulline in mammals. *Amino Acids* 2005;29:177-205.
9. WINDMUELLER H, SPAETH AE. Source and fate of circulating citrulline. *Am J Physiol* 1981;241:E473-80.
10. JIANFENG G, WEIMING Z, NING L, et al. Serum citrulline is a simple quantitative marker for small intestinal enterocytes mass and absorption function in short bowel patients. *J Surg Res* 2005;127:177-82.
11. KATO T, GAYNOR JJ, NISHIDA S, et al. Zoom endoscopic monitoring of small bowel allograft rejection. *Surg Endosc* 2006;20:773-82.
12. DAVID AI, SELVAGGI G, RUIZ P, et al. Blood citrulline level is an exclusionary marker for significant acute rejection after intestinal transplantation. *Transplantation* 2007;84:1077-81.
13. RHOADS JM, PLUNKETT E, GALANKO J, et al. Serum citrulline levels correlate with enteral tolerance and bowel length in infants with short bowel syndrome. *J Pediatr* 2005;146:542-7.
14. BLIJLEVENS NM, LUTGENS LC, SCHATTENBERG AV, DONNELLY JP. Citrulline: a potentially simple quantitative marker of intestinal epithelial damage following myeloablative therapy. *Bone Marrow Transplant* 2004;34:193-6.
15. LUTGENS LC, BLIJLEVENS NM, DEUTZ NE, DONNELLY JP, LAMBIN P, DE PAUW BE. Monitoring myeloablative therapy-induced small bowel toxicity by serum citrulline

- concentration: a comparison with sugar permeability tests. *Cancer* 2005;103:191-9.
16. RAMAKRISHNA BS, VENKATARAMAN S, MUKHOPADHYA A. Tropical malabsorption. *Postgrad Med J* 2006;82:779-87.
 17. CRENN P, COUDRAY-LUCAS C, CYNOBER L, MESSING B. Post-absorptive plasma citrulline concentration: a marker of intestinal failure in humans. *Transplant Proc* 1998;30:2528.
 18. LILLEHEI RC, GOOTT B, MILLER FA. The physiological response of the small bowel of the dog to ischemia including prolonged in vitro preservation of the bowel with successful replacement and survival. *Ann Surg* 1959;150:543-59.
 19. OKUMURA M, MESTER M. The coming of age of small bowel transplantation in humans: a historical perspective. *Transplant Proc* 1992;24:1241
 20. KATO T, GAYNOR JJ, SELVAGGI G, et al. Intestinal transplantation in children: A summary of clinical outcomes and prognostic factors in 108 patients from a single center. *J Gastrointest Surg* 2005;9:75-89.
 21. TZAKIS AG, KATO T, LEVI DM, et al. 100 multivisceral transplants at a single center. *Ann Surg* 2005;242:480-93.
 22. KATO T, TZAKIS AG, GENNARO S, et al. Intestinal and multivisceral transplantation in children. *Ann Surg* 2006;243:756-66.
 23. PAPAS PA, SAUDUBRAY JM, TZAKIS AG, et al. Serum citrulline and rejection in small bowel transplantation: a preliminary report. *Transplantation* 2001;72:1212-6.
 24. PAPPAS PA, SAUDUBRAY JM, TZAKIS AG, et al. Serum citrulline as a marker of acute cellular rejection for intestinal transplantation. *Transplant Proc* 2002;34:915-7.

25. PAPPAS PA, TZAKIS AG, GAYNOR JJ, et al. An analysis of the association between serum citrulline and acute rejection among 26 recipients of intestinal transplant. *Am J Transplant* 2004;4:1124-32.
26. GONDOLESI G, FISHBEIN T, CHEHADE M, TSCHERNIA A, MAGID M, KAUFMAN S. Serum citrulline is a potential marker for rejection of intestinal allografts. *Transplant Proc* 2002;34:918-20.
27. GONDOLESI GE, KAUFMAN SS, SANSARICQ C, et al. Defining normal plasma citrulline in intestinal transplant recipients. *Am J Transplant* 2004;4:414-8.
28. GONDOLESI G, GHIRARDO S, RAYMOND K, et al. The value of plasma citrulline to predict mucosal injury in intestinal allografts. *Am J Transplant* 2006;6:2786-90.
29. DAVID AI, GAYNOR JJ, ZIS PP, et al. An association of lower serum citrulline levels within 30 days of acute rejection in patients following small intestine transplantation. *Transplant Proc* 2006;38:1731-2.
30. RABIER D, KAMOUN P. Metabolism of citrulline in man. *Amino Acids* 1995;9:299-316. CAMACHO JA, OBIE C, BIERY B, et al. Hyperornithinaemia-hyperammonaemia-homocitrullinuria syndrome is caused by mutations in a gene encoding a mitochondrial ornithine transporter. *Nat Genet* 1999;22:151-8.
31. CAMACHO JA, OBIE C, BIERY B, et al. Hyperornithinaemia-hyperammonaemia-homocitrullinuria syndrome is caused by mutations in a gene encoding a mitochondrial ornithine transporter. *Nat Genet* 1999;22:151-8.
32. SANDSTROM P, TRULSSON L, GASSLANDER T, SUNDQVIST T, VON DOBELN U, SVANVIK J. Serum amino acid profile in patients with acute pancreatitis. *Amino Acids* 2008;35:225-31.

33. RIBES A, RIUDOR E, VALCÁREL R, et al. Pearson syndrome: altered tricarboxylic acid and urea-cycle metabolites, adrenal insufficiency and corneal opacities. *J Inherit Metab Dis* 1993;16:537-40.
34. BRANDT CT, LEITE CRC, MANHÃES-DE-CASTRO FM, MACEDO EMC, SILVA RPP, CASTRO CMM. Nitric oxide monocyte production levels in patients with the hepatosplenic form of *Schistosoma mansoni* infection who underwent splenectomy, ligation of the left gastric vein and auto implantation of spleen tissue in the major omentum. *Acta Cirurg Bras* 2006;21:285-90.
35. BANSAL V, RODRIGUEZ P, WU G, et al. Citrulline can preserve proliferation and prevent the loss of CD3 zeta chain under conditions of low arginine. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 2004;28:423-30.
36. OSOWSKA S, DUCHEMANN T, WALRAND S, et al. Citrulline modulates muscle protein metabolism in old malnourished rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2006;291:E582-6.
37. SMITH HA, CANTER JA, CHRISTIAN KG, et al. Nitric oxide precursors and congenital heart surgery: a randomized controlled trial of oral citrulline. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2006;132:58-65.
38. BOELEN PG, VAN LEEUWEN PA, DEJONG CH, DEUTZ NE. Intestinal renal metabolism of L-citrulline and L-arginine following enteral or parenteral infusion of L-alanyl-L-[2,¹⁵N] glutamine or L-[2,¹⁵N] glutamine in mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2005;289:G679-85.
39. BOELEN PG, MELIS GC, VAN LEEUWEN PA, TEN HAVE GA, DEUTZ NE. Route of administration (enteral or parenteral) affects the contribution of L-glutamine to de

- novos L-arginine synthesis in mice: a stable-isotope study. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2006;291:E683-90.
40. CERIOTTI G. Ultramicrodetermination of plasma urea by reaction with diacetylmonoxime-antipyrine without deproteinization. *Clin Chem* 1971;17:400-2.
41. BUTTERY JE, BARON DN. Comparison of colorimetric methods for serum ornithine carbamoyltransferase. *Clin Chim Acta* 1972;38:242-3.
42. CERIOTTI G. Optimal conditions for ornithine carbamyl transferase determination. A simple micromethod without deproteinization. *Clin Chim Acta* 1973;47:97-105.
43. OHSHITA M, TAKEDA H, KAMIYAMA Y, OZAWA K, HONJO I. A direct method for the estimation of ornithine carbamoyltransferase activity in serum. *Clin Chim Acta* 1976;67:145-52.
44. VASSEF AA. Direct micromethod for colorimetry of serum ornithine carbamoyltransferase activity, with use of a linear standard curve. *Clin Chem* 1978;24:101-7.
45. MOORE RB, KAUFFMAN NJ. Simultaneous determination of citrulline and urea using diacetylmonoxime. *Anal Biochem* 1970;33:263-72.
46. YU HC, TUTEJA S, MOON JI, et al. Utilization of dried blood spot citrulline level as a noninvasive method for monitoring graft function following intestinal transplantation. *Transplantation* 2005;80:1729-33.
47. DEMACKER PN, BEIJERS AM, VAN DAAL H, DONNELLY JP, BLIJLEVEN NM, VAN DEN OUWELAND JM. Plasma citrulline measurement using UPLC tandem mass-spectrometry to determine small intestinal enterocyte pathology. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2009;877:387-92.

48. PETERS JH, WIERDSMA NJ, TEERLINK T, VAN LEEUWEN PA, MULDER CJ, VAN BODEGRAVEN AA. The citrulline generation test: proposal for a new enterocyte function test. *Aliment Pharmacol Ther* 2008;27:1300-10.
49. SPATH G, HIRNER A. Microbial translocation and impairment of mucosal immunity induced by an elemental diet in rats is prevented by selective decontamination of the digestive tract. *Eur J Surg* 1998;164:223-8.
50. CUCCHETTI A, SINISCALCHI A, BAGNI A, et al. Bacterial translocation in adult small bowel transplantation. *Transplant Proc* 2009;41:1325-30.
51. FERRAZ AA, CAMPOS JM, ARAÚJO JÚNIOR JG, ALBUQUERQUE AC, FERRAZ EM. Gut bacterial translocation and postoperative infections: A prospective study in Schistosomotic patients. *Surg Infect* 2005; 6:197-201.



Artigo Original

Análise da Citrulina Plasmática e Morfometria Intestinal em Camundongos Infectados com *Schistosoma mansoni* na Forma Hepatoesplênica

Luciana T. Siqueira^{1/+}; Álvaro B. Ferraz¹; Josemberg M. Campos¹; José L. de Lima
Filho²; Mônica C.P.A. Albuquerque²; Maria H. Lima²; Taciana S. Vieira²; Carmelita
Cavalcanti²; André L. Aires²; Edmundo M. Ferraz¹

¹Departamento de Cirurgia, Serviço de Cirurgia Geral do Hospital das Clínicas, Universidade Federal
de Pernambuco, Recife-PE, ²Laboratório de Imunopatologia Keiso Asami - LIKA

Correspondência do autor: Luciana Teixeira de Siqueira
Rua João Sales de Menezes, 419 – Apto. 501 – Várzea
50740-110 - Recife - PE - - Brasil

RESUMO

Introdução: A influência da esquistossomose mansônica sobre a função digestiva tem sido pouco estudada, a qual pode estar alterada devido à ação da hipertensão porta sobre a mucosa do intestino e à presença de ovos e granulomas na parede intestinal. A citrulina é um potencial marcador da função intestinal em algumas doenças que alteram a morfometria da mucosa, devido a sua estreita relação com o enterócito. Um estudo foi conduzido para avaliar os níveis séricos de citrulina no plasma de camundongos com esquistossomose na forma hepatoesplênica, correlacionar os valores de citrulina com as alterações morfométricas sobre a mucosa intestinal e avaliar o efeito da esplenectomia sobre a concentração desse aminoácido.

Métodos: Após a aprovação do Comitê de Ética, foram estudados 46 camundongos albino-Swiss, adultos, fêmeas, e selecionados em dois grupos: controle - 23 animais saudáveis - e experimental - 23 animais infectados pelo *Schistosoma mansoni* na forma hepatoesplênica. As amostras de sangue foram coletadas nos dois grupos e centrifugadas para análise da citrulina no plasma antes e após a esplenectomia. Segmento do jejuno foi ressecado para análise histológica e morfométrica.

Resultados: A média de peso corporal no grupo controle foi maior em relação ao experimental ($p=0,00062$). O valor médio da citrulina no grupo controle foi maior que no grupo experimental antes e após a esplenectomia ($p=0,000$). Na análise morfométrica do jejuno, o grupo experimental apresentou menor altura e área das vilosidades bem como menor perímetro da superfície mucosa ($p=0,003$; $0,000$ e $0,001$, respectivamente). No grupo experimental, observou-se correlação direta entre os valores da citrulina e a altura e área das vilosidades ($p=0,003$ e $0,04$, respectivamente). Não houve correlação entre os níveis da citrulina e o perímetro da superfície da mucosa jejunal ($p>0,05$). Após a esplenectomia, houve diminuição no valor médio da citrulina no grupo experimental ($p=0,009$), e no controle, porém sem significância ($p>0,05$).

Conclusões: Os níveis de citrulina estão diminuídos no plasma de camundongos esquistossomóticos e apresentaram correlação direta com a área e altura das vilosidades do jejuno. Além disso, após a esplenectomia, houve diminuição na concentração plasmática de citrulina nos camundongos infectados.

ABSTRACT

Introduction: The influences of mansonic schistosomiasis on the digestive function have been little studied. Portal hypertension on the mucosa of the intestine and the presence of granulomas on the wall of this organ are some of them. Citrulline is a potential marker of intestinal function in some diseases, which bring effects to the morphometry of the mucosa, due to its narrow relation with the enterocytes. A study was conducted in order to evaluate citrulline serum levels in the plasma of mice with schistosomiasis in its hepatosplenic form and analyze morphological repercussions on the small bowel mucosa, correlating levels of citrulline with morphometric changes in the intestinal mucosa and to evaluate the effect of splenectomy on that concentration.

Methods: After approval from the Committee of Ethics, 46 adult female albino Swiss mice, were selected in two groups: control – 23 healthy mice; experimental – 23 infected with *Schistosoma mansoni*, with the hepatosplenic form. Blood samples were collected from these two groups and centrifuged for citrulline analysis in the plasma before and after splenectomy. A jejune segment was resected for histological and morphometric analysis.

Results: The mean corporal weight in the control group was greater than that in the experimental ($p=0.00062$). The mean citrulline level in the control group was greater in the experimental before and after splenectomy ($p=0.000$). In the morphometric analysis of the jejunum, the experimental group showed less height and villous area as well as smaller perimeter of mucosa surface ($p=0.003$; 0.000 e 0.001 , respectively). In the experimental group, a direct correlation between citrulline levels and height of villous area was seen ($p=0.003$ e 0.04 , respectively). There was no correlation between citrulline levels and perimeter of the surface of the jejunal mucosa ($p>0.05$). After splenectomy, there was a reduction in the mean level of citrulline in the experimental group ($p=0.009$), but in the control group this is not evidenced ($p>0.05$).

Conclusions: Citrulline levels are diminished in the plasma of schistosomotic mice and revealed direct correlation with area and height of jejunum villous. In addition to that, after splenectomy, there was a reduction in the plasma concentration of citrulline in the experimental mice.

INTRODUÇÃO

O *Schistosoma mansoni* acomete mais de 200 milhões de indivíduos no mundo, sendo 20 milhões com doença grave, e está distribuída em 76 países na Ásia, África e América, segundo dados da Organização Mundial de Saúde [1].

De acordo com o Ministério da Saúde, o Brasil é o país mais atingido pela enfermidade na América. Estima-se que 25 milhões de brasileiros estejam sob risco de infecção. Em Pernambuco, estado do Nordeste com maior incidência, houve 15 mil casos da doença em 2007 [2].

Ferreira & Silva [3] observaram redução na mortalidade por esquistossomose em aproximadamente 63% entre 1980 e 2003. Está havendo também queda na prevalência, através do tratamento em massa com oxamniquine e praziquantel [4]. Todavia, ainda ocorre transmissão da doença e a prevalência não é menor do que 5% [5].

A fase crônica da doença é dividida em três formas clínicas: intestinal, hepatointestinal e hepatoesplênica (compensada e descompensada) [6]. A forma intestinal geralmente é assintomática e a forma hepatointestinal decorre do alojamento de ovos no fígado [7], evoluindo para a forma hepatoesplênica, que é caracterizada por fibrose periportal e hipertensão porta [8].

A propagação da hipertensão porta aos ramos intestinais terminais pode levar a alterações na função dos enterócitos, resultando em quadros de má-absorção e mudanças no padrão metabólico do organismo [9-12], que se somam às alterações clínicas, nutricionais e histopatológicas determinadas pela presença de ovos e granulomas na parede intestinal [13]. Alguns autores evidenciaram mudanças

estruturais na mucosa do intestino delgado como atrofia de vilosidades [10,13,14-16], parecendo haver uma tendência à recuperação do padrão mucoso normal após a redução da pressão porta através do tratamento cirúrgico [13].

Estudos experimentais têm mostrado a estreita relação entre citrulina e enterócito, pois a concentração plasmática desse aminoácido depende de sua síntese na vilosidade da célula intestinal, sobretudo no jejuno, através do metabolismo da glutamina [17-31]. Dessa forma, a citrulina sérica está relacionada com a massa de enterócitos existente e seu estado funcional, o que a tornaria um biomarcador não invasivo da função intestinal em algumas doenças que envolvem a mucosa do intestino delgado, como rejeição e/ou infecção do enxerto intestinal [29,32-36], síndrome do intestino curto [29,37-40], doença do microvilo [29], enterites actínicas causadas por tratamento de neoplasias hematológicas e outras terapias mieloablativas [41-43], síndromes de imunodeficiência primária ou secundária e linfoma de células T [28].

A esquistossomose compromete a mucosa intestinal, mas existem poucos estudos que possam, com segurança, predizer a evolução da doença sobre as alterações na mucosa intestinal e suas repercussões na função digestiva.

Por outro lado, o surgimento de técnicas cirúrgicas para o tratamento da forma avançada da esquistossomose faz crescer a necessidade de avaliações científicas, do ponto de vista biológico, que confirmem a eficácia de tais procedimentos no que diz respeito a uma melhora nas condições gerais do indivíduo e na arquitetura da mucosa intestinal.

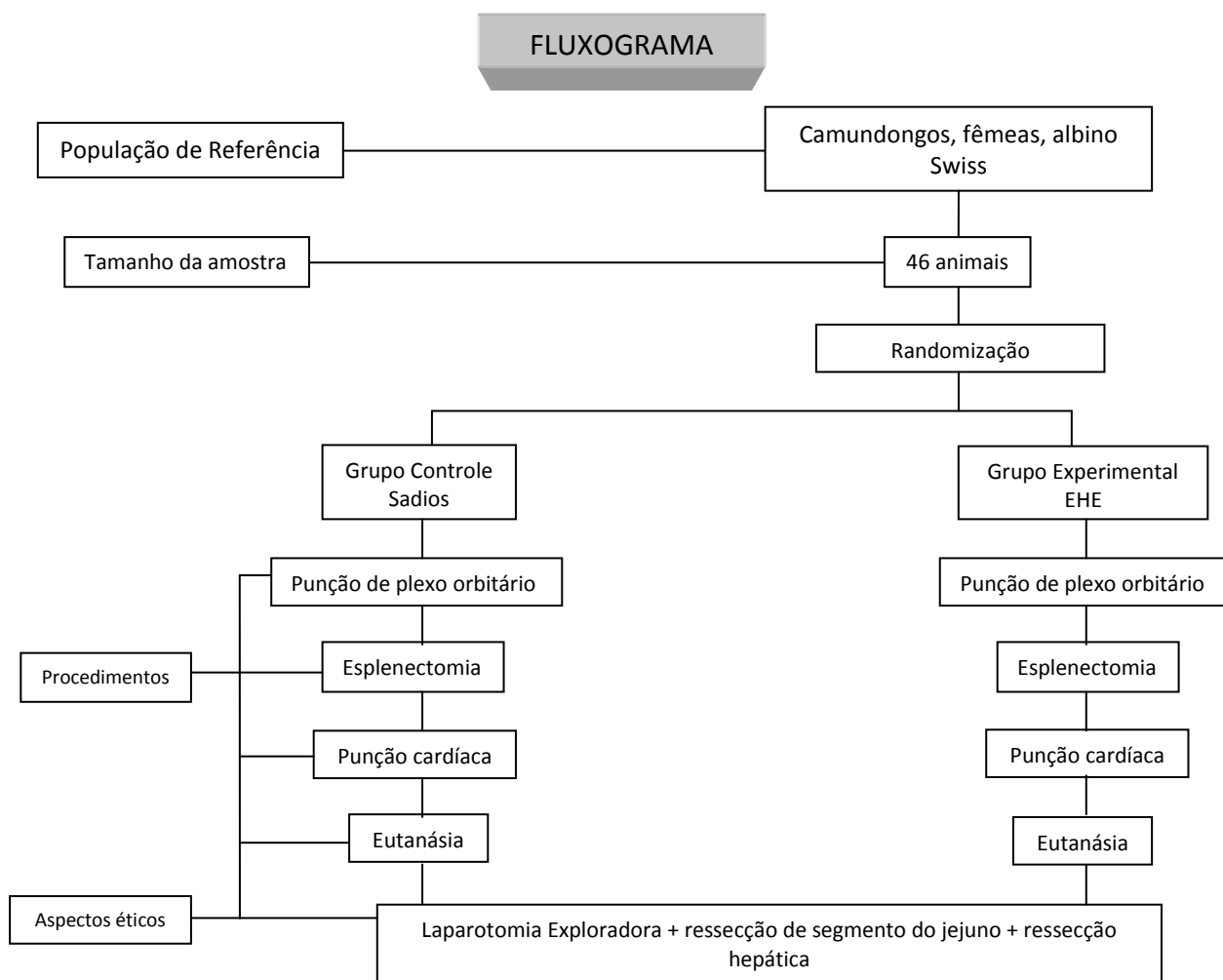
Os objetivos deste estudo foram avaliar os níveis de citrulina no plasma de camundongos infectados com *Schistosoma mansoni* na forma hepatoesplênica, investigar as repercussões morfológicas da doença sobre a mucosa do intestino delgado, correlacionando os valores da citrulina com as alterações morfométricas e avaliar a influência da esplenectomia sobre sua concentração plasmática.

MATERIAIS E MÉTODOS

Foram estudados 46 camundongos do modelo murino, espécie *mus musculus* e linhagem Swiss-albina, adultos, fêmeas, peso médio 40 g, sendo infectados 23 animais por meio de exposição percutânea com 50 cercárias de *Schistosoma mansoni* (cepa Belo Horizonte) provenientes de moluscos *Biomphalaria glabrata*. A infecção foi realizada sob anestesia intramuscular com ketamina e xilasina na proporção de 2:1, dose 4mg/Kg de peso, após período de quarentena (45 dias de vida). Os animais foram adquiridos no biotério do Laboratório de Imunopatologia Keiso Asami (LIKA) e mantidos em gaiolas individuais, sob condições padronizadas de temperatura (23° C), umidade (entre 40 e 50%) e iluminação (ciclo claro/escuro de 12/12 horas), com fornecimento de água, *ad libitum*, e ração peletizada com 23% de conteúdo protéico (LABINA®).

Tratou-se de estudo de intervenção, prospectivo e analítico utilizando modelo experimental. Os animais foram randomizados em dois grupos: **controle** - 23 camundongos sadios, antes e após esplenectomia - e **experimental** - 23 camundongos infectados pelo *Schistosoma mansoni*, na forma hepatoesplênica, antes e após a esplenectomia.

Após 60 dias da infecção, utilizou-se o método de Kato-Katz [44] para a confirmação da doença, quantificando os ovos de *S. mansoni* nas fezes dos animais. Os grupos foram estudados, seguindo o fluxograma abaixo.



Grupo controle. Os animais foram pesados e, em seguida, sob anestesia intramuscular com solução de Ketalar® (0,02 de xilazina/0,08 de ketamina), dose de 4mg/kg de peso, foi coletada amostra de sangue (0,5mL) através do plexo vascular do globo ocular (retro-orbitário) para análise da citrulina. O globo ocular foi lavado com soro fisiológico a 0,9% e administrado antibiótico tópico. Após dez dias, foi

realizada a mesma técnica anestésica e os animais foram submetidos à laparotomia exploradora para a realização da esplenectomia. No 5º dia pós-esplenectomia, sob a anestesia já descrita, foi realizada nova coleta de sangue (0,5mL) através de punção cardíaca para análise da citrulina pós-operatória. Os animais foram submetidos à eutanásia através de deslocamento da coluna cervical e, neste momento, realizou-se nova laparotomia para a retirada do fígado e de segmento do jejuno. Todas as peças foram conservadas em formalina a 10% (solução tampão, pH 7,4) para posterior estudo histopatológico. O baço e o fígado foram pesados.

Grupo Experimental. Os animais foram submetidos aos mesmos procedimentos acima descritos no grupo controle, exceto pela realização de perfusão do sistema venoso portal, segundo a técnica de Duvall & DeWitt [45], para quantificação dos vermes no sistema mesentérico, a fim de analisar a intensidade da infecção.

Critérios de avaliação

Serão analisadas as seguintes variáveis: peso corporal, assim como, dois parâmetros específicos: a dosagem da citrulina para análise da concentração sérica e morfometria intestinal para análise da altura e área das vilosidades e da área total da superfície mucosa.

Dosagem da citrulina

As amostras de sangue foram centrifugadas a 0°C, numa velocidade de 50.000 rotações por minuto (RPM), durante 20 minutos, em centrífuga eletrônica TX-160 modelo TOMY, com separação do plasma através de pipeta de precisão de 100 a 200 microlitros. A seguir, as amostras foram transferidas para tubos *Eppendorfs* e

conservadas em *deep freezer* a -80°C para posterior análise. A determinação dos níveis plasmáticos de citrulina, em $\mu\text{mol/mL}$, foi realizada através do método de colorimetria sem desproteinização, em duplicata, de acordo com o método de Vassef [46].

Morfometria do jejuno

As peças do jejuno foram seccionadas no sentido transversal e longitudinal, submetidas a processamento histológico e incluídas em parafina, seguido de cortes com $4\mu\text{m}$ de espessura, que foram corados com hematoxilina-eosina. As lâminas foram avaliadas sob microscopia de luz em objetiva de 10x e 40x, cujas imagens foram capturadas através de uma câmera acoplada ao microscópio e reproduzidas no computador através do programa Motic Images Plus 2.0. As imagens foram abertas no programa Image J, onde foram realizadas as medidas automáticas, em pixel (unidade de leitura de resolução de imagem), da altura e área das vilosidades bem como da área total da superfície mucosa (perímetro). Em cada lâmina, correspondente a um camundongo, foram selecionadas de cinco a dez vilosidades. Como critério de exclusão para a análise morfométrica do jejuno foi selecionado a presença de granulomas na lâmina própria e submucosa por deslocarem as vilosidades para o espaço intraluminal, o que poderia promover aparente aumento da altura e área das mesmas (Fig. 2).

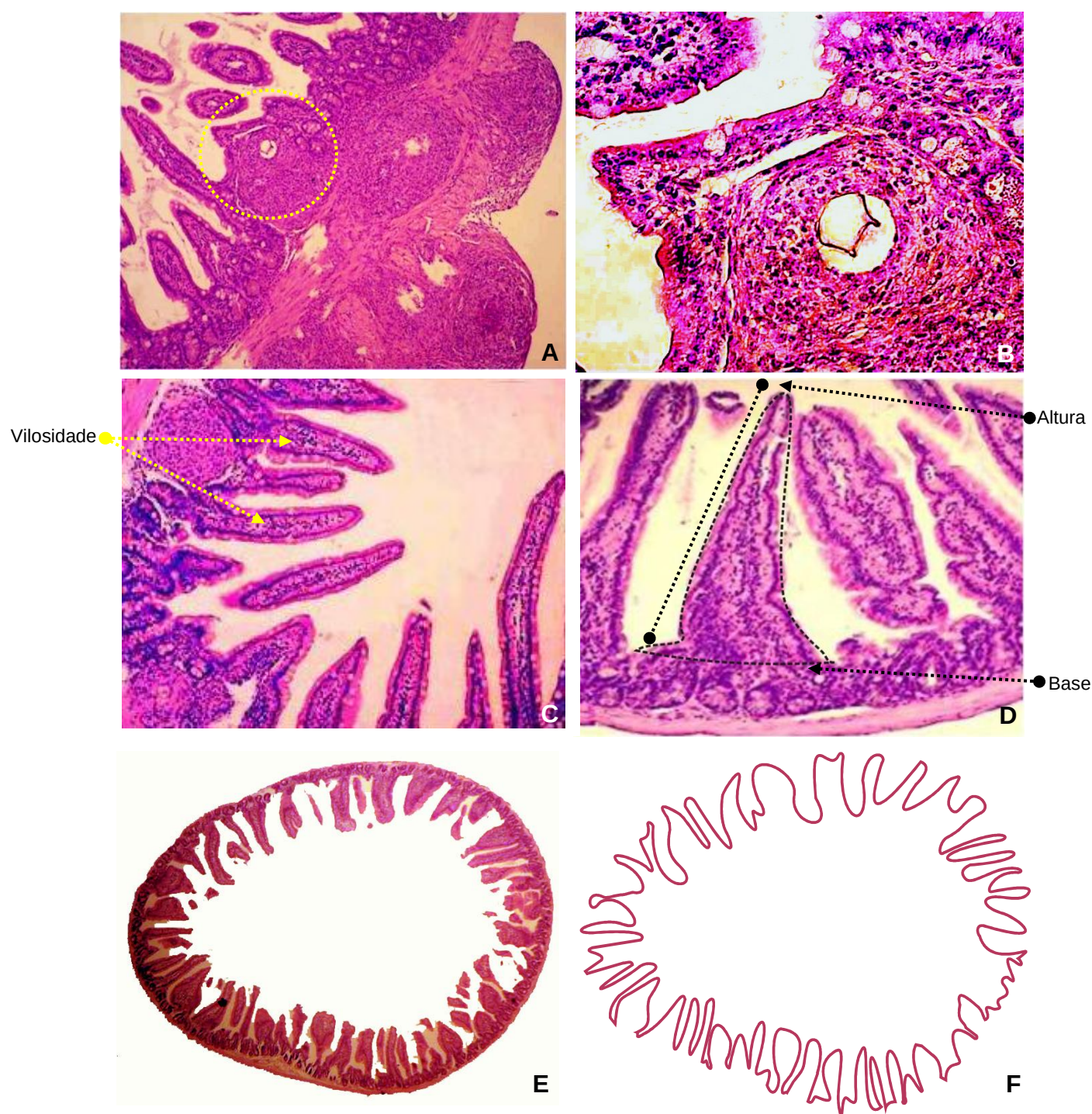


Fig. 2: Análise morfométrica: lâminas histológicas coradas com HE – A, B e C) evidenciam granuloma esquistossomótico deslocando as vilosidades da mucosa intestinal para o componente intraluminal, impedindo sua medição. Em B, o granuloma é observado com mais detalhes (aumento de 400x); D) análise morfométrica da vilosidade intestinal através da medição da altura e área (pixel), aumento em 100x; E e F) medida do perímetro da superfície epitelial da mucosa intestinal em pixel (objetiva panorâmica).

Análise estatística

Utilizou-se o *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS) para o processamento e análise dos dados. Inicialmente, na fase descritiva, após exclusão dos valores extremos, calculou-se a média aritmética e respectivos intervalos de confiança, desvio-padrão, identificando-se os valores mínimo e máximo. Na fase analítica, as médias das variáveis de grupos diferentes foram comparadas pelo teste t de Student para amostras independentes e, no mesmo grupo, pelo teste t de Student para amostras pareadas. A correlação entre variáveis dentro do mesmo grupo foi analisada pelo Tau de Kendall. Em todas as situações, foi considerada uma probabilidade máxima de erro de 5% para rejeição da hipótese nula.

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (CEE-UFPE).

RESULTADOS

A média de peso corporal do grupo controle foi maior em relação ao grupo experimental com significância estatística ($p=0,00062$), estando o segundo com redução do peso em 17,4% (Gráfico 1).

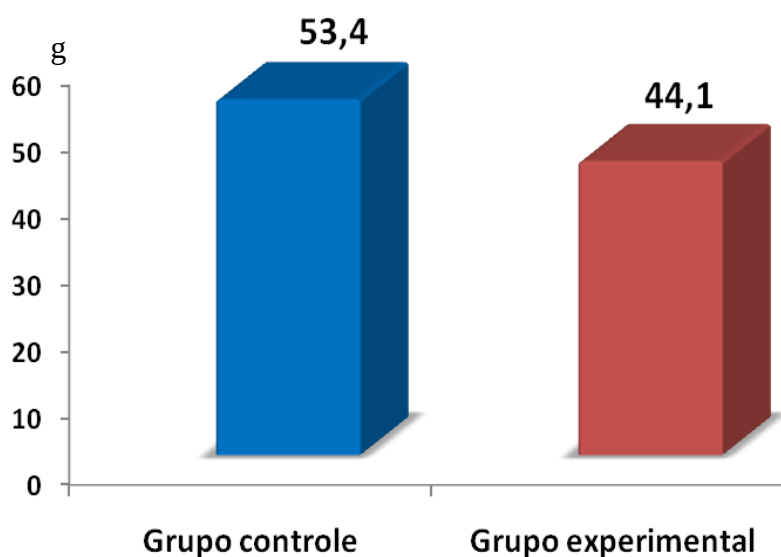


Gráfico 1: Médias do peso corporal em gramas de 46 camundongos divididos em dois grupos
($p=0,00062$)

Nos procedimentos cirúrgicos, foram observados esplenomegalia homogênea e fibrose hepática com circulação colateral na parede do abdome e retroperitoneal, confirmando a forma crônica da doença. No segundo momento da laparotomia para ressecção hepática e de segmento de jejuno, os vermes foram recolhidos do sistema mesentérico, quantificando-se, em média, nove machos e oito casais no grupo experimental (Fig. 3).

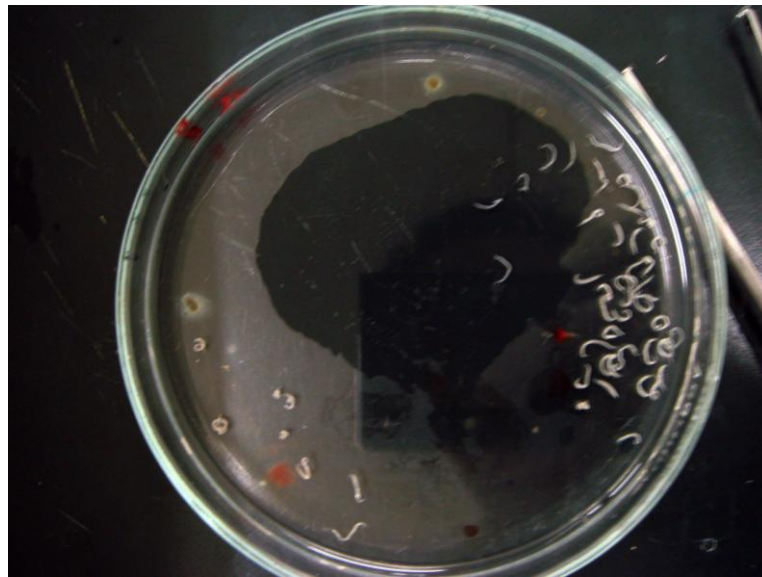


Fig. 3: Placa de Petri acondicionando os vermes recolhidos do sistema mesentérico. Identificados vermes machos e casais

Analizando os valores de determinação da citrulina, observou-se que a média do grupo experimental, antes e após a esplenectomia, foi menor que a do grupo controle com significância estatística ($p=0,000$) (Tabela 1).

Após a esplenectomia, observou-se no grupo experimental diminuição significativa no valor médio da citrulina em relação ao valor médio antes da esplenectomia ($p=0,009$). O mesmo não foi observado com significância no grupo controle (Tabela 2).

A avaliação histológica do jejuno evidenciou ovos de *Schistosoma mansoni* degenerados na serosa, submucosa e lâmina própria, envoltos por granulomas formados por neutrófilos e linfócitos, porém com ausência de deposição colágena na grande maioria (Fig. 4).



Fig. 4: Presença de granuloma na lâmina própria formado por neutrófilos e linfócitos (seta) em sua grande maioria.

Quanto à análise morfométrica do jejuno, observou-se no grupo experimental uma redução estatisticamente significativa da altura e área das vilosidades bem como do perímetro da superfície mucosa ($p=0,003$; $0,000$ e $0,001$, respectivamente) (Tabela 3).

No grupo experimental, observou-se correlação direta entre o valor médio da citrulina e a altura e área das vilosidades com estatística significativa ($p=0,003$ e $0,04$, respectivamente). Entretanto, não foi evidenciado correlação entre a citrulina e o perímetro da superfície da mucosa jejunal ($p>0,05$) (Tabela 4).

TABELA 1

Comparação de médias da citrulina em $\mu\text{mol/mL}$ entre os grupos estudados

Variável	Grupos		Teste t	valor de p
	Experimental	Controle		
Citrulina pré-operatória ($\mu\text{mol/mL}$)	0,060	0,086	-4,292	0,000
Citrulina pós-operatória ($\mu\text{mol/mL}$)	0,048	0,073	-6,37	0,000

TABELA 2

Comparação entre as médias de citrulina pré e pós-operatória em $\mu\text{mol/mL}$ nos grupos estudados.
Influência da esplenectomia sobre os níveis de citrulina

Grupos	Citrulina		Teste t	valor de p
	Pré-operatória ($\mu\text{mol/mL}$)	Pós-operatória ($\mu\text{mol/mL}$)		
Experimental	0,060	0,048	3,057	0,009
Controle	0,086	0,073	1,751	> 0,05

TABELA 3

Comparação de médias da análise morfométrica em pixel da mucosa jejunal entre os grupos estudados

	Grupos		Teste t	Valor de p
	Experimental	Controle		
Altura vilosidade	100.793,900	116.730,000	-3,156	0,003
Área vilosidade	2.708,670	3.640,000	-4,052	0,000
Área total	311.917,000	535.225,000	-3,65	0,001

TABELA 4

Correlação entre citrulina em $\mu\text{mol/mL}$ e dados morfométricos da mucosa jejunal em pixel no grupo experimental

Citrulina	Variáveis	τ	Valor de p
Pós-operatória ($\mu\text{mol/mL}$)	Altura vilosidade	0,532	0,003
	Área vilosidade	0,431	0,04
	Área total	-0,185	>0,05

DISCUSSÃO

A infecção por *Schistosoma mansoni* em animais de laboratório tem sido utilizada como modelo para análise de achados anatomopatológicos e fisiopatológicos em humanos [47]. Tem sido demonstrado que camundongos com esquistossomose evoluem, em até 20%, com a forma grave da doença caracterizada por hipertensão porta e desenvolvimento de varizes esofágicas [48].

Resultados de pesquisas em modelos animais evidenciam que tanto ratos quanto porcos são considerados adequados para o estudo do metabolismo da citrulina no intestino em humanos [28,49].

Além disso, os camundongos são animais de baixo custo e fácil manutenção, o que torna esse modelo experimental ideal para o estudo da esquistossomose e da citrulina.

Crenn et al. [29,39] relataram que os níveis plasmáticos de citrulina apresentam valores normais em pacientes com anorexia nervosa e desnutrição grave, demonstrando que o status nutricional não influencia sobre a determinação da concentração sérica desse aminoácido. Da mesma forma, Jiafeng et al. [21] observaram que a citrulina sérica não se correlaciona com índices nutricionais (IMC, albumina sérica, pré-albumina, transferrina, fibronectina) nem com gasto de energia, pois não está incorporada às proteínas endógenas e não é liberada através de proteólise, como a maioria dos aminoácidos. Assim, apesar, da diferença estatística entre os grupos, o peso corporal não foi um fator determinante sobre a concentração de citrulina no presente estudo, corroborando com os achados da literatura. Foi evidenciado um menor peso corporal no grupo experimental, embora fornecido o

mesmo tipo e quantidade de dieta aos dois grupos. Sabe-se que a esquistossomose mansônica na forma grave leva ao hipodesenvolvimento somático caracterizado, clinicamente, pelo peso deficiente e pela baixa estatura [50].

Os achados macroscópicos do fígado e baço (hepatoesplenomegalia) evidenciados no grupo experimental podem ser justificados pelos aspectos da fase avançada da doença. Essa fase é caracterizada por fibrose hepática generalizada, neoformação e dilatação vascular no tecido fibroso e presença de granulomas com seus constituintes, além de congestão passiva e hiperplasia das células do sistema macrofágico-linfocitário esplênico, típicos da infecção esquistossomótica [51-53].

A concentração plasmática de citrulina provém do metabolismo da glutamina nos enterócitos, principalmente na região apical das vilosidades do jejuno, sendo liberada na circulação porta após a sua síntese [17,19]. Ela também é produzida nos hepatócitos, onde atua como intermediário do ciclo da uréia. Entretanto, toda citrulina que é produzida no fígado é metabolizada, sem a sua liberação na circulação sistêmica [19,27,54]. Diante dessa evidência, a citrulina tem sido utilizada como biomarcador de massa ativa de enterócitos.

Lutgens et al. [41], analisaram a morfometria jejunal em camundongos submetidos a irradiação no intestino delgado e compararam com os valores de citrulina, observando uma correlação direta entre concentração desse aminoácido e altura das vilosidades, bem como perímetro da superfície mucosa, concluindo que a citrulinemia funciona como marcador de lesão da mucosa causada por irradiação.

A esquistossomose, através de análise morfométrica da mucosa intestinal, pode levar a uma diminuição na altura das vilosidades [15,16]. No estudo atual, houve hipotrofia das vilosidades intestinais no grupo experimental. Além disso, houve diminuição na concentração plasmática de citrulina, que apresentou

correlação direta com a altura e área das vilosidades. Dessa forma, corroborando com os achados da literatura, a citrulina está diminuída em doenças que envolvem a mucosa do intestino delgado, possibilitando sua avaliação como marcador da função intestinal global na esquistossomose. Como a sua produção depende da quantidade e funcionalidade dos enterócitos, que está alterada nessa doença, esses resultados dão suporte à hipótese da estreita relação entre citrulina e enterócito.

A imunodeficiência sistêmica ou localizada no trato gastrointestinal tem sido estudada como um dos principais promotores da translocação bacteriana [55], cujo processo é caracterizado pela passagem de bactérias ou endotoxinas do lúmen intestinal para os linfonodos mesentéricos e outros órgãos através da barreira mucosa íntegra [56]. A translocação bacteriana é referida como uma condição predisponente à sepse e falência de múltiplos órgãos e sistemas em pacientes susceptíveis [57,58], sendo geralmente considerada a causa da maioria das complicações infecciosas em pacientes imunodeprimidos, em uso de nutrição parenteral, vítimas de trauma, pacientes com obstrução intestinal ou em pós-operatório como no transplante de intestino [59,60]. Os esquistossomóticos também podem ser incluídos no grupo de pacientes susceptíveis devido a maior predisposição à infecção em relação à população em geral, principalmente quando submetidos à condição de estresse como trauma cirúrgico [61].

A hipertensão porta poderia favorecer a ocorrência de translocação de microorganismos para os linfonodos mesentéricos. A estase do sistema porta na esquistossomose mansônica promove congestão e alterações das vilosidades da mucosa intestinal [13], as quais poderiam aumentar a permeabilidade da barreira mucosa promovendo a translocação bacteriana para os linfonodos.

Ferraz et al. [62], em 2005, determinaram a prevalência de bactérias aeróbicas nos linfonodos mesentéricos de pacientes com esquistossomose na forma hepatoesplênica e possível associação com infecções pós-operatórias, cujos resultados sugeriram que a presença de bactérias aeróbicas nos linfonodos mesentéricos, como consequência de translocação bacteriana, poderiam ter um papel no desenvolvimento de complicações pós-operatórias, particularmente em pacientes esquistossomóticos.

Cucchetti et al [59], em 2009, observaram que havia correlação entre achados histológicos de enxertos intestinais (alterações vasculares na mucosa, isquemia e rejeição) e o isolamento de bactérias entéricas em órgãos extraintestinais, aumentando o índice de complicações infecciosas e mortalidade sobretudo no primeiro mês após o transplante, período em que há importante imunossupressão e descontinuidade da barreira mucosa intestinal. Sabe-se que a citrulina nos primeiros meses após o transplante apresenta baixa concentração plasmática o que poderia contribuir para a deficiência do sistema imunológico.

Durante o processo de translocação, há a interação entre microrganismos e a mucosa através dos seguintes fatores: aderência, entrada e sobrevivência intracelular dos microorganismos [63]. O epitélio do intestino, sobretudo no jejuno, possui resistência à aderência de microrganismos, devido à presença de muco e Imunoglobulina A (IgA). Situações como nutrição parenteral total, íleo parálítico, uso de corticóides e choque hipovolêmico podem levar à degradação da IgA com consequente aumento da aderência bacteriana à mucosa [64]. Esta disfunção gera translocação e resposta inflamatória mediada por citocinas.

Coutinho et al. [65], em 1997, realizaram análise imunocitoquímica de fragmentos do intestino delgado de pacientes com peritonite e encontraram redução

da população de IgA e IgM na lâmina própria. Estas alterações, sobretudo de IgA, predispõem a ocorrência de aderência bacteriana à mucosa, podendo ser a causa da elevada frequência de translocação bacteriana em pacientes com infecção peritonial.

Na esquistossomose, o sistema imune do hospedeiro é exposto a a antígenos derivados do parasito e do ovo, que levam a uma agressão tecidual com conseqüente resposta inflamatória e ativação do sistema imune celular e humoral [66]. Além disso, os ovos liberam antígenos, caracterizando uma reação de hipersensibilidade tipo tardia, mediada por células T CD4 [67]. Essas células podem desencadear uma resposta Th1 ou Th2. As citocinas Th1 induzem a hipersensibilidade tipo tardia e ativam os macrófagos inibindo a produção de arginase e induzindo a produção de óxido nítrico e citrulina [68]. As citocinas Th2 estimulam a produção de anticorpos, particularmente IgE, e aumentam a produção de eosinófilos [69]. Além disso, ativam os macrófagos aumentando a produção de arginase com produção de prolina, que é fundamental para a formação de granulomas e fibrogênese.

Tanto na imunidade humoral como na imunidade celular registram-se alterações na infecção pelo *Schistosoma mansoni*. Tais alterações dependem da carga parasitária, da fase da doença, do tempo de duração da infecção esquistossomótica e das condições do hospedeiro [70]. Dependendo da estimulação antigênica, a resposta imunológica se polariza para um perfil Th1 ou Th2. Assim, a resposta Th1 predomina na fase aguda, enquanto que, com a progressão natural da doença, os antígenos liberados pelos ovos estimulam a produção de citocinas Th2 [67]. Sendo assim, a doença crônica é caracterizada pelo estabelecimento da resposta Th2. A via Th1 constitui resposta normal às infecções bacterianas e virais

conferindo imunidade. Ao contrário, a resposta Th2 associa-se com hipersensibilidade e inibe, por sua vez, a resposta Th1 o que poderia provocar imunodeficiência relativa [70], já que a resposta Th1 está relacionada com a produção de citrulina e óxido nítrico, fundamentais para a manutenção e integridade do sistema imunológico. Assim, os baixos níveis de citrulina encontrados no grupo experimental poderiam ser justificados pela resposta tipo Th2 predominante na fase avançada da doença.

Machado et al. [13] analisaram a morfometria do intestino delgado em pacientes esquistossomóticos antes e após a cirurgia de redução da pressão porta, constatando que a doença leva a alterações estruturais na mucosa intestinal, havendo porém uma tendência à recuperação do padrão mucoso normal após a redução da pressão porta através do tratamento cirúrgico. Essa evidência levou o presente estudo a avaliar a influência da esplenectomia sobre os valores plasmáticos da citrulina devido a sua relação com a morfometria intestinal. Poderia se esperar que a esplenectomia, por diminuir a congestão portal, levasse à melhora do padrão mucoso alterado pela doença, possivelmente favorecendo uma tendência à normalização dos níveis de citrulina no grupo experimental. Entretanto, a queda desse aminoácido após a esplenectomia observada neste grupo demonstra que sua concentração parece ser influenciada por outros fatores como estresse pós-operatório e/ou a imunossupressão presente na doença esquistossomótica.

Dillon et al. [26] evidenciaram que o estresse metabólico pós-operatório pode levar à diminuição nos níveis plasmáticos de citrulina. Sandstrom et al. [31] relataram que situações de sepse ou mesmo pancreatite aguda também estão relacionados com concentrações menores de citrulina seja por diminuição da glutamina ou da atividade da glutaminase.

Em conclusão, os níveis de citrulina estão diminuídos no plasma de camundongos esquistossomóticos ($p=0,000$) e apresentaram correlação direta com as alterações nas vilosidades da mucosa jejunal. Além disso, após a esplenectomia, observou-se diminuição na concentração plasmática de citrulina no grupo experimental ($p=0,009$).

REFERÊNCIAS

1. OMS. Organización Mundial de la Salud. Prevención y controle de la esquistosomiasis y las geohelmintiasis: Informe de un comité de expertos de la OMS; Serie de informes técnicos 912, Ginebra, Suiza; 2005.
2. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Vigilância e controle de moluscos de importância epidemiológica: diretrizes técnicas: Programa de Vigilância e Controle da Esquistossomose (PCE) / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. 2^a. ed. Brasília: Editora do Ministério da Saúde; 2008.
3. Ferreira ILM, Silva TPT. Mortalidade por esquistossomose no Brasil: 1980-2003. Rev Patol Trop 2007;36:67-74.
4. Coura JR, Amaral RS. Epidemiological and control aspects of schistosomiasis in Brazilian endemic areas. Mem Inst Oswaldo Cruz [periódico na Internet]. 2004 Ago [citado 2009 Jan 22]; 99 13-19. Disponível em: <http://scielo.br/scielo>
5. Brandt CT, Leite CRC, Manhães-de-Castro FM, et al. Nitric oxide monocyte production levels in patients with the hepatosplenic form of *Schistosoma masoni* infection who underwent splenectomy, ligation of the left gastric vein and auto implantation of spleen tissue in the major omentum. Acta Cirur Bras 2006;21:285-289.
6. Bina JC, Prata A. Esquistossomose na área hiperendêmica de Taquarendi: Infecção pelo *Schistosoma masoni* e formas graves. Rev Soc Bras Trop 2003;36:211-216.

7. Domingues ALC. Ultrassonografia na Esquistossomose hepatoesplênica: avaliação da intensidade da fibrose periportal e da hipertensão porta. [Tese Doutorado]. Recife: Universidade Federal de Pernambuco;1998.
8. Ferraz AAB, Lopes EPA, Araújo JGC, et al. Varizes de fundo gástrico na hipertensão portal esquistossomótica: Resultados cirúrgicos. Rev Col Bras Cir 2003;30:21-28.
9. El-Rooby A, Gad-el-mawla N, Galil N, et al. Studies on the malabsorption syndorme among egyptians malabsorptions in bilharzial hepatic fibrosis. J Egypt Med Assoc 1963;46:777-782.
10. Enquist IF, Golding MR, Aiello RG, et al. The effect of portal hypertension on intestinal absorpction. Surg Gynecol Obstet 1965;120:87-91.
11. Pucci H, Vilela MP, Miszputen SJ, et al. Estudo da absorção intestinal das gorduras na esquistossomose mansônica humana. Rev Ass Med Brasil 1978;24:341-344.
12. Coutinho EM, Ferreira HS, Assunção ML, et al. The use of protein hydrolysate improves the protein intestinal absorption in undernourished mice infected with *Schistosoma mansoni*. Rev Soc Bras Med Trop 2002;35:585-590.
13. Machado RJC, Amorim AG, Lira V, et al. Análise morfométrica do intestino delgado de esquistossomóticos. An Fac Med Fed Pernamb 1996;41:34-42.
14. Nigro SP, Miszputen SJ, Hayashi H, Saad FA. Estudo morfométrico da mucosa jejunal na esquistossomose mansônica humana. Rev Ass Med Brasil 1984;30:61-63.

15. Penna FJ, Brasileiro Filho G. Lack of correlation between jejunal mucosal morphology and intestinal absorption in the hepatoesplenic form of *Schistosomiasis mansoni*. *Arq Gastroenterol* 1988;25:224-228.
16. Mott CB, Neves DP, Bettarello A. Absorção intestinal na forma hepatoesplênica da esquistossomose mansônica. *Rev Hosp Clin Fac Med São Paulo* 1971;26:55-60.
17. Windmueller H, Spaeth AE. Source and fate of circulating citrulline. *Am J Physiol*. 1981;241:E473-480.
18. Hoogenraad N, Totino N, Elmer H, et al. Inhibition of intestinal citrulline synthesis causes severe growth retardation in rats. *Am J Physiol* 1985;249:G792-799.
19. Wakabayashi Y, Yamada E, Yoshida T, Takahashi H. Arginine becomes an essential amino acid after massive resection of rat small intestine. *J Biol Chem* 1994;269:32667-32671.
20. Dugan ME, Knabe DA, Wu G. The induction of citrulline synthesis from glutamine in enterocytes of weaned pigs is not due primarily to age or change in diet. *J Nutr* 1995;125:2388-2393.
21. Jianfeng G, Weiming Z, Ning L, et al. Serum citrulline is a simple quantitative marker for small intestinal enterocytes mass and absorption function in short bowel patients. *J Surg Res* 2005;127:177-182.
22. Rabier D, Kamoun P. Metabolism of citrulline in man. *Amino Acids* 1995;9:299-316.
23. Yu YM, Burke JF, Tompkins RG, et al. Quantitative aspects of interorgan relationships among arginine and citrulline metabolism. *Am J Physiol* 1996;271:E1098-1109.

24. Wu G, Knabe DA, Flynn NE. Synthesis of citrulline from glutamine in pig enterocytes. *Biochem J* 1994;294:115-121.
25. Wu G. Intestinal mucosal amino acid catabolism. *J Nutr.* 1998;128:1249-1252.
26. Dillon EL, Knabe DA, Wu G. Lactate inhibits citrulline and arginine synthesis from proline in pig enterocytes. *Am J Physiol* 1999;276:G1079-1086.
27. Curis E, Nicolis I, Moinard C, et al. Almost all about citrulline in mammals. *Amino Acids* 2005;29:177-205.
28. Curis E, Crenn P, Cynober L. Citrulline and the gut. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2007;10:620-626.
29. Crenn P, Messing B, Cynober L. Citrulline as a biomarker of intestinal failure due to enterocyte mass reduction. *Clin Nutr* 2008;27:328-339.
30. Luiking YC, Poeze M, Ramsay G, Deutz NE. Reduced citrulline production in sepsis is related to diminished de novo arginine and nitric oxide production. *Am J Clin Nutr* 2009;89:142-152.
31. Sandstrom P, Trulsson L, Gasslander T, et al. Serum amino acid profile in patients with acute pancreatitis. *Amino Acids* 2008;35:225-231.
32. Papas PA, Saudubray JM, Tzakis AG, et al. Serum citrulline and rejection in small bowel transplantation: a preliminary report. *Transplantation.* 2001;72:1212-1216.
33. Pappas PA, Saudubray JM, Tzakis AG, et al. Serum citrulline as a marker of acute cellular rejection for intestinal transplantation. *Transplant Proc* 2002;34:915-917.
34. Pappas PA, Tzakis AG, Gaynor JJ, et al. An analysis of the association between serum citrulline and acute rejection among 26 recipients of intestinal transplant. *Am J Transplant* 2004;4:1124-1132.

35. David AI, Selvaggi G, Ruiz P, et al. Blood citrulline level is an exclusionary marker for significant acute rejection after intestinal transplantation. *Transplantation* 2007;84:1077-1081.
36. David AI, Szutan LA, Gaynor J, et al. Valor crítico da citrulina para as complicações do enxerto no transplante de intestino. *Rev Assoc Med Bras* 2008; 54:426-429.
37. Crenn P, Coudray-Lucas C, Cynober L, Messing B. Post-absorptive plasma citrulline concentration: a marker of intestinal failure in humans. *Transplant Proc* 1998;30:2528.
38. Crenn P, Coudray-Lucas C, Thuillier F, et al. Postabsorptive plasma citrulline concentration is a marker of absorptive enterocyte mass and intestinal failure in humans. *Gastroenterology* 2000;119:1496-1505.
39. Crenn P, Vahedi K, Lavergne-Slove A, et al. Plasma citrulline: A marker of enterocyte mass in villous atrophy-associated small bowel disease. *Gastroenterology* 2003;124:1210-1219.
40. Luo M, Fernández-Estívariz C, Manatunga AK, et al. Are plasma citrulline and glutamine biomarkers of intestinal absorptive function in patients with short bowel syndrome? *J Parenter Enteral Nutr* 2007;31:1-7.
41. Lutgens LC, Deutz NE, Gueulette J, et al. Citrulline: a physiologic marker enabling quantitation and monitoring of epithelial radiation-induced small bowel damage. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2003;57:1067-1074.
42. Lutgens LC, Blijlevens NM, Deutz NE, et al. Monitoring myeloablative therapy-induced small bowel toxicity by serum citrulline concentration: a comparison with sugar permeability tests. *Cancer* 2005;103:191-199.

43. Blijlevens NM, Lutgens LC, Schattenberg AV, Donnelly JP. Citrulline: a potentially simple quantitative marker of intestinal epithelial damage following myeloablative therapy. *Bone Marrow Transplant* 2004;34:193-196.
44. Katz N, Chaves A, Pellegrino J. A simple device for quantitative stool thick-smear technique in *Schistosomiasis mansoni*. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 1972;14:397-400.
45. Duvall RH, DeWitt WB. An improved perfusion technique for recovering adult schistosomes from laboratory animals. *Am J Trop Med Hyg* 1967;16:483-486.
46. Vassef AA. Direct micromethod for colorimetry of serum ornithine carbamoyltransferase activity with use of a linear standard curve. *Clin Chem* 1978;24:101-107.
47. Cheever AW, Lenzi JA, Lenzi HL, Andrade ZA. Experimental models of *Schistosoma mansoni* infection. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2002;97:917-940.
48. Assef JC, Vieira ACPO, Saito HCGS, et al. Modelo experimental de formação de varizes esofágicas por hipertensão portal esquistossomótica em hamsters. *Rev Col Bras Cir* 2005;32:209-213. .
49. Osowska S, Duchemann T, Walrand S, et al. Citrulline modulates muscle protein metabolism in old malnourished rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2006;291:E582-586.
50. Mesquita GV, Brandt CT, Santos SM, Maricevich JPBR. Avaliação de pacientes esquistossomóticos quanto ao conteúdo mineral ósseo, nível de magnésio corporal total e atividade da enzima lecitina: colesterol acetiltransferase em pós-esplenectomizados com auto-implante esplênico. *Rev Bras Ortop* 2004;39:49-58.
51. Bogliolo L. The anatomic picture of the liver in hepatoesplenic schistosomiasis *mansoni*. *Ann Trop Med Parasit* 1957;51:1-14.

52. Magalhães Filho A, Coutinho-Abath E. Splenic reactions in Swiss albino mice to single and multiple infections with *Schistosoma mansoni*. *Am J Trop Med Hyg* 1961;10:356-364.
53. Coutinho EM, Barros AF, Barbosa A Jr, et al. Host nutritional status as a contributory factor to the remodeling of schistosomal hepatic fibrosis. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2003;98:919-925.
54. Cynober LA. Plasma amino acid levels with a note on membrane transport: characteristics, regulation and metabolic significance. *Nutrition* 2002;18:761-766.
55. Cicalese L, Sileri P, Green M, et al. Bacterial translocation in clinical intestinal transplantation. *Transplantation* 2001;71:1414-1417.
56. Mainous MR, Tso P, Berg RD, Deitch EA. Studies of the route, magnitude and time course of bacterial translocation in a model of systemic inflammation. *Arch Surg* 1991;126:33-37.
57. Spath G, Hirner A. Microbial translocation and impairment of mucosal immunity induced by an elemental diet in rats is prevented by selective decontamination of the digestive tract. *Eur J Surg* 1998;164:223-228.
58. Dervenis C, Smailis D, Hatzitheoklitos E. Bacterial translocation and its prevention in acute pancreatitis. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2003;10:415-418.
59. Cucchetti A, Siniscalchi A, Bagni A, et al. Bacterial translocation in adult small bowel transplantation. *Transpl Proc* 2009;41:1325-1330.
60. Sileri P, Rastellini C, Dicuonzo G, et al. Transplantation of the intestines and bacterial translocation. *G Chir* 2000;21:196-204.
61. Ferraz EM, Bacelar TS, Ferraz AAB, et al. Infecção de ferida pós-esplenectomia com ou sem esquistossomose hepatoesplênica. *Rev Col Bras Cir* 1991;18:75-79.

62. Ferraz AAB, Campos JM, Araújo Júnior JG, et al. Gut bacterial translocation and postoperative infections: A prospective study in schistosomotic patients. *Surg Infect* 2005;6:197-201.
63. Wells CL, van de Westerlo EM, Jechorek RP, Erlandsen SL. Intracellular survival of enteric bacteria in cultured human enterocytes. *Shock* 1996;6:27-34.
64. Diebel LN, Liberati DM, Diglio CA, et al. Synergistic effects of *Candida* and *Escherichia coli* on gut barrier function. *J Trauma* 1999;47:1045-1051.
65. Coutinho HB, Robalinho TI, Coutinho VB, et al. Intra-abdominal sepsis: an immunocytochemical study of the small intestine mucosa. *J Clin Pathol* 1997;50:294-298.
66. Stadecker MJ, Asahi H, Finger E, et al. The immunobiology of Th1 polarization in high-pathology schistosomiasis. *Immunol Rev* 2004;201:168-179.
67. Pearce EJ, MacDonald AS. The immunobiology of schistosomiasis. *Nat Rev Immunol* 2002;2:499-511.
68. Modolell M, Corraliza IM, Link F, et al. Reciprocal regulation of the nitric oxide synthase/arginase balance in mouse bone marrow-derived macrophages by TH1 and TH2 cytokines. *Eur J Immunol* 1995; 25:1101-1104.
69. Abath FG, Morais CN, Montenegro CE, et al. Immunopathogenic mechanisms in schistosomiasis: what can be learnt from human studies? *Trends Parasitol* 2006;22:85-91.
70. Serufo JC, Lambertucci JR. Schistosomiasis and viral hepatitis: a review. *Rev Soc Bras Med Trop* 1997;30:313-322.



Apêndice

Apêndice A - ESTATÍSTICA DESCRITIVA DA PESQUISA

Variável	Número		Valores		Média
	total	avaliado	mínimo	máximo	
EXPERIMENTAL					
Citrulina pré-operatória (μmol/mL)	23	19	0,039	0,090	0,060
Citrulina pós-operatória (μmol/mL)	23	18	0,040	0,058	0,048
Altura vilosidade (Pixel)	23	21	87.838,000	116.826,000	100.793,900
Area vilosidade (Pixel)	23	16	2.184,000	2.954,000	2.708,670
Area total (Pixel)	23	20	204.676,000	758.910,000	311.917,000
CONTROLE					
Citrulina pré-operatória (μmol/mL)	23	21	0,052	0,132	0,086
Citrulina pós-operatória (μmol/mL)	23	17	0,041	0,100	0,073
Altura vilosidade (Pixel)	23	20	84.948,000	160.930,000	116.730,000
Area vilosidade (Pixel)	23	21	2.307,000	5.484,000	3.640,000
Area total (Pixel)	23	16	214.396,000	839.217,000	535.225,000



Anexos



Anexo I: Declaração do Comitê de Ética em Pesquisa com Animais

Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências Biológicas

Av. Prof. Nelson Chaves, s/n
50670-420 / Recife - PE - Brasil
fones: (55 81) 2126 8840 | 2126 8351
fax: (55 81) 2126 8350
www.ccb.ufpe.br



Recife, 29 de outubro de 2008

Ofício nº 82/08

Da Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) da UFPE
Para: **Prof. Álvaro Antônio Bandeira Ferraz**
Departamento de Fisiologia e Farmacologia – CCB
Universidade Federal de Pernambuco
Processo nº 23076. 012970 / 2008 - 35

Os membros da Comissão de Ética em Experimentação Animal do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (CEEA-UFPE) avaliaram seu projeto de pesquisa intitulado ***"Avaliação dos níveis de Citrulina plasmática em camundongos albinos swiss portadores de esquistossomose mansoni"***.

Concluimos que os procedimentos descritos para a utilização experimental dos animais encontram-se de acordo com as normas sugeridas pelo Colégio Brasileiro para Experimentação Animal e com as normas internacionais estabelecidas pelo National Institute of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals as quais são adotadas como critérios de avaliação e julgamento pela CEEA-UFPE.

Encontra-se de acordo com as normas vigentes no Brasil, especialmente a Lei 9.605 – art. 32 e Decreto 3.179-art 17, de 21/09/1999, que trata da questão do uso de animais para fins científicos.

Diante do exposto, emitimos **parecer favorável** aos protocolos experimentais realizados.

Atenciosamente,


Prof. Maria Teresa Jansen
Presidente do CEEA

Observação:
Origem dos animais: Biotério do Lika; Camundongos; Swiss;
Sexo: Fêmeas; Idade: 45 dias; Número de animais previsto no
protocolo: 60 animais.

CCB: Integrar para desenvolver

Anexo II: Normas da Revista Colombiana de Cirurgia

Indicaciones a los autores

La *Revista Colombiana de Cirugía* es el órgano oficial de la Asociación Colombiana de Cirugía. Publica colaboraciones originales sobre temas de cirugía general y de interés para toda la profesión médica, incluso los de carácter humanístico, socioeconómico y los referentes a la educación médica.

2. Los trabajos deben ser inéditos y suministrados exclusivamente a la *Revista Colombiana de Cirugía*; impresos y en texto electrónico (correo electrónico, CD o disquete).

Deben ajustarse a las reglas gramaticales y a los términos técnicos y científicos correctos. Se recomienda a los autores someter sus escritos a un corrector de estilo profesional antes de enviarlos para publicación en la Revista.

3. Cada trabajo debe estar acompañado de una carta del autor principal en la que se exprese que ha sido aprobado por todos los coautores. Si ha sido publicado previamente en forma parcial, la carta debe incluir los permisos respectivos para reproducir figuras, tablas, etc., tomadas de ésta y de otras fuentes. El autor debe conservar copia del material enviado, por cuanto la Revista podrá devolver o no el material que haya recibido.

- Todos los trabajos deben venir acompañados del documento de definición de autoría, conflicto de interés y transferencia de copyright.

- Debe hacerse explícito dentro del texto del artículo, la aprobación por parte del comité de ética en caso de trabajos que involucren pacientes.

4. Los trabajos deben ser elaborados según las normas del *International Committee of Medical Journal Editors* definidas

en: "Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals"

(www.icmje.org). Las abreviaturas de los nombres de las revistas deben aparecer de acuerdo con las del *Cumulated Index Medicus*.

5. La Revista publicará excepcionalmente

"presentación de casos", sólo cuando se trate de algo raro y de gran interés, siempre y cuando esté acompañada de una extensa revisión bibliográfica.

6. Los trabajos deben ser divididos en secciones así:

- Todo el manuscrito debe estar escrito en letra Arial 12 a doble espacio y sin justificar.

Recomendamos usar de preferencia los programas MS Word o Word Perfect.

Todas las hojas deben venir numeradas en el extremo superior derecho.

- Página de presentación: título breve y conciso; nombre completo y apellido/s del autor y los coautores, seguidos del cargo en la institución donde se realizó el trabajo (sin utilizar iniciales del segundo apellido, ni abreviaturas del nombre de la institución), ciudad y país. En la parte inferior de la página el nombre, dirección postal y electrónica, teléfono y fax del autor o coautor a quien debe ser dirigida la correspondencia.

- Resumen: de 200 palabras. No se deben usar abreviaturas ni referencias. Para los trabajos originales el resumen debe ser estructurado con las siguientes secciones: introducción, materiales y métodos, resultados y conclusiones. Además, se deben incluir entre tres y seis palabras claves. Éstas pueden ser consultadas en la dirección www.bireme.br bajo el título TERMINOLOGÍA DeCS-MeSH.

- El texto, dividido en las siguientes secciones: Introducción; Materiales y métodos; Resultados; Discusión; Conclusiones;

Abstract (la Revista se reserva el derecho de modificar el resumen en inglés elaborado por el autor);

Referencias bibliográficas.

- Las tablas, cuadros y figuras deben aparecer en hojas separadas, cada uno con su correspondiente título breve, en formato digital,

en diapositiva de 35 mm o impresas. el autor debe conservar copias. Cuando se desee imprimir figuras en color, el costo correspondiente corre por cuenta del autor.

- Las Referencias bibliográficas se enumeran según el orden de aparición en el texto y con el número entre paréntesis.

Cuando se trate de artículos de revisión, también se acepta, en vez del número, colocar entre paréntesis el apellido del autor y el año; en tal caso, la lista de referencias, al final del texto, debe aparecer en orden alfabético.

- La lista de referencias, al final del texto debe aparecer así:

* Artículos en revistas en inglés o en otros idiomas diferentes del español, según este ejemplo: Turner RR, Giuliano AE, Hoon DSB, *et al.* Pathologic examination of sentinel lymph node for breast carcinoma.

World J Surg 2001;25:798-805.

- * Artículos en español, según este ejemplo:

Domínguez AM, Vanegas S, Camacho F y col. Programa de seguimiento de la infección quirúrgica y el sitio operatorio.

Fundación Santa Fe de Bogotá, 1989-1999. Rev Colomb Cir 2001;16:44-57.

* Capítulos de libros; según este ejemplo: Kurzer A, Agudelo G: Trauma de cabeza y cuello, facial y de tejidos blandos. En: Olarte F, Aristizábal H, Restrepo J (eds.). Cirugía. Medellín. Universidad de Antioquia, 1983, pp. 311-328.

7. Una proporción importante de las referencias bibliográficas debe corresponder a autores colombianos y latinoamericanos, para lo cual se deben consultar las correspondientes bases de datos: SIBRA/ Colombia de FEPAFEM para la literatura colombiana y LILACS de BIREME para La literatura latinoamericana y del Caribe. La no inclusión de autores colombianos y latinoamericanos es motivo de rechazo del artículo por el Comité Editorial de la *Revista*

8. Se reciben editoriales, sobre temas de actualidad o a manera de comentario pertinente a artículos de especial relevancia.

9. Se reciben Cartas al Editor, en forma de comentarios cortos según algún trabajo publicado anteriormente o sobre temas de interés actual.

10. La *Revista Colombiana de Cirugía* no asume responsabilidad por las ideas expuestas por los autores, quienes son los responsables de las mismas.

11. Toda colaboración será enviada a miembros del Comité Editorial o a consultores, que actúan como árbitros para expedir concepto sobre la calidad del trabajo y observaciones o recomendaciones.

Anexo III: Normas da Revista Surgical Infections

Surgical Infections

ISSN: 1096-2964 • Bimonthly • Online ISSN: 1557-8674

INSTRUCTIONS FOR AUTHORS

Surgical Infections will accept original manuscripts which contain material that has not been reported elsewhere, except in the form of an abstract of not more than 400 words. Prior abstract presentations should be described in a footnote to the title. Submissions should be accompanied by a letter requesting evaluation for publication. The editor and publisher are committed to a rapid review process and timely publication.

Manuscripts must be submitted online using the following url:

<http://mc.manuscriptcentral.com/surgicalinfections>

Please read all the instructions to authors before submitting.

Manuscript Submission and Copyright Agreement Form

The Copyright Agreement form (available from web site at http://www.liebertpub.com/media/content/transfer_of_copyright.pdf) should be submitted once your paper has been accepted for publication. Manuscripts cannot be published without this form. The corresponding author is responsible for obtaining signatures of coauthors. Authors not permitted to release copyright must still return the form signed under the statement of the reason for not releasing the copyright. Upon acceptance of your paper, please fax the Copyright Agreement form to 914-740-2108.

Preparation of Manuscript

Manuscripts should be doubled spaced throughout. Please submit text of manuscripts in Microsoft Word.

Be prepared to submit:

- The manuscript title
- All author(s) names, valid email address and affiliations, source of a work or study (if any)
- a running title.
- Corresponding author information, including name, address, phone and fax numbers, and email address
- a structured abstract, which should be self-explanatory without reference to the text. The structured abstract should consist of Background, Methods, Results, and Conclusions.
- At the end of the paper, give the name and address of the individual to whom reprint requests should be directed.

Tables and Illustrations

Prepare each table with its title as a separate file. Use Arabic numerals to number tables. Each table must stand alone -i.e., contain all necessary information in the caption, and the table itself must be understood independently of the text. Details of experimental conditions should be included in the table footnotes. Information that appears in the text should not be repeated in a table, and tables should not contain data that can be given in the text in one or two sentences.

Color photographs that significantly enhance the presentation will be considered for publication.

Please follow these guidelines for submitting all figures:

- Line illustrations should be submitted at 1200 DPI.
- Halftones and color should be submitted at a minimum of 300 DPI.
- Save as either TIFF or EPS files.
- Color art must be saved as CYMK—not RGB.
- Do NOT submit PowerPoint or Excel files.

References

References should be presented in the Vancouver style:

Journal papers: Ko ST, Airan MC. Technique and early experience of laparoscopic cholecystectomy and cholangiogram. *Surg Endosc* 1990;4:58-59.

Books: Cuschieri A, Bouchier IAD. The biliary tract. In: Cuschieri A, Giles GR, and Moossa AR, eds. *Essential Surgical Practice*. London: Wright Publishers, 1988: 1051-1056.

When a citation has more than four authors, list the first three and use "et al." If it is necessary to cite an abstract, this should be designated. Abbreviations of journal titles should follow MEDLINE. Authors are responsible for the accuracy of the reference, and are reminded that inaccurate references are highly frustrating to the reader, the cited author, and indexing services. Within the text, citations should be identified by numbers in brackets, and the list of references at the end of the paper should be numbered by order of citation. Ensure that issue numbers are omitted from the reference citation. Only works referred to in the text and already accepted for publication can be included.

Disclosure Statement

Immediately following the *Acknowledgments* section, include a section entitled "Author Disclosure Statement."

In this portion of the paper, authors must disclose any commercial associations that might create a conflict of interest in connection with submitted manuscripts. This statement should include appropriate information for EACH author, thereby representing that competing financial interests of all authors have been appropriately disclosed according to the policy of the Journal. It is important that all conflicts of interest, whether they are actual or potential, be disclosed. This information will remain confidential while the paper is being reviewed and will not influence the editorial decision.

IMPORTANT:

Please upload individual files of all manuscript material — do NOT upload a single PDF file containing all text, figure, and table files of your paper. Once all individual files are uploaded on to Manuscript Central, the system will automatically create a single PDF proof for you and the peer-review process.

Please see the Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals at <http://www.icmje.org/index.html#conflicts> for further guidance.

If no conflicts exist, the authors must state "No competing financial interests exist."

Permissions

The author must obtain permission to reproduce figures, tables and text from previously published material. Written permission must be obtained from the original copyright holder (generally the publisher, not the author or editor) of the journal or book concerned. An appropriate credit line should be included in the figure or legend or table footnote, and full publication information should be included in the reference list. Written permission must be obtained from the author of any unpublished material and should accompany the manuscript.

Reprints

Reprints may be ordered by using the order form that will accompany the proofs. ordered after the issue is printed will be charged at a substantially higher rate.

Publisher

Surgical Infections is published by Mary Ann Liebert, Inc., Publishers, 140 Huguenot Street, 3rd Floor, New Rochelle, NY 10801-5215. Telephone: (914) 740-2100; fax: (914) 740-2108.; Email: info@liebertpub.com; www.liebertpub.com