

Efeitos da nutrição parenteral total associada à infecção bacteriana na função hepatobiliar de ratos da cepa Wistar

Amando A. Motta¹, Themis R. da Silveira², Paulo R.A. Carvalho², José C. Fraga³, Juarez Cunha⁴, Débora Martinho¹, Cláudia Martins⁵, Ursula Matte¹, Gledson Gastaldo⁵, Jorge Bajerski⁵, Thadeu Czerski⁶, Roberto Malmann³, Susana Barcellos⁵

OBJETIVO: Avaliar as alterações hepáticas associadas à nutrição parenteral em ratos.

MATERIAIS E MÉTODOS: Foram avaliados quatro grupos com 10 ratos cada: grupo I - controles alimentados, via oral, com dieta habitual; grupo II - em dieta habitual e infectados com Escherichia Coli inoculada por via intra peritoneal; grupo III - em nutrição parenteral; e grupo IV - em nutrição parenteral e infectados. Foram analisadas as concentrações séricas de AST, ALT, GGT e 5'N no primeiro dia do experimento e no oitavo dia da nutrição parenteral, por ocasião do sacrifício dos animais. O estudo histológico do fígado dos 40 ratos consistiu na avaliação de degeneração hidrópica, dilatação da veia centro-lobular, colestase, dilatação sinusoidal, proliferação de células de Kupffer, necrose celular e esteatose. As alterações foram graduadas de 0 a 4+.

RESULTADOS: Os exames laboratoriais não foram consistentemente alterados ao final do experimento. No grupo IV houve redução na concentração de GGT; além disso, este foi o grupo que apresentou as maiores variações de AST e ALT, possivelmente devido à maior agressão do parênquima hepático. Do ponto de vista histológico, todos os animais submetidos à nutrição parenteral (com apenas uma exceção) apresentaram dilatação da veia centro-lobular e dos sinusóides. Estes achados foram mais comuns nos animais infectados. Não foram observadas esteatose e/ou colestase.

CONCLUSÕES: 1) O modelo proposto de inoculação intra-peritoneal com Escherichia Coli foi adequado para estudar infecção em ratos jovens da cepa Wistar; 2) os resultados obtidos indicaram que a associação entre nutrição parenteral e infecção determinou alterações histológicas inespecíficas, porém mais intensas do que as alterações determinadas em cada uma dessas situações isoladamente.

Unitermos: Alterações hepáticas; infecção; nutrição parenteral.

¹ Biotério do Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

² Departamento de Pediatria, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Correspondência: Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Rua Ramiro Barcelos 2350, CEP 90035-003, Porto Alegre, RS, Brasil.

³ Departamento de Cirurgia, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

⁴ Unidade de Tratamento Intensivo, Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

⁵ Serviço de Patologia Clínica, Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

⁶ Serviço de Anatomia Patológica, Hospital de Clínicas de Porto Alegre; Departamento de Patologia, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

The effects of total parenteral nutrition associated to bacterial infection on the hepatobiliary function of Wistar rats

OBJECTIVE: To evaluate the hepatic alterations associated to parenteral nutrition in rats.

MATERIAL AND METHODS: Four groups with 10 rats each: Group I (control group) - rats were orally fed with a regular diet; Group II - rats received a regular diet, and were infected with Escherichia coli through intraperitoneal inoculation; Group III - rats received parenteral nutrition; and group IV, rats received parenteral nutrition, and were infected with Escherichia coli. Serum concentrations of AST, ALT, GGT, and 5' N were measured on the first day of the experiment, and on the eighth day of parenteral nutrition (the day animals were sacrificed). Histological study of the liver of the rats included: evaluation of hydropic degeneration, dilation of the central lobular vein, cholestasis, sinusoidal dilation, proliferation of Kupffer cells, cellular necrosis, and steatosis. All alterations were graded from 0 to 4+.

RESULTS: The lab exams did not present consistent alterations at the end of the experiment. Group IV presented a reduction in GGT concentration; in addition, this group presented the largest variations in AST and ALT concentration, possibly as a result of being submitted to more intense aggression to the hepatic parenchyma. From a histological point-of-view, all animals (with the exception of one) presented dilation of the central lobular vein and of the sinusoids. Such findings were more frequent among infected animals. The animals did not present steatosis or cholestasis.

CONCLUSIONS: 1) The proposed model of intraperitoneal inoculation of Escherichia coli was appropriate for the study of bacterial infection in young rats of the Wistar strain; 2) our results indicate that the association of parenteral nutrition and infection determined histologic alterations which were unspecific, but more intense than the alterations determined by each of these situations in isolation.

Key-words: Hepatic alterations; infection; parenteral nutrition.

Revista HCPA 1998;18 (3): 241-9

Introdução

Um dos mais expressivos avanços da Medicina na segunda metade deste século foi a possibilidade de prover todos os nutrientes necessários para a sobrevivência do indivíduo, e mesmo para o seu crescimento, por via intravenosa. Estudos recentes (1, 2), realizados com pacientes pediátricos, têm demonstrado a alta prevalência de desnutrição proteico-calórica durante as hospitalizações, tornando importante a adoção de medidas, às vezes agressivas, para a recuperação nutricional. Assim, o uso da nutrição parenteral (NP) passou a ser uma prática corrente nos hospitais, particularmente quando a alimentação pelo tubo digestivo torna-se inviável.

Porém, a NP não é um procedimento isento de riscos. As complicações associadas à nutrição parenteral total (NPT) podem ser classificadas em dois grandes grupos: as relacionadas ao acesso vascular e as metabólicas (1). Entre estas últimas, as alterações hepatobiliares constituem um grupo considerável. O espectro clínico-laboratorial dessas perturbações é bastante amplo e inclui desde provas funcionais hepáticas alteradas como única manifestação até comprometimento hepático mais evidente, como esteatose, necrose, colestase, cirrose e, até mesmo, carcinoma hepatocelular (3). As frequências com que as diferentes alterações irão ocorrer dependerá, basicamente, das condições do hospedeiro, das características das soluções administradas e da presença ou não

de processos infecciosos associados (2).

Entre outros fatores envolvidos na etiopatogenia das complicações hepato-biliares merecem menção especial: a imaturidade hepática, o tempo prolongado de jejum, as doses elevadas de carboidratos e de aminoácidos, o metabolismo de gorduras e a presença de infecção.

A relação entre infecção e icterícia colestatia é conhecida há muito tempo, sobretudo em recém-nascidos prematuros e lactentes (4,5), mas a fisiopatogenia deste processo não está bem esclarecida (6,7). A eventual importância da infecção bacteriana no desencadeamento das alterações hepatobiliares pode ser avaliada pelos resultados obtidos com o uso de antimicrobianos. Tanto em pacientes adultos quanto em recém-nascidos submetidos a NPT, houve prevenção do aumento das enzimas hepáticas com o uso desses medicamentos (8,9).

O objetivo geral do presente estudo foi analisar os efeitos da NPT associada a infecção bacteriana nas alterações hepatobiliares de ratos da cepa Wistar. Os objetivos específicos foram: a) avaliar a prevalência e o tipo das alterações da função hepatobiliar e das alterações histológicas do fígado de ratos submetidos a NP; b) analisar os efeitos da infecção por *Escherichia Coli* sobre a função hepatobiliar e as alterações histológicas hepáticas; e c) comparar as alterações funcionais hepáticas e histológicas em ratos submetidos a NPT com e sem infecção.

Materiais e métodos

Os testes de função hepática foram realizados sempre em duplicata e em 2 ocasiões:

no primeiro dia, com os ratos já anestesiados, era colhido sangue do plexo retro-orbital; o mesmo era feito no oitavo dia, logo após o sacrifício do animal. A avaliação da função hepática (ALT,AST,GGT e 5'N) foi feita no setor de bioquímica do Serviço de Patologia do HCPA.

O período de acompanhamento dos animais foi de 160 a 180 horas de NP, após o que os animais eram sacrificados por inalação de éter sulfúrico. O fígado era então retirado para exame anátomo-patológico. Na análise histológica foram avaliadas a presença e as características das seguintes alterações: esteatose, degeneração hidrópica, necrose hepato-celular, inflamação porta, dilatação da veia centro lobular, dilatação dos sinusóides, congestão vascular, colestase e proliferação das células de Kupffer. As colorações utilizadas foram hematoxilina-eosina, tricrômico de Masson, reticulina e picro-Sirius. O estudo histopatológico foi realizado no Serviço de Anatomia Patológica do HCPA.

Para o estudo estatístico, foi feita análise descritiva da amostra com os resultados expressos em médias e desvios-padrão. Os resultados dos testes bioquímicos de função hepática foram submetidos à análise de variância para dados não paramétricos (Kruskal-Wallis) e a delineamento fatorial. Os dados obtidos da avaliação histopatológica foram estudados através de contrastes ortogonais múltiplos não-paramétricos. Um valor de $P < 0.05$ (bicaudal) foi considerado significativo (12).

Resultados

O peso corporal dos quatro grupos de ratos no primeiro dia de observação e no oitavo dia

Tabela1. Composição da dieta administrada aos animais por via oral

Componentes da dieta	g/100 g
Caseína	28,70
Gordura (óleo de soja)	15,00
Carboidrato (amido de milho)	50,15
Sais	4,00
Vitaminas	1,00
Fibras	1,00

Tabela 2. Componentes principais (para 1000 ml) da solução de nutrição parenteral preparada para fornecer 1ml =1kcal

Solução glicose 50%	340 ml	176 g
Solução glicose 10%	60 ml	
Solução lipídios 10%	300 ml	30 g
Solução aminoácidos 10%	300 ml	30 g
Sódio	40 mEq	
Potássio	42 mEq	
Cálcio	20 mEq	
Magnésio	16 mEq	
Cloro	30 mEq	
Fósforo	12 mEq	
Acetato	40 mEq	

foram, respectivamente, os seguintes (média e desvio-padrão): grupo I: 132,0g +/- 12,8g e 146,4g +/- 14,7g ; grupo II: 127,8g +/- 18,7g e 133,9g +/- 15,8g; grupo III: 139,7g +/- 8,9g e 149,3g +/- 10,7g; grupo IV: 136,6g +/- 11,3g e 116,8g +/- 13,5g. Houve aumento de peso do primeiro para o oitavo dia nos grupos I, II e III, tendo havido diminuição ponderal no grupo IV. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os quatro grupos no primeiro nem no último dia de observação. Comparando-se os pesos dos animais no primeiro dia em relação àquele do oitavo dia também não houve diferença estatisticamente significativa, tendo havido apenas uma tendência à diminuição do peso dos ratos submetidos a NPT associada à infecção (Grupo IV).

A distribuição dos resultados das provas funcionais hepáticas está apresentada na tabela 3. Os resultados verificados na primeira coleta (antes de qualquer intervenção) estiveram sempre dentro dos valores obtidos no estudo piloto (valores referidos em Materiais e métodos). Comparando os valores observados nas duas coletas (primeiro e oitavo dias) no grupo I, verifica-se redução dos níveis de GGT e aumento dos valores referentes aos testes AST, ALT e 5'N no oitavo dia de observação. Nos ratos do grupo II (alimentados por via oral e infectados) observou-se diminuição de 5'N e aumento nos níveis de AST, ALT e GGT no oitavo dia. Os animais pertencentes ao grupo III (submetidos à

NPT e sem infecção) apresentaram valores aumentados das provas funcionais hepáticas no 8º dia. Nos ratos do grupo IV (infectados e submetidos à NPT) foram observados, no oitavo dia, aumento de AST, ALT e 5'N, assim como diminuição de GGT.

Em relação a cada um dos testes realizados, pudemos constatar: 1) os valores de AST aumentaram no oitavo dia nos 4 grupos; quando em presença de NPT sem infecção os valores foram maiores. 2) Os valores de ALT foram mais elevados no oitavo dia e, particularmente no grupo que foi alimentado através de NPT, a diferença de valores observada na associação NPT + infecção tende a significância estatística; 3) as concentrações de GGT diminuíram em presença de infecção ($P < 0,02$), de NPT sem infecção ($P < 0,01$) e da associação dos dois elementos, sem haver interação entre esses dois fatores; d) no que se refere à 5'N, os valores foram mais elevados nos grupos I, III e IV no oitavo dia, e reduzidos no grupo II. Não houve diferença estatisticamente significativa.

A avaliação macroscópica revelou fígados de aspecto congestivo, particularmente nos ratos dos grupos submetidos à NP. Na análise histológica não houve diferença estatisticamente significativa quanto à presença de esteatose entre os grupos. Não foram observadas colestase, necrose hepatocelular e/ou degeneração hidrópica em qualquer caso. Foi

Tabela 3. Resultados dos testes bioquímicos nos quatro grupos de animais (média +/- desvio padrão)

Grupo ^a		AST ^b	ALT	GamaGT	5'N
I	1	48,7 +/- 11,8	42,0 +/- 6,1	18,3 +/- 15,4	19,4 +/- 5,8
	8	55,5 +/- 10,6	62,6 +/- 15,6	14,1 +/- 3,6	33,0 +/- 20,2
II	1	54,8 +/- 13,0	45,4 +/- 8,3	6,4 +/- 5,4	63,4 +/- 38,2
	8	160,0 +/- 61,1	55,7 +/- 15,3	9,6 +/- 4,9	34,7 +/- 27,0
III	1	71,7 +/- 25,4	39,4 +/- 15,2	3,0 +/- 1,1	24,4 +/- 19,3
	8	184,0 +/- 30,2	88,7 +/- 10,4	7,4 +/- 3,7	29,0 +/- 29,1
IV	1	50,2 +/- 15,2	31,6 +/- 9,4	5,1 +/- 4,9	12,8 +/- 7,0
	8	83,6 +/- 60,9	70,2 +/- 16,6	4,3 +/- 2,3	17,0 +/- 7,3

^a1 = Coleta inicial; 8 = coleta no oitavo dia.

^bAsteriscos indicam resultados fora dos valores da média e 2 desvios-padrão.

constatada uma maior proliferação de células de Kupffer nos grupos II e IV nos ratos com infecção em dieta oral e em NP ($P < 0,05$). Todos os animais em NPT apresentaram algum grau de congestão vascular (dilatação da veia centrolobular e dos sinusóides), com uma única exceção no grupo III. Os resultados do estudo histológico estão apresentados na tabela 4.

Discussão

A disfunção hepática associada à NP é a mais freqüente alteração metabólica. Embora as primeiras descrições tenham sido feitas na década de 1970 (13,14), até hoje a fisiopatologia dessa situação permanece incerta (7). São reconhecidos como importantes fatores de risco para a alteração hepática diferentes constituintes das soluções, produtos originados de fotooxidação da solução administrada e, em recém nascidos, a imaturidade anátomo-funcional do fígado (2). Estudo prospectivo realizado por nós, em crianças hospitalizadas no HCPA e submetidas à NP, demonstrou que a presença de infecção foi o fator mais importante para o aparecimento de colestase (15).

A infecção bacteriana e as alterações metabólicas que determina permanecem como causa freqüente de morbidade e mortalidade elevadas em pacientes hospitalizados. Podem ser considerados de alto risco os indivíduos com

comprometimento importante do estado geral, desnutridos e com alterações imunológicas, como costumam ser, precisamente, os pacientes que necessitam de NP. Estudos das relações entre a NP e as infecções, que obedecem a delineamentos prospectivos com o necessário rigor científico, planejados para análise de amostras controladas e aleatórias, só podem ser realizados através de procedimentos experimentais. Nas duas últimas décadas foram desenvolvidos diversos modelos de NP para animais de pequeno porte (16), especialmente ratos (11,16,17,18,19). As vantagens do uso de ratos em experimentação são bem conhecidas: baixo custo de manutenção, fácil reprodução, ciclo de vida relativamente curto, espaço reduzido para confinamento e grande resistência a infecções (11).

Por outro lado, há vários modelos para estudar a infecção bacteriana sistêmica em animais de experimentação (11,16,18,19). Entre esses métodos temos: a ligadura do apêndice cecal com cerclagem, a ligadura e punção do ceco, a inoculação intra-peritoneal com material fecal e a administração de cápsulas contendo material infectante. Todos esses modelos, porém, têm em comum o inconveniente de utilizar microorganismos não padronizados. No nosso estudo, para evitar essa inadequação, preferimos inocular um tipo único de bactéria e uma cepa padronizada de *Escherichia Coli*, através de

injeção intra-peritoneal. O ajuste da dose do inóculo para uma concentração de 3×10^{-7} células/ml foi definido pela comprovação de bacteremia através de hemoculturas positivas. Concentrações bacterianas superiores à adotada resultaram em mortalidade exageradamente elevada, e inóculos bacterianos menos concentrados não se traduziram por hemoculturas positivas de maneira sistemática. Em relação a esse aspecto, podemos concluir, pelo presente estudo, que para ratos jovens da cepa Wistar, com peso corporal variando de 100 a 140 g, a concentração e o tipo de bactéria escolhidos não foram letais e produziram comprovadamente infecção.

A canulação venosa indicada para a NP, que ao mesmo tempo não limitasse a livre movimentação dos animais e permitisse um bom fluxo da solução sem a torção do cateter, foi difícil de instituir. Os dispositivos idealizados para este fim, conhecidos como *swivel-joint* são de difícil execução e de alto custo de importação (11). Depois de várias tentativas infrutíferas, realizamos uma modificação no modelo intermediário de sistema de infusão intravenosa idealizado na Universidade de São Paulo por Yamaguchi e colaboradores (20), e que se mostrou bastante útil (21). Não houve vazamento ao longo de qualquer das conexões do sistema de infusão e os ratos puderam se movimentar livremente. A técnica empregada foi efetiva e segura para manter a NP em animais jovens, com peso corporal médio de 120 g, durante os sete dias do experimento.

A avaliação laboratorial (ALT, AST, GGT, 5'N) feita no início do experimento apresentou resultados dentro do esperado. No entanto, os resultados obtidos no 8º dia não são uniformes e são difíceis de interpretar. O grupo de animais com dieta habitual e infectados (Grupo II) mostrou elevação dos valores de AST, ALT e GGT, tendo a 5'N apresentado redução. Já os animais com NP e não infectados (grupo III) apresentaram, por ocasião do sacrifício, aumento nas concentrações das 4 provas analisadas. Nos ratos infectados e submetidos a NP (grupo IV), houve redução de GGT e elevação de ALT, AST e 5'N. Observa-se que houve maiores alterações de AST e ALT naqueles infectados e submetidos a NP, possivelmente devido a maior agressão do parênquima hepático. Comparando os resultados dos grupos de animais III e IV (ambos submetidos a NP), observa-se redução das concentrações enzimáticas naqueles inoculados com *Escherichia Coli*, sem alcançar significância estatística. Em conclusão, não houve consistência nas alterações dos exames realizados para avaliar a função hepatobiliar. Os autores que empregaram métodos mais sensíveis de avaliação funcional hepática, como quantificação e identificação dos diferentes ácidos biliares, observaram modificações hepatobiliares importantes em ratos nos quais a NP teve duração aproximada de 10 dias (22, 23).

Em relação às alterações histológicas hepáticas, notou-se ausência das mesmas, como era de esperar, no grupo controle. Os achados histopatológicos mais importantes

Tabela 4. Distribuição dos resultados dos exames histopatológicos^a

Alteração Histológica	Grupo I	Grupo II	Grupo III	Grupo IV
Degeneração hidrópica	0	0	0	0
Inflamação porta	0	0	0	0
Dilatação veia central	0	1	2	2
Dilatação sinusoidal	0	1	2	1
Colestase	0	0	0	0
Proliferação de células de Kupffer	0	1	0	3
Necrose celular	0	0	0	0
Esteatose	0	0	1	1

^a Escore das alterações: 0 = nenhuma; 1 = leve; 2 = moderada; 3 = intensa.

foram dilatação da veia central, dilatação dos sinusóides e proliferação das células de Kupffer. Nos grupos submetidos a NP, as alterações foram mais evidentes, tendo havido intensa proliferação de células de Kupffer nos espaços porta do grupo IV. Não foram observadas necrose hepatocelular, colestase e nem degeneração hidrópica dos hepatócitos. Esteatose, de pequena intensidade, só foi observada em animais submetidos a NP. Convém lembrar que a deposição hepatocitária de gorduras, em ratos, ocorre com vários outros tipos de dietas, por exemplo, aquelas com restrição em substâncias lipotróficas, como colina, e de aminoácidos, como metionina. Assim, Lopes et al. (17), estudando ratos com NP total sem lipídios, observaram presença de esteatose, com acúmulo de gordura neutra (triglicerídios) em quantidade apreciável.

A associação freqüente de NP com uma incidência aumentada de infecção está fortemente relacionada à presença de translocação bacteriana. Esta pode ser definida como a passagem de microorganismos (ou de seus produtos), do intestino para os órgãos sistêmicos. Acredita-se que um dos mais importantes elementos para a sua instalação é a atrofia intestinal, geralmente por desuso, que se estabelece em animais submetidos à NP. Para contornar esse problema, vários tipos de suplementos à NP foram estudados. Gianotti et al. (24) recentemente analisaram a importância de glutamina oral para diminuir a translocação bacteriana na sepse experimental. Aqueles autores, utilizando modelo de trauma térmico, puderam comprovar que as formulações enriquecidas com glutamina exerceram papel significativo na proteção da barreira intestinal com taxas menores de translocação bacteriana. Em 1989, Burke et al. (25), estudando ratos submetidos a NP sem trauma, observaram que os animais foram protegidos de translocação pela administração endovenosa de glutamina. O mecanismo de proteção, segundo os autores, seria o aumento na secreção de imuno-globulina A, reduzindo a aderência das bactérias entéricas ao epitélio intestinal. Mas nem todos encontram efeito protetor para a glutamina (26). Recentemente, Khan et al. (27) estudaram, através de análise morfológica e funcional, o intestino de ratos com NP suplementada com

alanil-glutamina. Os autores atribuíram o efeito benéfico da suplementação à maior espessura da mucosa intestinal e à presença de muco ao longo do intestino. Iba et al. (28) analisaram o efeito de triglicerídios de cadeia média (TCM) em ratos com NP, inoculados com endotoxinas, e observaram redução da mortalidade naqueles suplementados com TCM, atribuindo o fato, pelo menos em parte, à prevenção da atrofia intestinal.

Comparando os nossos resultados com os de outros autores que utilizaram técnicas mais ou menos semelhantes, observamos que Shu et al. (18), estudando dois grupos de animais (um com infecção peritoneal e outro submetido a NP total), verificaram alterações histológicas hepáticas nos dois grupos, mas de natureza diferente. O estudo realizado com microscopia óptica mostrou degeneração na zona lobular externa e necrose na zona intermediária nos ratos com infecção. No grupo dos ratos com NP, as principais alterações foram, como no presente estudo, dilatação sinusoidal e proliferação de células de Kupffer. Quando o material foi examinado à microscopia eletrônica nos ratos infectados, foram evidenciadas dilatação dos canalículos biliares e alteração dos microvilos e das mitocôndrias. No grupo de animais em NPT, as alterações foram mais intensas, com cilindros biliares e dilatação do retículo endoplasmático. Os autores concluem que as alterações coleásticas associadas à NPT não devem ser apenas consequência da infecção.

Em conclusão, no presente estudo foi possível demonstrar que 1) o modelo experimental de NP utilizado foi adequado; 2) a inoculação de bactérias foi efetiva na concentração usada; 3) houve alteração nas provas funcionais hepatobiliares nos animais infectados e submetidos à NP; 4) as alterações histopatológicas foram mais intensas, à microscopia óptica, naqueles animais submetidos à NP e, particularmente, nos inoculados com *Escherichia Coli*.

Agradecimentos. Os autores agradecem aos farmacêuticos Renato Chagas Ribeiro e Jaqueline Kouht Martimbianco, da Central de Nutrição Parenteral e Quimioterapia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, pelo preparo das soluções.

Referências

1. Carvalho PR. Fatores de risco da colestase associada a nutrição parenteral em crianças com idade superior a um mês [dissertação de Mestrado]. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 1993.
2. Balistreri WF, Bucuvalas JC, Farrell MK, Bove KE. Total parenteral nutrition-associated cholestasis factors responsible for the decreasing incidence. In: Lentze M, Reichen J, editors. Paediatric Cholestasis - Novel Approaches to Treatment. Dordrecht: Kluwer; 1992. p. 191-204.
3. Vileisis RA, Sorensen K, Gonzalez-Crussi F, Hunt CE. Liver malignancy after parenteral nutrition. *J Pediatrics* 1982;100:88-90.
4. Rooney JC, Hill DJ, Danks DM. Jaundice associated with bacterial infection on the newborn. *Am J Dis Child* 1971;122:39-41.
5. Silveira-Montenegro TR, Pereira Lima JE. Icterícia por infecção urinária. *J Pediatria* 1977;43:227-30.
6. Utili R, Abernathy CO, Zimmerman HJ. Cholestasis effects of *Escherichia Coli* endotoxin on the isolated perfused rat liver. *Gastroenterology* 1976;70:248-53.
7. Bailly F, Cotte L, Trépo C. Hépatites bactériennes. *Encyclopédie médico-chirurgicale*. Paris: Elsevier; 1999.
8. Capron JP, Gineston JL, Herve MA, Braillon A. Metronidazole in prevention of cholestasis associated with totalparenteral nutrition. *Lancet* 1983;1:446-7.
9. Kubota A, Okada A, Nezu R, Kamata S, Imura K, Takagi Y. Hyperbilirubinemia in neonates associated with total parenteral nutrition. *J Parent Ent Nutr* 1988;12:602-6.
10. Perry MLS, Gamalho JLS, Bernard EA. Effect of protein malnutrition on glycoprotein synthesis in rat cerebral cortex slices during the period of brain growth spurt. *J Nutr* 1986;116:2486-9.
11. Lima-Gonçalves E, Yamaguchi N, Waitzberg DL, Mello Filho GB. Nutrição parenteral em ratos. Aspectos técnicos. *Acta Cir Bras* 1990;5(1):17-22.
12. Zar J. Biostatistical analysis. 2nd ed. Englewood: Cliffs, NJ: Prentice-Hall; 1984.
13. Peden VH, Witzleben CL, Skelton MA. Total parenteral nutrition. *J Pediatr* 1971;78:180-1.
14. Manginello FP, Javitt NB. Parenteral nutrition and neonatal cholestasis. *J Pediatr* 1979;94:296-8.
15. Silveira TR, Carvalho PA. Total parenteral nutrition-associated cholestasis: infection as the principal risk factor in infants beyond the first month of life. In: Pregnancy, sex hormones and the liver. Reyes HB, Leuschner U, Arias IM, editors. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers; 1996.
16. Hata S, Kamato S, Nezu R. A newborn rabbit model for total parenteral nutrition. Effects of nutritional components on cholestasis. *J Parent Ent Nutr* 1989;13:265-71.
17. Lopes AC, Zeballos R, Villela MP, Gebara M, Sustovich DR. Esteatose hepática produzida pela nutrição parenteral total. Estudo experimental em ratos. *Acta Cir Bras* 1989;4:10-3.
18. Shu Z, Li J, Zhou Z, Shi Q, Zhang T. Histopathologic study of cholestasis induced by totalparenteral nutrition on intraperitoneal sepsis in rats. *J Parent Ent Nutr* 1991;15:630-6.
19. Rivera A, Bhatia J, Rassin DK. "In vivo" biliary function in the adult rat: the effect of parenteral glucose and aminoacids. *J Parent Ent Nutr* 1989;13:240-5.
20. Yamaguchi N, Waitzberg DL, Lima-Gonçalves E. Intermediário de livre movimentação para esquema de nutrição parenteral em ratos. *Acta Cir Bras* 1989;4(3):122-4.
21. Cunha J, Motta AA, Fraga JC, Carvalho PA, Silveira TR. Modificação em intermediário de livre movimentação para nutrição parenteral em ratos. Tema livre apresentado na 12ª Semana Científica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Porto Alegre; 1992.
22. Lirussi IF, Vaja S, Murphy GM, Dowling RH. Cholestasis of total parenteral nutrition: bile acid and bile lipid metabolism in parenterally nourished rats. *Gastroenterology* 1989;96:493-502.
23. Bhatia J, Moslen MT, Haque AK, McCleery R, Rassin DK. Total parenteral nutrition-associated alterations in hepatobiliary function and histology in rats: is light exposure a clue? *Pediatr Res* 1993;33:487-92.
24. Gianotti L, Alexander JW, Gennari R, Pyles T, Babcock GF. Oral glutamine decreases bacterial translocation and improves survival in experimental gut-origin sepsis. *J Parenter Enteral Nutr* 1995;19:69-74.
25. Burke DJ, Alverdy JC, Aoy E. Glutamine-supplemented total parenteral nutrition improves gut immune function. *Arch Surg* 1989;124:1369-79.
26. Barber AE, Jones WG, Minei JP. Glutamine or fiber supplementation of a defined formula diet; impact on bacterial translocation, tissue composition and response to endotoxin. *J Parenter Enteral Nutr*

- 1990;14:335-43.
27. Khan J, Liboshi Y, Cui L, Wasa M, Saudo K, Takagi Y, Okada A. Alanyl-glutamine supplemented parenteral nutrition increases luminal mucus gel and decreases permeability in the rat small intestine. *J Parenter Enteral Nutr* 1999;23:24-31.
28. Iba T, Yagi Y, Kidokoro A, Ohno Y, Kaneshiro Y, Akiiiyama T. Total parenteral nutrition supplemented with medium-chain triacylglycerols prevents atrophy of the intestinal mucosa in septic rats. *Nutrition* 1998;14:667-71.