

(11) Número de Publicação: **PT 1940439 E**

(51) Classificação Internacional:

A61K 38/05 (2007.10) **A61K 9/06** (2007.10)

A61L 27/54 (2007.10) **A61L 31/16** (2007.10)

A61M 31/00 (2007.10)

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(22) Data de pedido: **2006.08.11**

(30) Prioridade(s): **2005.08.11 US 707173 P**

(43) Data de publicação do pedido: **2008.07.09**

(45) Data e BPI da concessão: **2010.10.27**
242/2010

(73) Titular(es):

**UNIVERSITY OF SASKATCHEWAN
INDUSTRY LIAISON OFFICE BOX 5000, RPO
UNIVERSITY 110 GYMNASIUM PLACE
SASKATOON, SASKATCHEWAN S7N 4J8 CA**

(72) Inventor(es):

ADEBOLA O. E. OBAYAN CA

(74) Mandatário:

**ANTÓNIO JOÃO COIMBRA DA CUNHA FERREIRA
RUA DAS FLORES, Nº 74, 4º AND 1249-235 LISBOA PT**

(54) Epígrafe: **REDUÇÃO DA FORMAÇÃO DE ADERÊNCIAS PÓS-OPERATÓRIAS COM
GLUTAMINA INTRAPERITONEAL**

(57) Resumo:

A ADMINISTRAÇÃO INTRAPERITONEAL DE GLUTAMINA REDUZ A FORMAÇÃO DE ADERÊNCIAS PÓS-OPERATÓRIAS.

RESUMO

"Redução da formação de aderências pós-operatórias com glutamina intraperitoneal"

A administração intraperitoneal de glutamina reduz a formação de aderências pós-operatórias.

DESCRIÇÃO

"Redução da formação de aderências pós-operatórias com glutamina intraperitoneal"

Antecedentes do invento

Aderências são depósitos anormais de tecido fibroso que se formam na cavidade peritoneal. As aderências anormais são uma causa comum de obstrução do intestino delgado e de infertilidade feminina [1-3]. A formação de aderências ocorre após qualquer procedimento cirúrgico. No entanto, é extremamente vulgar após operações abdominais e pélvicas e continua a ser uma fonte de morbidade considerável. A incidência varia de cerca de 67%-93% após operações cirúrgicas abdominais gerais a cerca de 97% após procedimentos ginecológicos pélvicos abertos [4, 5]. Em estudos clínicos e autópsicos de pacientes submetidos previamente a laparotomia, a incidência de aderências intra abdominais foi cerca de 70%-90% [6]. A utilização de malhas de ácido poliglicólico absorvível e de malhas de polipropileno não absorvível como materiais de reforço, em cirurgia, está associada a uma elevada incidência de formação de aderências [6a, 6b].

Os factores associados à formação de aderências pós-cirúrgicas incluem trauma, lesão térmica, infecção, isquémia e corpos estranhos. Outros factores associados à formação de aderências incluem suturação apertada onde a tensão no peritoneu suturado produz isquémia e abrasão. A exposição a corpos estranhos tais como talco e pó de luvas, fiapo de envoltórios abdominais ou de artigos em papéis descartáveis podem também contribuir para a formação de aderências [7-9]. A neutropenia está associada a taxas de aderência inferiores e pode desempenhar um papel na modulação de aderência pós-operatória [10].

O peritoneu é composto por duas lâminas mesoteliais que envolvem predominantemente adipócitos incorporados em tecido conjuntivo frouxo, e também agregados de células fagocíticas mononucleares. O omento maior é a parte maior do peritoneu com um tamanho que varia de 300 gm a 2000 gm e uma área de

superfície de 300 cm² a 1500 cm². O omento possui um rico suprimento vascular com numerosas convoluções capilares características que são denominadas glomérulos omentais devido à sua semelhança como glomérulos renais. Estas camadas capilares ficam directamente sob o mesotélio [H]. As aderências formam-se como resultado de reparação fibrosa de lesões peritoneais maioritariamente após cirurgia. Desenvolvem-se manchas leitosas como estruturas específicas no omento maior do peritoneu entre a 20^a e a 35^a semana de gestação [12]. Estas são corpúsculos encontrados nos glomérulos omentais que medem 0,1-2 mm de tamanho, dificilmente visíveis à vista desarmada, e com pequena ampliação parecem tufos de lã de algodão [13, 14]. As manchas leitosas caracterizam-se por um padrão permanente glomeruloso de estrutura vascular, por uma população celular específica e por um revestimento mesotelial especializado. Nos seres humanos, as manchas leitosas compreendem macrófagos (70%), linfócitos B (10%), linfócitos T (10%), mastócitos, e células estromais. O número médio de células numa mancha leitosa é aproximadamente 600 [15]. O número de manchas leitosas é superior na infância e diminui gradualmente com a idade [12]. A activação de manchas leitosas, que ocorre num período de 6 horas após a cirurgia abdominal desempenha um papel na formação de aderências [16].

Os macrófagos no omento maturado são essencialmente depuradores. Parecem diferenciar-se a partir de precursores monocíticos nas manchas leitosas e não dependem dos precursores que derivam da medula óssea [17]. São dendríticos na forma e possuem marcadas capacidades fagocíticas. Eles efectuam avidamente a fagocitose de bactérias e de partículas de carbono injectadas por via intraperitoneal. Quando activados, os precursores de macrofagos nas manchas leitosas proliferam, migram para a superfície mesotelial, e transformam-se em macrofagos de forma dendrítica. Após a cirurgia, os macrófagos aumentam em número e alteram a função que são diferentes dos macrófagos residentes e segregam várias substâncias incluindo cicloxygenase e metabolitos de lipoxigena, activador de plasminogéneo, inibidor de activador de plasminogéneo (PAI), etc. [9, 18]. Esses macrófagos recrutam novas células mesoteliais que proliferam formando ilhas nas áreas lesadas resultando em re-mesotelialização

peritoneal. Após o estímulo das manchas leitosas existe uma maior permeabilidade microvascular ao fluido, neutrófilos, monócitos e deposita-se fibrina na matriz do tecido conjuntivo das manchas leitosas, e subsequente maior migração celular através do revestimento mesotelial para a cavidade peritoneal [19].

A formação de aderências começa com ferimentos infrigidos no peritoneu quer por um estímulo lesivo incluindo bacteriano, toxicidade química, isquémia, mecânico ou simplesmente secagem por exposição [16, 25]. A lesão conduz a uma resposta inflamatória, que progride para deposição de fibrina e subsequente aderência fibrinosa. Se a aderência fibrinosa não for degradada nos primeiros dias da lesão, as células reparadoras incluindo fibroblastos propagam-se para a matriz de fibrina tornando-a uma aderência fibrosa permanente. Este processo fica concluído no prazo de uma semana após a lesão. O balanço entre a deposição e a destruição de fibrina é, neste modo, crucial na fase inicial da reparação peritoneal e formação de aderências [25-27]. Os macrófagos peritoneais podem estar envolvidos na regulação da actividade da plasmina na cavidade peritoneal [28], e portanto num papel na formação de aderências [29].

Foram utilizados vários métodos de prevenção e tratamento de aderências, incluindo a prevenção de deposição de fibrina no exudado peritoneal, redução de inflamação no tecido local, e remoção de depósitos de fibrina. A maioria dos métodos existentes inibem uma destas categorias e possuem ainda sucesso limitado. Foram também utilizados implantes na forma de tecidos ou membranas reabsorvíveis (que se pensa actuarem como barreiras de macrófagos) assim com géis formados por materiais biocompatíveis para reduzir a formação de aderências. São exemplos os produtos comercializados sob as marcas registadas INTERCEED e SEPRAFILM.

A Glutamina é um aminoácido essencial condicional que o corpo não consegue sintetizar em quantidade suficiente em determinadas circunstâncias fisiológicas [30, 31] tais como cirurgias maiores, choque, lesões traumáticas e sepsia grave. Uma diminuição na glutamina extra-celular compromete a função dos macrófagos e de outras células imunológicas, resultando

numa maior degradação de proteínas do músculo esquelético [20]. Os macrófagos são células extremamente activas (10 vezes por minuto com base no retorno de ATP e 5 vezes por minuto com base no consumo de oxigénio) com uma elevada capacidade de captar glutamina e “prendê-la” na forma de glutamato, que actua como reserva intracelular para a formação de energia e para a provisão de precursores de biossíntese. Os macrófagos peritoneais de ratinhos mostraram utilizar uma elevada quantidade de glutamina via processo de glutaminólise embora sejam encarados como células diferenciadas terminais [21, 22]. Esses macrófagos são caracterizados por elevada taxa de secreção de proteínas e de reciclagem de membranas [23, 24]. Embora a glutamina constitua >50% da reserva de aminoácido não ligado no músculo esquelético humano, verificou-se uma rápida redução na glutamina do sangue e de tecidos na sequência de eventos catabólicos tais como cirurgias maiores [32], traumatismos [33], e sepsia [34, 35].

A Glutamina é segura, bem absorvida, e não possui efeitos secundários documentados. Sabe-se que a glutamina potencia a cicatrização de ferimentos. A glutamina e os seus dipéptidos foram utilizados para componentes de suplementação parentérica e entérica em pacientes em estado crítico de doença. Um estudo recente de Fukuzawa, et al. [36], concluiu que a glutamina potencia a fagocitose e a produção de Intermediários Reactivos de Oxigénio (IRO) através de neutrófilos em pacientes em pós-operatório. Num estudo prospectivo aleatório, Morlion et al usando dipéptidos de glutamina em nutrição parentérica total (NPT) concluíram que o grupo com suplemento teve menor permanência hospitalar, melhor estado imunológico e balanço de azoto após a cirurgia abdominal [37].

A alanil-glutamina e a glicil-glutamina são dois dipéptidos de glutamina que foram utilizados clinicamente devido à sua maior solubilidade e estabilidade química em relação à glutamina livre, o que os torna fontes mais estáveis dos aminoácidos constituintes [37-42]. A suplementação entérica com alanil-glutamina, mas não com mistura de glutamina + alanina, promove a adaptação intestinal conforme é evidenciado pelo maior transporte de

péptidos após a ressecção intestinal [43]. A alanil-glutamina também previne os danos intestinais, conforme foi demonstrado pela maior expressão do transporte de péptidos e uma elevada concentração de glutamina no plasma após a administração de CPM [44]. Recentemente, utilizou-se, pela primeira vez, entericamente, alanil-glutamina isolada com divulgado sucesso e segurança [53].

Resumo do invento

Verificámos que a administração intraperitoneal de uma fonte de glutamina reduzirá a formação de aderências pós operatórias. Isto é surpreendente pois a glutamina é um "combustível" directo para os macrófagos. Tendo em conta o suposto papel dos macrofagos derivados de manchas leitosas activadas na reparação peritoneal e formação de aderências, pode-se esperar que a glutamina possa exacerbar a formação de aderências. Embora não desejemos estar presos a uma linha particular de raciocínio no que diz respeito a um mecanismo próprio pertencente a este invento, acreditamos que a administração intraperitoneal de glutamina potencia a reparação peritoneal sem a ajuda de macrofagos derivados de manchas leitosas activadas.

A alanil-glutamina e a L-glutamina são eficazes na redução e/ou prevenção de aderências pós-operatórias (incluindo aderências secundárias) quando administradas intra-peritonealmente. Este efeito não é evitado pela presença de sangue intraperitoneal, tipo de sutura, ou grau de inflamação. Presentemente, parece que o efeito da alanil-glutamina é mais pronunciado do que o da L-glutamina na prevenção de aderências.

As terapias anteriores envolvendo a administração de glutamina utilizaram administração entérica (e.g. num suplemento alimentar) ou administração parentérica através de via intravenosa (e.g. administração de formulações de nutrição parentérica total). Como resultado deste invento, agora saber-se-á ser vantajosa a utilização de administração intraperitoneal de uma fonte de glutamina para pacientes que são submetidos ou foram submetidos a um procedimento cirúrgico que afecta o peritoneu. Para além disso, este

invento pode ser facilitado através da utilização de formulações que actuem como fonte de glutamina e contenham espessantes de modo a ter uma viscosidade maior do que as formulações que são adequadas para injecção intravenosa. Isto facilitará a colocação orientada da formulação na cavidade peritoneal e a aderência a áreas seleccionadas. Essas formulações espessas devem ser estéreis e de qualquer outro modo adequadas para administração intra-peritoneal e portanto são diferentes das formulações com glutamina previamente utilizadas para alimentação entérica.

A fonte de glutamina pode ser administrada directamente ao peritoneu ou na cavidade peritoneal e pode também ser aplicada a implantes e/ou dispositivos médicos que são colocados no peritoneu. Exemplos de esses implantes ou dispositivos médicos incluem material reabsorvível tecido ou malha e outras barreiras ou protecções usadas ou propostas correntemente para utilização como meios para reduzir aderências cirúrgicas. Uma formulação particularmente preferida para utilizar neste invento é um gel ou uma malha contendo uma fase aquosa na qual esteja dissolvida uma fonte de glutamina.

Num primeiro aspecto, este invento proporciona uma fonte de glutamina para utilizar na redução de formação de aderências pós-operatórias.

Num outro aspecto, este invento proporciona a utilização de uma fonte de glutamina no fabrico de um medicamento para administração intraperitoneal para reduzir a formação de aderências pós-operatórias.

Num outro aspecto, este invento proporciona uma composição para administração intraperitoneal compreendendo um transportador farmaceuticamente aceitável e pelo menos uma fonte de glutamina.

A composição pode ser colocada ou impregnada num material cirúrgico ou num dispositivo médico implantável. A composição pode estar presente num dispositivo de entrega adequado para a entrega intraperitoneal da composição durante a cirurgia.

Várias concretizações deste invento proporcionam uma composição estéril para utilizar na redução de aderências pós-operatórias compreendendo uma fonte de glutamina e um transportador farmaceuticamente aceitável adequado para administração intra-peritoneal. A composição pode compreender um ou mais diluentes e excipientes farmaceutica/fisiologicamente aceitáveis, incluindo agentes espessantes ou outros agentes potenciadores de viscosidade. De preferência, um agente potenciador de viscosidade formará um gel quando hidratado. Essas composições podem compreender simplesmente uma fonte de glutamina solúvel em água e um agente formador de gel adequado na forma seca. A última formulação pode também ser proporcionada numa forma parcialmente hidratada ou totalmente hidratada.

Este invento proporciona também um dispositivo adequado para efectuar a administração intra-peritoneal de uma formulação contendo glutamina. O dispositivo pode ser adaptado a administração intra-peritoneal da formulação numa variedade de formas conhecidas, incluindo injecção ou outro processo de extrusão, gotejamento ou pulverização e pode tomar a forma de uma seringa, embalagem de fole, embalagem compressível, aparelhos de pulverização operados por pressão e outros similares.

Descrição detalhada do invento

Neste fascículo, a expressão "fonte de glutamina" inclui L-glutamina e os seus sais fisiologicamente aceitáveis, assim como péptidos que contenham L-glutamina. Embora a L-glutamina possa ser utilizada neste invento, este aminoácido possui uma solubilidade em água relativamente baixa (36 g/l a 20°C) e tende a quebrar durante a esterilização e armazenagem prolongadas. Os oligopéptidos que compreendem L-glutamina que são capazes de ser metabolizados para proporcionarem L-glutamina podem também ser utilizados neste invento. De preferência, esses péptidos exibirão maior solubilidade em água em relação à da L-glutamina. Frequentemente, esses péptidos exibirão também maior resistência à quebra durante a esterilização e armazenagem. Dois desses péptidos que podem ser utilizados neste invento são dipéptidos que compreendem L-glutamina e L-alanina ou glicina. O dipéptido alanil-

glutamina (resíduo de glutamina na posição C terminal) possui elevada solubilidade em água (568 g/l). A Glicil-glutamina (glutamina na posição C terminal) mostra também maior solubilidade em água quando comparada a glutamina (154 g/l). Cada um dos últimos dipéptidos é suficientemente estável durante esterilização por calor e armazenagem prolongada de modo que foram anteriormente utilizados em formulações de nutrição parentérica total para injeção intravenosa.

As preparações farmaceuticamente aceitáveis de L-glutamina e péptidos contendo L-glutamina (incluindo alanil-glutamina) encontram-se disponíveis comercialmente. Em adição, os péptidos que contêm L-glutamina para utilização neste invento podem também ser sintetizados em conformidade com a metodologia conhecida e purificados e esterilizados para utilização farmacêutica.

As composições deste invento podem estar na forma seca, parcialmente hidratada, ou totalmente hidratada e incluirão uma fonte de glutamina mais um componente transportador ou diluente farmaceuticamente aceitável tal como água destilada estéril, soluções isotónicas estéreis, soluções salinas fisiológicas estéreis ou tampões secos e/ou misturas ou concentrações salinas que quando diluídas formam uma dessas soluções. A quantidade de fonte de glutamina na composição será seleccionada para proporcionar um aminoácido ou péptido totalmente solubilizado durante a administração. Ainda, a quantidade de L-glutamina disponível a partir da composição quando formulada para administração e/ou a quantidade total de formulação administrada será seleccionada pelo fornecedor médico especialista para proporcionar uma dose adequada de L-glutamina ao paciente.

Com base em estudos prévios envolvendo administração intravenosa de L-glutamina e de seus dipéptidos, uma dose intraperitoneal pode proporcionar de cerca de 0,01 g a cerca de 1,0 g de L-glutamina por quilograma de paciente, por dia. No entanto, podem ser seleccionadas doses que caiam fora destas quantidades superiores e inferiores. Doses típicas utilizando alanil-glutamina podem encontrar-se no intervalo de cerca de 0,1 g a cerca de 0,5 g de dipéptidos/kg/dia.

Aquando da administração de uma fonte de glutamina durante um procedimento cirúrgico, a dose típica para um paciente humano adulto médio pode proporcionar de cerca de 0,3 g a cerca de 2,0 g ou cerca de 0,3 g a cerca de 1,5 g de L-glutamina ou de alanil-glutamina na cavidade peritoneal.

A administração em conformidade com este invento pode envolver a entrega de uma fonte de glutamina à cavidade peritoneal durante a cirurgia, no final da cirurgia antes do fecho ou logo após o fecho. Este invento contempla também a subsequente administração intraperitoneal e/ou intravenosa pós-operatória de uma fonte de glutamina por injecção.

As formulações para utilização neste invento podem ser um líquido, uma pasta ou um gel compreendendo uma fonte de glutamina dissolvida numa fase aquosa. As composições deste invento podem ser essas formulações ou podem ser composições que se destinam a produzir essas formulações quando hidratadas. Na sua forma mais simples, a formulação para utilização neste invento consistirá numa fonte de glutamina dissolvida num veículo líquido aquoso estéril, adequado para instilação na cavidade peritoneal durante a cirurgia ou para injecção intraperitoneal a seguir executada. A solução pode ser instilada durante a cirurgia simplesmente por injecção, deposição, ou pulverização da mesma na cavidade peritoneal a partir de uma embalagem estéril adequada. A formulação pode ser instilada através de uma abertura criada para cirurgia laparoscópica.

Formulações particularmente adequadas para utilização neste invento serão espessadas para que a formulação exiba maior viscosidade em relação a uma formulação líquida típica adequada para injecção intravenosa. Essas formulações espessas serão na forma de uma pasta ou gel que pode ser aplicada directamente em tecidos ou regiões seleccionados do peritoneu ou na cavidade peritoneal durante um procedimento cirúrgico. Conhecem-se os agentes espessantes farmaceuticamente aceitáveis adequados e estes podem ser utilizados. De preferência, um desses agentes formará um hidrogel quando hidratado ou formará um hidrogel quando submetido a um agente de reticularização adequado e for hidratado. Esses componentes formadores de gel são

seleccionados pela sua biocompatibilidade e podem ser reabsorvíveis. Exemplos de agentes espessantes e de formação de gel adequados que foram utilizados em formulações farmacêuticas incluem polímeros possuindo um componente hidrofílico, tal como o colagéneo; polímeros de polioxialquíleno tais como óxidos de polietileno; álcoois de polivinilo; polivinil pirrolidonas; e metacrilatos de polihidroxietilo; hialuronatos; e várias proteínas tais como albumina, etc. Podem também ser utilizados géis hemostáticos, incluindo os que contêm fibrinogénio ou fibrina.

A fonte de glutamina pode também ser aplicada ou impregnada em implantes cirúrgicos. Por exemplo, uma formulação de gel deste invento pode ser aderida ao exterior de um implante. Os implantes compostos por um material tal como a celulose reabsorvível tecida (tal como o tipo comercializado com o nome comercial INTERCEED) podem ser impregnados com uma formulação líquida ou em gel deste invento.

Exemplo 1

Avaliaram-se histologicamente 70 ratinhos Wistar machos plus (cada um com mais de 350 g) nos dias pós-operatórios 1, 3, 5, 7, 10, 30 e cerca de 6 semanas. Distribuiram-se aleatoriamente os ratinhos com base no modo de tratamento, tipo de suturas e presença ou ausência de hemorragia durante a cirurgia. Inicialmente, existiam três grupos de cirurgia (tratamento com alanil-glutamina, com solução salina, e nenhum tratamento) mais um controle (nenhuma cirurgia). Após a obtenção de resultados preliminares incluiu-se um quinto grupo usando L-glutamina em vez de alanil-glutamina.

Anestesiaram-se os ratinhos com halotano/cetamina. Efectuou-se uma cirurgia aberta envolvendo uma incisão na linha média sub-umbilical e uma punção cecal modificada com *pulstring* para prevenir *soilage* após o fecho abdominal. O procedimento envolveu alguma extrusão fecal, emitindo cenários clínicos de perfurações iatrogénicas/traumáticas do intestino. Alanil-glutamina [Degussa; Coubevoie, França] (0,3 g/kg - 1,5 g/kg); solução salina (5 ml); ou L-glutamina [Wiler; PCCA] (1,5 g/kg) instilados na cavidade peritoneal a

partir de uma seringa. Fechou-se, em camadas, com a mesma sutura, o ceco, o abdómen e a pele. Utilizaram-se várias suturas absorvíveis (3/0 Vicryl™, 3/0 Monocryl™, 3/0 PDSTM, 2/0 Maxon™) e não absorvíveis (3/0 Prolene™, 3/0 Ethibond™, 4/0 & 5/0 Surgilene™, 3/0 Novafil™). Infiltrou-se o ferimento com anestésico local. Deu-se aos animais ração suficiente para comer (20 g/dia ≈ 2 mmole/kg/dia). Colheu-se tracto gastrointestinal e omento desde o estômago até ao cólon sigmóide e fixou-se em solução de formaldeído para avaliação.

Avaliou-se histologicamente a gravidade das aderências usando lâminas coradas com Hematoxilina padrão & Eosina e tricromo de Masson. A última ajudou a delinear o grau de fibrose e deposição de colagénio.

Efectuou-se uma análise semi-quantitativa marcando o número médio de manchas leitosas por campo de elevada potência (HPF). Efectuou-se a análise estatística quantitativa usando o teste T entre os grupos experimentais. As manchas leitosas constituem um marcador para inflamação e formação de aderências.

No 10º dia de pós-operatório, a aparência histológica do peritoneu em ratinhos tratados com alanil-glutamina teve aderências muito mínimas quando comparada com os grupos cirúrgicos não tratados e tratados com solução salina e foi quase comparável ao peritoneu virgem de ratinhos (controle). Este resultado continuou nos ratinhos analisados às 6 semanas. Existia 1 mancha leitosa por 5 campos de elevada potência (5HPF) no peritoneu dos contolos, em comparação com as 6-7 manchas leitosas por 5HPF no grupo cirúrgico não tratado. As manchas leitosas no grupo de tratamento com alanil-glutamina foram as mesmas que os controles enquanto que o grupo tratado com solução salina teve 2-4 manchas leitosas por 5HPF.

Os resultados também revelaram notoriamente menor quantidade de resposta inflamatória aguda no grupo de tratamento (alanil-glutamina) nos dias 3-7 quando comparado com os grupos cirúrgicos de solução salina e sem tratamento. Isto tornou-se evidente pela menor quantidade de macrofagos e de proteínas quimiotácticas de macrófagos. O tratamento com

L-glutamina também resultou em redução, mas em menor grau do que o grupo tratado com alanil-glutamina. Houve também redução na deposição de colagéneo e fibrose nos animais no dia 10 no tratamento versus grupos cirúrgicos de solução salina e sem tratamento. No entanto, o tratamento com solução salina apresentou melhores resultados do que o grupo cirúrgico sem tratamento.

A dosagem de alanil-glutamina foi eficaz a 0,3 g/kg e a 1,5 g/kg. Houve mais aderências com as suturas entrançadas (3/0 Vicryl™, 2/0 Maxon™, 3/0 Dexon™ & 3/0 Ethibond™) do que com as não entrançadas ou monofilamentosas (3/0 Monocryl™, 3/0 PDS™, 3/0 Prolene™, 4/0 & 5/0 Surgilene™, 3/0 Novafil™) nos grupos tratados com solução salina e sem tratamento. Pareceu também haver tendências diferenciais para a formação de aderências com as suturas monofilamentosas (suturas absorvíveis versus não absorvíveis). No entanto, o tratamento com alanil-glutamina previu aderências em todos os grupos de sutura.

Alguns estudos anteriores em seres humanos usaram doses parentéricas de alanil-glutamina que variaram de 0,19-0,75 g/kg/dia [42, 47]. Administrou-se aos ratinhos suplemento de bolus entérico de 2,972 g/kg/dia de alanil-glutamina e 2,0 g/kg/dia de L-glutamina (misturada com 1,22 g/kg/dia de alanina) [43]. No presente invento administrámos por via intraperitoneal 0,3-1,5 g/kg de alanil-glutamina e L-glutamina. Não observámos complicações devidas à utilização intraperitoneal de alanil-glutamina ou L-glutamina uma vez que os ratinhos recuperaram da cirurgia e continuaram com as suas actividades usuais.

Avaliámos a actividade dos macrofagos a seguir à cirurgia abdominal usando um corante de anticorpos de proteínas quimiotácticas de macrofagos (MCP1). O MCP1 é um marcador para a actividade de macrofagos [46]. As nossas observações de MCP1 reduzido nos grupos de tratamento com fonte de glutamina quando comparados com os grupos cirúrgicos de tratamento com solução salina e sem tratamento indicaram que o tratamento com fonte de glutamina possuia um efeito inibidor na migração de macrofagos após a cirurgia abdominal. O facto de o MCP1 ser reduzido pelo tratamento mas não estar

completamente ausente é importante uma vez que não é desejável a total ausência pois esta está associada a peritonite e complicações sépticas pós-laparotomia [48].

A suturação peritoneal aumenta a isquémia, a desvascularização, e a necrose o que predispõe assim para a formação de aderências [49]. Mostrou-se que os monofilamentos produzem menos aderências do que as suturas entrançadas porque os seus microporos possuem uma tendência para albergar bactérias [50, 51]. Observámos um padrão semelhante nos ratinhos não tratados. No entanto, o tratamento preveniu aderências em todos os grupos de sutura.

A hemorragia está também associada a uma maior incidência de aderências mesmo com a utilização de terapias de prevenção existentes. O sangramento intraperitoneal provoca reacções inflamatórias intensas e aderências extensivas e a sua relação com as aderências está bem documentada em estudos em animais e em seres humanos [52]. Observámos que a hemorragia não evita o efeito do tratamento.

Exemplo 2

Os estudos anteriores mostram uma elevada incidencia de formação de aderências quando se utilizam malhas cirúrgicas como material de reforço [6a, 6b]. Repetimos os ensaios conforme se descreveu no Exemplo 1, inserindo malhas Marlex™ durante o procedimento nos grupos cirúrgicos. Obtiveram-se resultados comparáveis aos descritos no Exemplo 1 entre os dias 1-42.

Avaliou-se a gravidade das aderências no dia 90 usando a classificação de Zuhlke et al para as aderências [54]. Este procedimento de classificação foi descrito na literatura para a avaliação de outros potenciais tratamentos para aderências [55]. No dia 90, a classificação de aderências em animais tratados com alanil-glutamina foi 0-1 (nenhuma aderência ou aderências pouco sólidas), comparável aos abdomens virgens do grupo de controle. Isto difere das medições de aderências anteriores usando malhas de polipropileno que reportaram até cerca de 90% de formação de aderências [6a].

Exemplo 3

Uma vez instaladas, as aderências tendem a reaparecer. Examinámos o efeito do tratamento com alanil-glutamina sobre essas aderências secundárias. Efectuou-se o procedimento descrito no Exemplo 1 de perfuração cecal modificada com fecho *pulstring* em 9 ratinhos Sprague-Dawley. Dividiram-se os ratinhos em 5 grupos, cada grupo recebendo uma forma diferente de malha (INTERCEED™; PROCEED™; compósito BARD™; proleno; e uma malha que se deixou "infectar" por repetida reabertura da ferida). Efectuou-se o procedimento cirúrgico com colocação da malha sem a aplicação de uma fonte de glutamina. Seis meses após a cirurgia inicial, realizou-se uma laparotomia em cada ratinho depois adesiólise seguida de instalação de alanil-glutamina. Três semanas mais tarde, avaliaram-se os ratinhos quanto à reincidência de aderências e classificaram-se em conformidade com Zuhlke *et al.* [54] e não se observaram quaisquer aderências secundárias.

Embora o invento anterior tenha sido descrito com algum detalhe a título ilustrativo e exemplificativo para fins de clareza de compreensão, será facilmente evidente para os peritos na especialidade à luz dos ensinamentos deste invento que é possível efectuar-lhe alterações e modificações sem que haja afastamento do espírito ou âmbito das reivindicações em anexo. Todas as patentes, pedidos de patente, e fascículos aqui referidos são incorporados aqui por referência.

Referências

1. Thompson, J.N. and S.A. Whawell, Pathogenesis and prevention of adhesion formation. *Br J Surg*, 1995. 82(1): pp. 3-5.
2. Thompson, J.N., Preventing adhesions. *Lancet*, 1995. 346(8987): pp. 1382.
3. Ellis, H., The clinical significance of adhesions: focus on intestinal obstruction. *Eur J Surg Suppl*, 1997(577): pp. 5-9.
4. Menzies, D. and H. Ellis, Intestinal obstruction from adhesions - how big is the problem? *Ann R Coll Surg Engl*, 1990. 72(1): pp. 60-3.

5. Parker, M.C., et al., Postoperative adhesions: ten-year follow-up of 12,584 patients undergoing lower abdominal surgery. *Dis Colon Rectum*, 2001. 44(6): pp. 822-29; discussion 829-30.
6. Ellis, H., The causes and prevention of intestinal adhesions. *Br J Surg*, 1982. 69(5): pp. 241-3.
- 6a. Naim, J.O., et al., *J. Laparoendosc Surg*, 1993. 3: pp. 187-90.
- 6b. Baykal, A., et al., *World J Surg*, 1997. 21: pp. 579-82.
7. Menzies, D., Peritoneal adhesions. Incidence, cause, and prevention. *Surg Annu*, 1992. 24 Pt 1: pp. 27-45.
8. Bridges, J.B., F.R. Johnson, and H.W. Whitting, Peritoneal adhesion formation. *Acta Anat (Basel)*, 1965. 61(2): pp. 203-12.
9. Drollette, C.M. and S.Z. Badawy, Pathophysiology of pelvic adhesions. Modern trends in preventing infertility. *J Reprod Med*, 1992. 37(2): pp. 107-21; discussion 121-2.
10. Vural, B., et al., The role of neutrophils in the formation of peritoneal adhesions. *Hum Reprod*, 1999. 14(1): pp. 49-54.
11. Ackermann, P.C., P.D. De Wet, and G.P. Loots, Microcirculation of the rat omentum studied by means of corrosion casts. *Acta Anat (Basel)*, 1991. 140(2): pp. 146-9.
12. Shimotsuma, M., et al., Ontogeny of milky spots in the fetal lamb omentum. *Arch Histol Cytol*, 1994. 57(3): pp. 291-9.
13. Takemori, N., [Morphological studies of the omental milk spots in the mouse: light and electron microscopy (author's transl)]. *Hokkaido Igaku Zasshi*, 1979. 54(3): pp. 265-83.
14. Shimotsuma, M., et al., Milky spots in the human greater omentum. Macroscopic and histological identification. *Acta Anat (Basel)*, 1989. 136(3): pp. 211-6.
15. Shimotsuma, M., et al., Cellular subsets of the milky spots in the human greater omentum. *Cell Tissue Res*, 1991. 264(3): pp. 599-601.
16. Williams, R. and H. White, The greater omentum: its applicability to cancer surgery and cancer therapy. *Curr Probl Surg*, 1986. 23(11): pp. 789-865.
17. Dux, K., Proliferative activity of macrophages in the greater omentum of the mouse in relation to the early postnatal development of the vascular structures. *J Leukoc*

- Biol*, 1986. 40(4): pp. 445-58.
- 18. Rodgers, K.E. and G.S. dizerega, Function of peritoneal exudate cells after abdominal surgery. *J Invest Surg*, 1993. 6(1): pp. 9-23.
 - 19. Cranshaw, M.L. and L.V. Leak, Milky spots of the omentum: a source of peritoneal cells in the normal and stimulated animal. *Arch Histol Cytol*, 1990. 53 Suppl: pp. 165-77.
 - 20. Newsholme, E.A., The possible role of glutamine in some cells of the immune system and the possible consequence for the whole animal. *Experientia*, 1996. 52(5): pp. 455-9.
 - 21. Newsholme, E.A., B. Crabtree, and M.S. Ardawi, The role of high rates of glycolysis and glutamine utilization in rapidly dividing cells. *Biosci Rep*, 1985. 5(5): pp. 393-400.
 - 22. Newsholme, E.A., B. Crabtree, and M.S. Ardawi, Glutamine metabolism in lymphocytes: its biochemical, physiological and clinical importance. *Q J Exp Physiol*, 1985. 70(4): pp. 473-89.
 - 23. Werb, Z. and Z.A. Cohn, Plasma membrane synthesis in the macrophage following phagocytosis of polystyrene latex particles. *J Biol Chem*, 1972. 247(8): pp. 2439-46.
 - 24. Ardawi, M.S. and E.A. Newsholme, Glutamine metabolism in lymphocytes of the rat. *Biochem J*, 1983. 212(3): pp. 835-42.
 - 25. Dijkstra, F.R., et al., Recent clinical developments in pathophysiology, epidemiology, diagnosis and treatment of intra-abdominal adhesions. *Scand J Gastroenterol Suppl*, 2000(232): pp. 52-9.
 - 26. Vipond, M.N., et al., Peritoneal fibrinolytic activity and intra-abdominal adhesions. *Lancet*, 1990. 335(8698): pp. 1120-2.
 - 27. Whawell, S.A. and J.N. Thompson, Cytokine-induced release of plasminogen activator inhibitor-1 by human mesothelial cells. *Eur J Surg*, 1995. 161(5): pp. 315-8.
 - 28. Holmdahl, L. and M.L. Ivarsson, The role of cytokines, coagulation, and fibrinolysis in peritoneal tissue repair. *Eur J Surg*, 1999. 165(11): pp. 1012-9.
 - 29. Ivarsson, M.L., et al., Tissue markers as predictors of postoperative adhesions. *Br J Surg*, 1998. 85(11): pp. 1549-54.
 - 30. Smith, R.J., Glutamine metabolism and its physiologic importance. *JPEN J Parenter Enteral Nutr*, 1990. 14(4 Suppl): pp. 40S-44S.
 - 31. Lacey, J.M. and D.W. Wilmore, Is glutamine a conditionally

- essential amino acid? *Nutr Rev*, 1990. 48(8): pp. 297-309.
32. Vinnars, E., J. Bergstrom, and P. Furst, Influence of the postoperative state on the intracellular free amino acids in human muscle tissue. *Ann Surg*, 1975. 182(6): pp. 665-71.
33. Askanazi, J., et al., Muscle and plasma amino acids after injury: hypocaloric glucose vs. amino acid infusion. *Ann Surg*, 1980. 191(4): pp. 465-72.
34. Roth, E., [Changes in protein metabolism in cachexia and catabolism]. *Z Exp Chir Transplant Kunstliche Organe*, 1985. 18(3): pp. 150-6.
35. Roth, E., et al., Liver amino acids in sepsis. *Surgery*, 1985. 97(4): pp. 436-42.
36. Fukuzawa, K., et al., N-acetylcysteine ameliorates reperfusion injury after warm hepatic ischemia. *Transplantation*, 1995. 59(1): pp. 6-9.
37. Morlion, B.J., et al., Total parenteral nutrition with glutamine dipeptide after major abdominal surgery: a randomized, double-blind, controlled study. *Ann Surg*, 1998. 227(2): pp. 302-8.
38. Furst, P., S. Albers, and P. Stehle, Availability of glutamine supplied intravenously as alanylglutamine. *Metabolism*, 1989. 38(8 Suppl 1): pp. 67-72.
39. Kamer, J. and E. Roth, Influence of alanylglutamine infusion on gastrointestinal glutamine and alanine metabolism in anesthetized dogs. *Metabolism*, 1989. 38(8 Suppl 1): pp. 73-7.
40. Babst, R., et al., Glutamine peptide-supplemented long-term total parenteral nutrition: effects on intracellular and extracellular amino acid patterns, nitrogen economy, and tissue morphology in growing rats. *JPEN J Parenter Enteral Nutr*, 1993. 17(6): pp. 566-74.
41. Nordfjeld, K., M. Rasmussen, and V.G. Jensen, Storage of mixtures for total parenteral nutrition-long-term stability of a total parenteral nutrition mixture. *J Clin Hosp Pharm*, 1983. 8(3): pp. 265-74.
42. Cardona Pera, D., [Administration of glutamine and its dipeptides in parenteral nutrition. Which patients are candidates?]. *Nutr Hosp*, 1998. 13(1): pp. 8-20.
43. Satoh, J., et al., Enteral alanyl-glutamine supplement promotes intestinal adaptation in rats. *Int J Mol Med*, 2003. 12(4): pp. 615-20.
44. Satoh, J., et al., Nutritional benefits of enteral alanyl-

- glutamine supplementation on rat small intestinal damage induced by cyclophosphamide. *J Gastroenterol Hepatol*, 2003. 18(6): pp. 719-25.
45. Ray, N.F., et al., Abdominal adhesiolysis: inpatient care and expenditures in the United States in 1994. *J Am Coll Surg*, 1998. 186(1): pp. 1-9.
 46. Valente, A.J., et al., Mechanisms in intimal monocyte-macrophage recruitment. A special role for monocyte chemotactic protein-1. *Circulation*, 1992. 86(6 Suppl): pp. III20-5.
 47. Ward, E., et al., Oral glutamine in paediatric oncology patients: a dose finding study. *Eur J Clin Nutr*, 2003. 57(1): pp. 31-6.
 48. Matsukawa, A., et al., Endogenous monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) protects mice in a model of acute septic peritonitis: cross-talk between MCP-1 and leukotriene B4. *J Immunol*, 1999. 163(11): pp. 6148-54.
 49. Luijendijk, R.W., et al., Foreign material in postoperative adhesions. *Ann Surg*, 1996. 223(3): p. 242-8.
 50. Liakakos, T., et al., Peritoneal adhesions: etiology, pathophysiology, and clinical significance. Recent advances in prevention and management. *Dig Surg*, 2001. 18(4): pp. 260-73.
 51. Bakkum, E.A., et al., Quantitative analysis of the inflammatory reaction surrounding sutures commonly used in operative procedures and the relation to postsurgical adhesion formation. *Biomaterials*, 1995. 16(17): pp. 1283-9.
 52. Gadallah, M.F., et al., Relationship between intraperitoneal bleeding, adhesions, and peritoneal dialysis catheter failure: a method of prevention. *Adv Perit Dial*, 2001. 17: pp. 127-9.
 53. Obayan, A.O.E., Oxidative stress: Natural History and Modulation in Surgery and Trauma Patients. Ph.D. in Surgery Thesis, University of Saskatchewan, Spring 2004.
 54. Zuhlke, H.V., et al., *Langenbecks Arch Chir Suppl II Verh Dtsch Ges Chir*, 1990. pp. 1009-16.
 55. Bae, J.S., et al., *World J Gastroenterol* 11: pp. 810-816.

REIVINDICAÇÕES

1. Fonte de glutamina para utilização num método de redução da formação de aderências pós-operatórias.

2. Utilização de uma fonte de glutamina no fabrico de um medicamento para administração intraperitoneal para reduzir a formação de aderências pós-operatórias.

3. Fonte de glutamina para utilização num método de acordo com a reivindicação 1 ou utilização de acordo com a reivindicação 2, em que a fonte de glutamina é uma composição para administração intraperitoneal que compreende um transportador farmaceuticamente aceitável e pelo menos uma fonte de glutamina.

4. Fonte de glutamina para utilização num método de acordo com a reivindicação 1 ou 3, ou utilização de acordo com a reivindicação 2 ou 3, em que a pelo menos uma fonte de glutamina é um péptido solúvel contendo L-glutamina.

5. Fonte de glutamina para utilização num método de acordo com a reivindicação 4, ou utilização de acordo com a reivindicação 4, em que o péptido é um dipéptido.

6. Fonte de glutamina para utilização num método de acordo com a reivindicação 5, ou utilização de acordo com a reivindicação 5, em que o dipéptido é alanil-glutamina.

7. Fonte de glutamina para utilização num método de acordo com a reivindicação 1 ou 3, ou utilização de acordo com a reivindicação 2 ou 3, em que a pelo menos uma fonte de glutamina é L-glutamina.

8. Fonte de glutamina para utilizar num método de acordo com qualquer uma das reivindicações 3 a 7, ou na utilização de acordo com qualquer uma das reivindicações 3 a 7, em que a composição é formulada sob a forma de um gel.

9. Fonte de glutamina para utilização num método de acordo com qualquer uma das reivindicações 3 a 8, ou utilização de acordo com qualquer uma das reivindicações 3 a 8, em que a

composição é colocada ou impregnada num material cirúrgico ou num dispositivo médico implantável.

10. Fonte de glutamina para utilização num método de acordo com a reivindicação 9, ou utilização de acordo com a reivindicação 9, em que o material cirúrgico é uma malha.

11. Fonte de glutamina para utilização num método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 10, ou utilização de acordo com qualquer uma das reivindicações 2 a 10, em que a fonte de glutamina é entregue na cavidade peritoneal durante a cirurgia.

12. Dispositivo médico implantável, que compreende a composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 3 a 8, para utilização num método de redução da formação de aderências pós-operatórias.

13. Dispositivo de entrega que contém a composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 3 a 8, para utilização num método de entrega da composição por via intraperitoneal durante a cirurgia, para reduzir a formação de aderências pós-operatórias.

Lisboa, 2010-12-13