

HENRIQUE OSWALDO DA GAMA TORRES

**AVALIAÇÃO DO PAPEL DA GLUTAMINA NOS DESFECHOS
RELACIONADOS AO TRANSPLANTE ALOGÊNICO DE CÉLULAS-
TRONCO HEMATOPOIÉTICAS**

**FACULDADE DE MEDICINA
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
BELO HORIZONTE**

2008

HENRIQUE OSWALDO DA GAMA TORRES

**AVALIAÇÃO DO PAPEL DA GLUTAMINA NOS DESFECHOS
RELACIONADOS AO TRANSPLANTE ALOGÊNICO DE CÉLULAS-
TRONCO HEMATOPOIÉTICAS**

Tese apresentada ao Programa de Pós Graduação em Medicina, área de concentração Gastroenterologia, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Medicina.

Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais

Orientador: Prof. Dr. Aloísio Sales da Cunha

**FACULDADE DE MEDICINA
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
BELO HORIZONTE
2008**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

REITOR: Prof. Dr. Ronaldo Tadêu Pena

PRÓ-REITOR DE PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Dr. Jaime Arturo Ramirez

FACULDADE DE MEDICINA

DIRETOR: Prof. Dr. Francisco José Pena

COORDENADOR DO CENTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Dr. Carlos Faria Santos Amaral

COLEGIADO DO PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM MEDICINA

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO GASTROENTEROLOGIA

Prof. Dr. Luiz Gonzaga Vaz Coelho (coordenador)

Profa. Dra. Teresa Cristina de Abreu Ferrari

Profa. Dra. Cláudia Alves Couto

Profa. Dra. Luciana Dias Moretzsohn

Luiz Fernando Veloso (rep. discente)

A Ruth, com carinho e gratidão
A Chico e Quel
A meu pai, Ney

Agradecimentos

Ao Prof. Aloísio Sales da Cunha, orientador, pela calma e disponibilidade;

Ao Dr. Eduardo Garcia Vilela, colega de jornada e sem quem o método da permeabilidade intestinal não seria possível;

Ao Prof. Wellington Moraes de Azevedo, que acolheu e estimulou o trabalho na Unidade de Transplante de Medula Óssea de HC-UFMG;

À Dra. Fernanda Maia Lodi, pelo apoio imprescindível na Unidade de Transplante, pelas discussões e artigos;

Ao Prof. Henrique Neves da Silva Bittencourt, pelo grande apoio nas questões clínicas e epidemiológicas relacionadas ao transplante de medula e na confecção dos artigos;

À farmacêutica Adriana Aparecida Silva da Farmacotécnica da Unidade de Farmácia do HC-UFMG, exemplo de discrição e competência, pela ajuda imprescindível;

Ao Prof. Eugênio Marcos Andrade Goulart pelo sempre presente apoio nas questões metodológicas e epidemiológicas;

Aos acadêmicos de medicina Beatriz Roedl, Zilcem Arruda, Ana Carolina C. Aguirre e Marcelo Hugo C. Souza, sem os quais este trabalho não teria sido possível;

À equipe de médicos e de enfermagem da Unidade de Transplantes do HC-UFMG pela compreensão e apoio.

“É perfeitamente evidente que a ciência moderna alargou, para além de qualquer possibilidade de medida, nosso conhecimento do mundo, e aumentou o número de “fatos” – todas espécies de fatos – por ela descobertos, observados e acumulados. Além disso, foi justamente assim que alguns dos fundadores da ciência moderna viram e compreenderam a sua obra e se compreenderam a si próprios. Gilbert e Kepler, Harvey e Galileu – todos alardeiam a enorme fecundidade da experiência e da observação direta, em oposição à esterilidade do pensamento abstrato e especulativo.

Porém, qualquer que seja a importância dos novos “fatos” descobertos e reunidos pelos *venatores*, a acumulação de certo número de fatos, isto é, uma pura coleção de dados da observação e da experiência não constitui uma ciência. Os fatos têm de ser ordenados, interpretados, explicados. Em outras palavras, só quando é submetido a um tratamento teórico é que o conhecimento dos fatos se torna uma ciência.”

Alexandre Koyré. Estudos da História do Pensamento Científico

Resumo

Cinquenta e três pacientes com afecções neoplásicas hematológicas submetidos a transplante alogênico de células tronco de doadores aparentados HLA idênticos foram alocados de forma aleatória para receber nutrição parenteral (NP) enriquecida com glutamina (Grupo 1 – G1, $n = 27$) e NP padrão (Grupo 2- G2, $n = 26$) em soluções com mesmo conteúdo de proteína. Óbitos (dias +100 e +180), infecções, doença enxerto contra hospedeiro (DECH) aguda, tempo de internação, tempo de neutropenia e permeabilidade intestinal foram estudados. Idade, sexo, diagnóstico, estágio da doença e variáveis de tratamento encontravam-se igualmente distribuídas entre os grupos. A sobrevivência no D+180 foi maior no G1 (74%) em comparação com o G2 (46%), $p = 0,03$ (log-rank), atingindo o limite da significância estatística no D+100 ($p = 0,05$). A maior parte dos óbitos ocorreu antes do D+100, especialmente em G2 (10/26, 39%), contra 4/27 (15%) em G1. DECH foi a principal causa de morte (8/21, 38%), especialmente em G2 ($n = 6$, 5 antes de D+100). Outros desfechos não foram afetados. A permeabilidade intestinal encontrava-se alterada à admissão, não foi afetada pela suplementação de glutamina, mas piorou consistentemente ao longo do estudo. Os resultados mostraram que a NP enriquecida com glutamina associou-se a aumento da sobrevida de curto prazo após o transplante alogênico de células tronco hematopoiéticas. Os benefícios da glutamina parecem ser independentes da proteção à mucosa, já que a permeabilidade intestinal não foi afetada pelo seu uso. Tendência de menor incidência de mortes por DECH pode sugerir papel imunomodulador da glutamina.

Abstract

Fifty-three patients with hematological malignancies who underwent allogeneic stem cell transplantation (SCT) from HLA-identical siblings were randomly assigned to receive glutamine enriched parenteral nutrition - PN (GIPN, $n = 27$) or standard PN (PN, $n = 26$), in isonitrogenous solutions. Deaths (D+100 and D+180), infections, acute GVHD, length of stay (LOS), time of neutropenia and intestinal permeability (IP) were studied. Ages, gender, diagnosis, disease status and treatment variables were equally distributed between groups. Survival on D+180 was increased in GIPN (74%) vs. PN (46 %), $p = 0.03$ (log-rank), reaching the limit of statistical significance on D+100 ($p = 0.05$). Most deaths occurred before D+100, especially in PN (10/26, 39 %) *versus* 15 % (4/27) in GIPN. GVHD was the most frequent cause of death (8/21, 38%), especially in PN ($n = 6$, 5 before D+100). Other outcomes were not affected. IP was affected on admission, was not affected by glutamine enrichment, but consistently worsened throughout the study. Results showed that glutamine enriched PN was efficacious in increasing short-term survival after allo-SCT. Benefits of glutamine seem to be independent of mucosal protection, as IP was not affected by its use. A trend to a lower incidence of GVHD deaths may suggest an immunomodulatory role of glutamine.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Gráfico representativo da sobrevida cumulativa aos 100 e 180 dias: Grupo 1 X Grupo 2	95
Figura 2: Gráfico representativo das frações de excreção de lactulose e suas médias em D-6, D+6 e D+14	101
Figura 3: Gráfico representativo das frações de excreção de manitol e suas médias em D-6, D+6 e D+14	101
Figura 4: Gráfico representativo da relação entre as frações de excreção de lactulose e manitol e suas médias em D-6, D+6 e D+14	102

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Ensaios clínicos utilizando a glutamina em pacientes submetidos à quimioterapia em geral ou radioterapia, por doenças neoplásicas diversas	62
Tabela 2: Ensaios clínicos com o uso de glutamina em pacientes submetidos a TCTH	67
Tabela 3: Classificação clínica da doença enxerto contra hospedeiro	85
Tabela 4: Distribuição dos pacientes nos dois grupos, de acordo com os diagnósticos e os riscos a eles relacionados	91
Tabela 5: Comparação dos aspectos terapêuticos observados nos dois grupos, com referência aos parâmetros condicionamento, profilaxia da DECH, fonte de células e sexo doador/receptor	93
Tabela 6: Análise de sobrevivência (<i>log-rank</i>) aos 100 e 180 dias para os diversos fatores prognósticos, analisados dicotomicamente	94
Tabela 7: Momentos e causas de morte nos dois grupos estudados (Grupos 1 e 2)	96
Tabela 8: Localização e gravidade da DECH nos grupos estudados (Grupos 1 e 2)	97
Tabela 9: resultados das medidas de permeabilidade intestinal de acordo com o momento da medida, no conjunto dos pacientes estudados	98
Tabela 10: Comparação não pareada das médias das medidas de permeabilidade intestinal entre os pacientes do Grupo 1 e do Grupo 2	99
Tabela 11: Média pareada das diferenças das medidas de permeabilidade	

intestinal entre os diversos momentos do estudo (sem distinção de grupo) 100

Tabela 12: Medidas de permeabilidade intestinal em D-6 em pacientes submetidos a quimioterapia recente em toda a casuística estudada, sem distinção dos grupos 103

Tabela 13: Proporções de pacientes acima e abaixo dos pontos de cortes da relação entre as frações de excreção da lactulose/manitol e da fração de excreção de lactulose em D-6 quanto à incidência de DECH grave (sem distinção de grupo) 106

Lista de abreviaturas

51Cr-EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético, marcado com cromo 51
5FU	5-fluoruracil
99Tc-DTPA	ácido dietilenotriamino penta-acético, marcado com tecnécio 99
APACHE	Acute Physiology and Chronic Health Evaluation
Ara C	citosina arabinosídeo
ATP	trifosfato de adenosina
BCNU	carmustina
Ca	câncer
Caco-2	“human colonic adenocarcinoma cells” (linhagem de células)
CD4	linfócito com grupamento de diferenciação 4
CD8	linfócito com grupamento de diferenciação 8
CTP	células-tronco periféricas
Cy	ciclofosfamida
d	dias
D+14	dia + 14 pós-transplante
D+6	dia + 6 pós-transplante
D-0	dia do transplante
D-6	dia – 6 pré-transplante
Da	daltons
DECH	doença enxerto contra hospedeiro

EV	endovenoso
FasL	ligante do Fas
FN- $\kappa\beta$	fator nuclear-kappa beta
FNT- α	fator de necrose tumoral do tipo alfa
g	grama
GALT	“Gut Associated Lymphoid Tissue”
HLA	antígenos de histocompatibilidade
HPLC	“High Performance Liquid Chromatography” (cromatografia líquida de alta performance)
I- $\kappa\beta$	inibidor kappa beta
IgA	imunoglobulina A
IL-1	interleucina 1
IL-2	interleucina 2
IL-4	interleucina 4
IL-6	interleucina 6
IL-8	interleucina 8
IL-10	interleucina 10
IL-11	interleucina 11
IL-12	interleucina 12
IL-18	interleucina 18
INF- γ	interferon do tipo gama
kg	quilograma
LAK	“Lymphokine-Activated Killer cells”
LAS	leucemia aguda secundária

LLA	leucemia linfóide aguda
LMA	leucemia mielóide aguda
LMC	leucemia mielóide crônica
m ²	metro quadrado
MO	medula óssea
Mtx	metotrexate
<i>n</i>	número de casos
NADPH	Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato (reduzida)
NK	células T <i>natural killer</i>
NP	nutrição parenteral
<i>p</i>	nível de significância estatística
PEG 400	polietileno-glicol com massa molecular entre 380 e 420
PI	permeabilidade intestinal
QT	quimioterapia
RxT	radioterapia
SARA	síndrome da angústia respiratória do adulto
SMD	síndrome mielodisplásica
TCTH	transplante de células tronco hematopoiéticas
Th1	linfócitos T “helper” do tipo 1
Th2	linfócitos T “helper” do tipo 2
Tx	transplante
VP-16	etoposida

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 OBJETIVOS	21
3 REVISÃO DA LITERATURA	22
3.1 Os efeitos colaterais do transplante de células tronco hematopoiéticas.....	22
3.1.1 A doença enxerto contra hospedeiro.....	25
3.2 O papel da suplementação de glutamina.....	30
3.2.1 Aspectos gerais.....	30
3.2.2 Aspectos históricos relacionados à glutamina.....	32
3.2.3 Papel e mecanismos de ação da glutamina.....	34
3.2.3.1 Papel da glutamina: mucosa intestinal	35
3.2.3.2 Papel da glutamina: sistema imunológico.....	48
3.2.3.3 O papel da glutamina: metabolismo.....	55
3.3 Estudos sobre suplementação de glutamina em pacientes submetidos a quimioterapia e a TCTH.....	60
3.4 As medidas da permeabilidade e seu papel na avaliação da barreira mucosa em pacientes submetidos a quimioterapia e a TCTH.....	72
4 PACIENTES E MÉTODOS	82
4.1 Grupos de pacientes.....	82
4.2 Critérios de inclusão e exclusão.....	83
4.2.1 Critérios de inclusão.....	83
4.2.2 Critérios de exclusão.....	83

4.3 Cálculo amostral.....	83
4.4 Suporte nutricional dos pacientes dos grupos 1 e 2.....	84
4.5 Desfechos avaliados	85
4.5.1 Medidas da permeabilidade intestinal.....	86
4.6 Análise estatística.....	88
5 RESULTADOS.....	91
5.1 Características demográficas e clínicas.....	91
5.2 Avaliação da sobrevida.....	93
5.3 Desfechos secundários.....	96
5.3.1 Medidas da permeabilidade intestinal.....	98
5.3.1.1 Relação entre realização de quimioterapia recente e permeabilidade intestinal.....	103
5.3.1.2 Relação entre medidas de permeabilidade intestinal e desfechos.....	104
6 DISCUSSÃO.....	107
6.1 Aspectos metodológicos.....	107
6.1.1 Randomização.....	107
6.1.2 Obtenção de parâmetros para definição do tamanho da amostra.....	108
6.1.3 Controle de variáveis com potencial de confundimento.....	111
6.1.4 Aspectos nutricionais.....	113
6.2 Análise dos desfechos.....	115

6.2.1 Sobrevida e desfechos secundários.....	115
6.2.2 Testes de permeabilidade intestinal.....	117
6.3 Mecanismos possíveis de ação da glutamina.....	121
7 CONCLUSÕES.....	126
8 PROPOSTAS PARA CONTINUIDADE DA LINHA DE PESQUISA.....	127
9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	128
10 ANEXOS.....	155

1 INTRODUÇÃO

O transplante de células tronco hematopoiéticas (TCTH) trouxe melhora para o prognóstico de pacientes com neoplasias hematológicas e constitui-se hoje em importante alternativa terapêutica para esse grupo de pacientes.

Entretando, os efeitos tóxicos no sistema hematopoético não são os únicos fatores que limitam o aumento das doses de citotóxicos visando eliminar as células neoplásicas, o que redundaria em melhora adicional dos resultados^{1,2}. Os efeitos tóxicos em outros sistemas, particularmente no trato gastrointestinal, constituem-se em importante causa de morbi-mortalidade e um dos principais impedimentos ao incremento das doses de agentes antineoplásicos². Dessa forma, impõe-se a busca de alternativas que possam minimizar estas conseqüências.

Efeitos tóxicos no sistema gastrointestinal sempre ocorrem como resultado da terapêutica citorredutiva pré-transplante. Estomatite, mucosite e enterite são comuns. Os regimes citorredutores típicos incluem a combinação de ciclofosfamida e bussulfan, ou de ciclofosfamida com irradiação corporal total.

A mucosite, definida como lesão das membranas mucosas do trato digestivo após tratamentos antineoplásicos, resulta de ambos os regimes, assim como da profilaxia da doença enxerto contra hospedeiro (DECH) que emprega o metotrexate, tornando-se mais grave a partir da segunda semana após o transplante e, usualmente, melhorando à medida que ocorre o implante das células enxertadas³.

Clinicamente, a mucosite pode ser classificada em oral e não oral (gastrointestinal). A oral é caracterizada por dor e lesões orais que podem dificultar em graus variáveis a ingestão de líquidos e alimentos. A gastrointestinal manifesta-se com diarréia, dor abdominal e vômitos, que refletem a lesão difusa da mucosa intestinal². O transplante

alogênico de células do sistema hematopoiético traz, como complicação adicional no trato digestivo, a DECH. Trata-se de resposta dos linfócitos do doador aos tecidos do hospedeiro, com ativação inicial das células T e subsequente ativação de citocinas. Os alvos dessa resposta imune são as células epiteliais da pele, intestino e trato biliar. No trato digestivo, a DECH aguda pode ocorrer em qualquer lugar, desde a junção esôfago-gástrica até o ânus, sendo seus sintomas proeminentes a diarreia aquosa esverdeada e vômitos persistentes, além de icterícia com elevação de transaminases³.

O termo “tempestade citocínica” tem sido usado para denominar o conjunto de alterações inflamatórias desencadeadas pelo dano aos tecidos conseqüente à quimioterapia inicial, que passam a secretar citocinas inflamatórias, incluindo interleucina 1 (IL-1), fator de necrose tumoral do tipo alfa (FNT- α) e interferon do tipo gama (INF- γ). Estas alterações constituem a primeira fase do processo fisiopatológico que resulta na DECH e, aparentemente, quanto mais intenso o regime de condicionamento e, por conseqüência, o dano tissular, mais grave a DECH⁴.

Diversas infecções virais, bacterianas, fúngicas e parasitárias, incluindo citomegalovirus, adenovirus, herpes, *Candida*, *Salmonella*, *Shigella*, *Campylobacter*, *Clostridium difficile* e outras são comuns, afetam a morbi-mortalidade e entram no diagnóstico diferencial das afecções gastrointestinais de pacientes submetidos a TCTH⁵.

Por todas as razões mencionadas e pela redução importante da ingesta oral a elas relacionadas, bem como pela redução do apetite, sistematicamente observada, o TCTH resulta em processo catabólico intenso.

Boa parte dos protocolos de transplante alogênico de células hematopoiéticas utilizam, como parte de seus esquemas terapêuticos de suporte, a nutrição parenteral. Tal prática decorre, do já mencionado catabolismo, da impressão mais ou menos generalizada de que nutrição oral ou enteral é de difícil consecução e pela demonstração

por estudo de aumento significativo da sobrevivência em seis meses de pacientes que receberam nutrição parenteral, em comparação àqueles que receberam dieta oral conforme aceitação. Não houve, entretanto, redução de mielossupressão, incidência de DECH, tempo de internação hospitalar, e tempo para desenvolvimento de bacteremia⁶.

Estudos subseqüentes, comparando nutrição enteral à nutrição parenteral não demonstraram diferenças entre os dois métodos de suporte nutricional^{7,8}.

Posteriormente, avaliou-se o potencial da nutrição parenteral enriquecida com o aminoácido glutamina na redução da morbi-mortalidade do TCTH, com sugestão de efeitos benéficos em relação a incidência de infecções, tempo de hospitalização e melhora do balanço nitrogenado no grupo receptor de glutamina^{9,10}.

A justificativa fisiopatológica para seu uso encontra-se baseada no papel da glutamina nos tecidos de replicação rápida, como o do sistema imune e do trato gastrointestinal e no seu papel em situações de estresse metabólico, em que poderia atenuar ou reverter o catabolismo¹¹. Em síntese, desfechos clínicos favoráveis relacionados ao uso da glutamina nos pacientes submetidos a TCTH encontrar-se-iam relacionados a três aspectos fundamentais: 1) redução da lesão da barreira mucosa, através da manutenção do trofismo celular da mucosa, impedindo ou reduzindo dessa forma a passagem de microorganismos ou de toxinas através da barreira mucosa intestinal; 2) reforço ou modulação da imunidade através de seu papel nos tecidos de replicação rápida, incluindo o imune e 3) seu papel no metabolismo, atenuando o catabolismo e, possivelmente, as alterações do metabolismo dos carboidratos^{12,13}.

Tendo em vista os aspectos observados na literatura, este estudo encontra sua justificativa na tentativa de se contribuir para avaliar efeito da glutamina nos desfechos clínicos de pacientes submetidos ao TCTH, a maior parte deles predispostos a grave

comprometimento do trato digestivo e importante estresse metabólico, e na busca de se entender seus eventuais mecanismos de ação.

2- OBJETIVOS

1- Comparar os desfechos mortalidade, tempo de internação hospitalar, infecção clinicamente definida, duração de leucopenia e incidência de DECH aguda entre grupos alocados aleatoriamente para receber fórmulas de nutrição parenteral enriquecidas ou não com glutamina.

2 – Avaliar a barreira mucosa intestinal por meio da comparação da permeabilidade intestinal, medida pela lactulose e manitol nos dois grupos de pacientes, bem como avaliar as alterações dessas medidas ao longo do tempo, nos períodos pré e pós-transplante;

3- Avaliar possíveis associações entre desfechos clínicos e medidas de permeabilidade intestinal.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Os efeitos colaterais do transplante de células tronco hematopoiéticas

Pacientes submetidos a TCTH estão predispostos a diversas complicações, algumas delas com grave potencial evolutivo. Essas complicações são normalmente decorrentes do regime de condicionamento e da imunossupressão, com conseqüente infecção e disfunção de órgãos, e da DECH, ocorrendo habitualmente nos primeiros 100 dias, com elevada mortalidade. A taxa de transferência de pacientes com complicações do TCTH para unidades de terapia intensiva encontra-se entre 11% e 40% e mais de 60% destes requerem ventilação mecânica, com elevada mortalidade associada¹⁴.

A taxa de mortalidade de pacientes de TCTH internados em terapia intensiva, que era de 90% nos primórdios da realização do procedimento, encontra-se ainda elevada e situa-se em torno de 33% para mortalidade no CTI e 56% para a mortalidade hospitalar¹⁴.

A mortalidade precoce (até 100 dias) é considerada como indicador que avalia a toxicidade do TCTH. Estudo que avaliou a sobrevivência de pacientes submetidos a transplante alogênico de medula para leucemia mielóide aguda e crônica nos Estados Unidos e Canadá, entre 1985 a 1999, mostrou taxa de sobrevida ajustada no primeiro ano pós transplante de 56% nos anos 80 e 63% nos anos 90¹⁵. A mortalidade aos 100 dias depois de transplante alogênico com doador HLA-idêntico varia entre 10% a 15% para pacientes com formas de leucemia avaliadas como de menor risco e 20% a 30% para formas avançadas, de maior risco¹⁶. Estes dados dão uma idéia da gravidade dos pacientes que se submetem a TCTH.

Para a finalidade de se avaliar as principais alterações fisiopatológicas que ocorrem no período inicial pós-transplante e que se encontram relacionadas a desfechos adversos,

a fase que vai do período pré-transplante até os 100 dias pode ser dividida em condicionamento, correspondendo à semana que antecede o transplante e na qual as drogas quimioterápicas são infundidas com o objetivo de reduzir ao máximo as células neoplásicas, período “pre-engraftment” (período de aplasia), que vai do dia da infusão das células tronco, ao trigésimo dia e período “post-engraftment” (pós recuperação hematopoiética), que vai do trigésimo ao centésimo dia¹⁷.

A fase de condicionamento corresponde ao período da quimioterapia (associada ou não à radioterapia) inicial, durante a qual os regimes considerados mieloablativos dão ensejo às alterações da mucosite e suas consequências clínicas, que se estendem durante a fase de “pré-engraftment” e que podem exercer papel importante no desenvolvimento da DECH, conforme comentado a seguir. Mais recentemente, regimes denominados não-mieloablativos foram desenvolvidos, no intuito de minimizar os efeitos colaterais e modular o desenvolvimento da DECH. Os regimes mieloablativos, especialmente aqueles contendo busulfan ou melfalan, ou baseados em radioterapia, exercem papel fundamental no desenvolvimento da mucosite¹⁸. Durante a fase de “pré-engraftment” a maioria dos regimes de profilaxia da DECH incluem o metotrexate, medicamento que ocasiona dano adicional à mucosa¹⁸. Essa associação de estímulos lesivos intensos e superpostos explica, em parte, a gravidade da mucosite associada aos TCTH, especialmente os alogênicos.

Considerando-se a seqüência de seus principais mecanismos fisiopatológicos, a mucosite é considerada um processo de cinco fases: iniciação (1), aumento da expressão de genes de resposta imediata e geração de mensagens (2), amplificação e sinalização (3), ulcerativa (4) e recuperação (5)¹⁹.

Nas fases 1, 2 e 3, danos às moléculas de DNA e outros substratos, bem como geração de espécies reativas de oxigênio induzem uma série complexa de eventos, ainda

em elucidação. O dano às cadeias de DNA resulta em ativação de várias vias de transdução, tais como o p53 e o fator nuclear-kappa beta (FN- $\kappa\beta$). Moléculas ligadas às membranas celulares que são liberadas durante a peroxidação de lipídios resultam no aumento da expressão de genes de resposta imediata, que, por sua vez, regulam outros fatores de transcrição envolvidos na resposta à mucosite. Essas alterações ocorrem em todas as células da mucosa, não somente no epitélio¹⁹. O FN- $\kappa\beta$, responsável pela regulação de cerca de 200 genes, parece exercer um papel central nas fases de geração de mensagens e amplificação. Nessas fases, o aumento da expressão de genes, resultante da ativação dos fatores de transcrição pela quimio/radioterapia, ocasiona produção aumentada das citocinas pró-inflamatórias TNF- α , IL1- β e interleucina 6 (IL-6). Níveis aumentados dessas moléculas na própria mucosa parecem estimular o dano precoce ao tecido conjuntivo e ao endotélio.

Na fase de amplificação, grande gama de substâncias biologicamente ativas acumuladas, direcionadas aos tecidos, com destaque para as citocinas pró-inflamatórias, são capazes não somente de danificá-los, mas fornecem também uma alça de *feedback* positivo, que amplifica a resposta inflamatória inicial e na qual o FN- $\kappa\beta$ exerce papel fundamental. Esse fator de transcrição pode ser ativado pelas citocinas e torna a acionar genes não somente em novas células inflamatórias para a produção de mais citocinas, mas também genes que codificam enzimas envolvidas na quebra de proteínas e formação de prostaglandinas, que por sua vez, resultam em mais dano tissular¹⁹.

3.1.1 A doença enxerto contra hospedeiro

Trata-se de um estado patológico que ocorre secundariamente à presença do linfócito T do doador nos tecidos do hospedeiro afetando, na sua forma aguda, predominantemente, a pele, o fígado e o trato digestivo e tem como manifestações principais *rash* cutâneo, icterícia e diarreia. Permanece como a toxicidade mais importante dos TCTH.

A DECH aguda, aquela que ocorre nos primeiros 100 dias pós-transplante, principal objeto de nossa discussão, é responsável por 15% a 40% da mortalidade e principal causa de morbidade em transplantes alogênicos²⁰.

A fisiopatologia da DECH é melhor descrita como fenômeno trifásico. O momento inicial, a fase de ativação das células apresentadoras de antígenos, começa mesmo antes da infusão das células do doador e envolve o desenvolvimento de um ambiente de inflamação, resultante do dano aos tecidos do hospedeiro induzido pela quimioterapia, ou radioterapia de condicionamento, além de outras condições relacionadas ao hospedeiro, como a própria doença, seu tratamento e infecções. Os tecidos lesados, conforme já mencionado, secretam citocinas inflamatórias, incluindo IL1, FNT- α e INF- γ , no período correspondente às fases da mucosite já aludidas, respectivamente, as fases de iniciação (1), aumento da expressão de genes de resposta imediata e geração de mensagens (2), amplificação e sinalização (3). Este quadro que engendra a chamada “tempestade citocínica”, resulta no aumento da expressão de moléculas de adesão, moléculas co-estimulatórias e antígenos maiores de histocompatibilidade, entre outros, podendo acionar linfócitos do doador e eventuais linfócitos residuais do receptor. Todos esses sinais resultam na ativação de células apresentadoras de antígenos, que leva a aumento da expressão de antígenos de histocompatibilidade maiores e moléculas de adesão e, conseqüentemente, maior reconhecimento de antígenos de histocompatibilidade maiores e menores pelas células T maduras do doador²⁰.

O dano à mucosa intestinal decorrente do condicionamento é particularmente importante nessa fase, pois possibilita a passagem de endotoxinas das bactérias do trato digestivo para a corrente sanguínea, induzindo a secreção de citocinas inflamatórias pelos macrófagos e reforçando, por sua vez, a ativação de células apresentadoras de antígenos. Observações iniciais mostraram associação da microflora e antígenos bacterianos e desenvolvimento de DECH²¹. Níveis elevados de lipopolissacárides foram correlacionados com a intensidade da DECH. Ademais, o tecido linfóide do trato digestivo parece ser local importante da interação das células apresentadoras de antígenos ativadas e os linfócitos do doador²²⁻²⁵. Grande número de estudos experimentais realizados para elucidação dos mecanismos fisiopatológicos da DECH, indicam papel central do intestino em seu desencadeamento. Alguns estudos experimentais e clínicos indicam que a redução da colonização bacteriana do trato digestivo limita de forma significativa o risco de DECH. Estudo em que se usou técnica para antagonizar os lipopolissacárides levou à redução de DECH²⁶.

Abordagens experimentais para prevenir a DECH também obtiveram sucesso ao lançar mão da redução do dano à barreira mucosa intestinal, como o uso de interleucina 11 (IL-11) e do fator de crescimento de queratinócitos. Os estudos com fator de crescimento de queratinócitos preveniram a permeação de lipopolissacárides para a circulação e resultaram na redução dos níveis de FNT- α ²⁷⁻³⁰.

Esse quadro reforça a observação de que regimes de condicionamento mais intensos, que causam dano epitelial e endotelial extensos, levando à subsequente liberação de citocinas e aumento da expressão de moléculas de adesão na superfície de células, associam-se a aumento no risco de DECH. A correlação entre intensidade do condicionamento, liberação de citocinas inflamatórias e gravidade da DECH recebeu suporte de estudos experimentais, ensejando inovações clínicas importantes, entre as

quais os regimes de condicionamento reduzido, também chamados de não-mieloablativos, que buscam limitar os danos aos tecidos do hospedeiro, particularmente o digestivo e assim limitar a ativação de células apresentadoras de antígenos do hospedeiro³¹⁻³³.

Na segunda fase, células apresentadoras de antígenos, principalmente as do hospedeiro, se encontram presentes nos órgãos linfóides do receptor e, juntamente com citocinas inflamatórias, acionam células T do doador, que se diferenciam em células efetoras. É a chamada fase de ativação²⁰.

É a natureza da interação das células T com as células apresentadoras de antígeno que parece ditar o tipo de diferenciação dos linfócitos T. As vias de ativação das células T podem resultar na transcrição de genes de citocinas tais como interleucina-2 (IL-2), INF- γ e FNT- α , o chamado fenótipo Th1, mais tradicionalmente reconhecidas como mediadores da DECH aguda. Tem-se atribuído à IL-2 papel central no controle e amplificação da resposta aloimune e essa citocina permanece objeto de muitas abordagens profiláticas e terapêuticas da DECH atuais, tais como a ciclosporina, o tacrolimus e anticorpos monoclonais direcionados à ela ou a seu receptor²⁰.

Por outro lado, apesar da polarização das células T para o fenótipo Th1 parece ser importante no desenvolvimento da DECH aguda, o paradigma Th1/Th2 na imunopatogenese da DECH aguda tem-se modificado ao longo dos últimos anos e seu papel causal permanece ainda por ser melhor compreendido. Estudos realizados por Sykes et al^{34,35} com o uso IL-2, assim como por outros autores com interferon- γ , apontam para a dificuldade de se estabelecer os respectivos papéis dos linfócitos Th1 e Th2 no desenvolvimento, intensidade e localização da DECH³⁶⁻³⁹.

Polimorfismos de diversos genes produtores de citocinas, tais como TNF- α , interleucina-10 (IL-10) e INF- γ já foram identificados. Esses polimorfismos podem resultar

em diferentes níveis de produção dessas substâncias e, possivelmente em diferentes riscos e gravidade no desenvolvimento da DECH aguda. Entretanto, nem todas as análises de polimorfismos reforçam o paradigma de que o aumento da produção de citocinas do tipo Th1 encontra-se relacionado a uma maior incidência ou gravidade da DECH, ou a maior mortalidade. Assim, estudos sobre o papel do polimorfismo genético de citocinas na fisiopatologia da DECH também não sugerem um paradigma simplificado para explicar o desenvolvimento dessa condição²⁰.

Em resumo, o papel das citocinas Th1 como indutores ou reguladores da intensidade da DECH depende do grau de desacordo dos aloantígenos, da intensidade do condicionamento, do tipo de polimorfismo genético de citocinas e dos subtipos de células T envolvidas após o TCTH. Embora a “tempestade citocínica” iniciada na fase 1 da DECH e amplificada pelas citocinas Th1 se correlacione com seu desenvolvimento, a polarização precoce das células T do doador para Th1 pode, em algumas circunstâncias, apresentar o efeito aparentemente paradoxal de atenuar a DECH. Essa observação pode indicar que quantidades fisiológicas de citocinas Th1 podem ser críticas para a indução da DECH, ao passo que sua produção inadequada, excessivamente elevada ou baixa, pode modular a DECH aguda através da ruptura de mecanismos de *feedback* negativo que atuam nas células T ativadas do doador⁴⁰⁻⁴³.

Conforme o paradigma mais aceito, diferentes citocinas do tipo Th2, como interleucina-4 (IL-4), fator estimulador de colônias de granulócitos, interleucina-18 (IL-18), IL-11 - a rapamicina, e a secreção de IL-4 por células T *natural killer* (NK) 1.1 positivas podem reduzir a intensidade da DECH. Entretanto, os subtipos distintos Th1 e Th2 causam injúria aguda a órgãos alvo diferentes e alguns estudos não registraram efeito benéfico na evolução da DECH pela polarização da produção de citocinas na via Th2^{27,44-}

A terceira fase, fase efetora, é constituída por cascata complexa de múltiplos efetores celulares e inflamatórios que modulam suas respectivas respostas simultânea ou sucessivamente. Os mecanismos efetores da DECH aguda podem ser agrupados em celulares, como células T citotóxicas, e inflamatórios, como as citocinas. As quimiocinas que se expressam nos tecidos inflamados por estimulação de efetores, tais como as citocinas pró-inflamatórias, são, por sua vez, especializadas no recrutamento de células efectoras, tais como os linfócitos T citotóxicos²⁰. A agressão ao receptor em seus tecidos alvo ocorre por meio de interações Fas-Fas *ligand* (FasL), perforina-granzina B e pela produção de citocinas, com destaque para o FNT- α ⁵²⁻⁵⁴. Fas-FasL e perforina-granzina encontram-se envolvidos nos mecanismos que levam a apoptose das células dos tecidos alvo. A expressão de Fas e FasL encontra-se aumentada em células T do tipo CD8 e CD4 de doadores durante DECH agudo em humanos e animais e o nível sérico de frações solúveis dessas substâncias encontra-se aumentado nas formas mais graves de DECH⁵⁵. A expressão dessas substâncias pode se elevar em diversos tecidos, inclusive nos tecidos alvo da DECH aguda, conseqüência da ação de diversas citocinas proinflamatórias liberadas nas fases iniciais da DECH⁵⁵. Além do Fas-FasL, que pertencem à família do receptor de FNT e do FNT, vários outros membros dessa família podem estar implicados nos mecanismos de indução de apoptose existentes na DECH aguda²⁰. Entretanto, se determinadas vias que envolvem pares receptor/ligante distintos intermediam a atuação de subtipos específicos de linfócitos T em situações determinadas, não está ainda esclarecido²⁰. É provável que a DECH, além de ser modulada pela intensidade do condicionamento, conforme mencionado, pode também ser modulada pela ativação específica de determinados subtipos de linfócitos. Embora dados experimentais sugiram haver distinção entre vias de atividade citotóxica, com efeito em diferentes órgãos-alvo da DECH, a aplicação clínica dessas observações ainda não está definida²⁰.

Observa-se, enfim, que o FNT- α encontra-se implicado na terceira fase da DECH por meio de diversos mecanismos, incluindo indução de apoptose em tecidos alvo por meio dos receptores de FNT, ativação de macrófagos, neutrófilos, eosinófilos, linfócitos B e T, a estimulação de citocinas adicionais, IL-1, IL-6, IL-10, interleucina 12 (IL-12), e o próprio FNT, aumento da expressão de HLA e facilitação da lise de linfócitos. Níveis elevados de FNT correlacionam-se a aumento da incidência de DECH⁴.

A modulação do processo inflamatório em suas diversas etapas, desde ativação das células, produção e liberação de citocinas e ativação de mecanismos de morte celular, oferece diversas oportunidades de atuação na evolução e desfechos da DECH aguda.

3.2 O papel da suplementação de glutamina

3.2.1 Aspectos gerais

A idéia de que a suplementação de glutamina em doses suprafisiológicas pode ser benéfica sob determinadas condições clínicas, baseia-se em quatro aspectos mais importantes, geralmente bem aceitos e com razoável sustentação, embora, segundo alguns, carecendo ainda de evidências em seres humanos⁵⁶:

- trata-se de fonte energética essencial para o enterócito e células imunes e que não pode ser substituída por outros aminoácidos;
- durante períodos de estresse metabólico, existe um estado de deficiência relativa de glutamina, conforme evidenciado pela redução nos níveis plasmáticos da substância;
- a suplementação exógena do aminoácido permite enviar a glutamina aos tecidos em necessidade;

- a mucosa do intestino delgado torna-se atrófica quando ocorre deficiência em glutamina no organismo, assim como durante a nutrição parenteral total, na ausência de aporte nutricional digestivo;

Quando se examinam as alterações fisiopatológicas que ocorrem no paciente submetido a TCTH, tanto no trato digestivo, quanto no metabolismo, os quatro aspectos mencionados mostram-se potencialmente aplicáveis, tornando a glutamina alternativa atraente para a redução da morbidade nesses pacientes.

Apesar disso, até o presente momento, a literatura não parece apresentar resultados clínicos consistentes para justificar o uso rotineiro da glutamina em pacientes submetidos a TCTH, segundo Muscaritoli et al⁵⁷ porque "... parte dos estudos foi realizada em grupos de pacientes não homogêneos submetidos a transplante alogênico ou autólogo para tumores sólidos ou neoplasias hematológicas, o que torna a interpretação dos resultados bastante difícil. São necessários estudos adicionais que incluam grupos homogêneos de pacientes e avaliem possíveis diferenças exercidas pela via de administração da glutamina... ". Em face disso, deve-se examinar, em primeiro lugar, se os quatro aspectos mencionados se encontram calcados em bases bioquímicas e experimentais razoavelmente sólidas e se as evidências decorrentes de sua aplicação em situações clínicas e patologias diversas corroboram as hipóteses experimentais. Deve-se também avaliar as bases para sua aplicação clínica em transplante de medula e o papel da glutamina no TCTH a partir dos estudos clínicos existentes.

3.2.2 Aspectos históricos relacionados à glutamina

Isolada em 1883 do suco da beterraba por Schulze e Bosshard, a glutamina foi, posteriormente, encontrada com abundância na gliadina do trigo^{58,59}. Em 1935, Krebs⁶⁰ descreveu a síntese da glutamina a partir da amônia e do glutamato, usando rim de rato e de porcos da Índia. Estudos adicionais desse e de outros laboratórios demonstraram seu papel central na homeostase ácido-básica, seu uso como precursor de ácidos nucleicos e síntese de nucleotídeos, seu papel na síntese de amino-acúcares e sua importância singular no transporte de nitrogênio entre órgãos. Conforme apontado por Wilmore e Rombeau⁵⁸, Krebs observou que, embora, a maior parte dos aminoácidos tivessem múltiplas funções, a glutamina parecia o mais versátil deles.

Nos anos 50, Eagle et al⁶¹ descobriram que a glutamina era essencial para células de cultura em divisão, desde que o crescimento não ocorreria se o aminoácido fosse excluído do meio de cultura. Em 1974, Windmueller e Spaeth⁶² publicaram o primeiro de uma série de estudos altamente influentes nos quais demonstraram que aminoácidos, especialmente os não essenciais, exerciam um importante papel metabólico sobre o intestino. À época, realizaram a crucial observação de que o intestino remove até 25% do fluxo sistêmico de glutamina^{62,63}. Posteriormente, Windmueller e Spaeth⁶⁴ desenvolveram um segmento perfundido de intestino delgado com o objetivo de estudar a cinética de algumas drogas e observaram que esses segmentos não se mantinham com o uso de soluções de perfusão usuais, passando a desenvolver outros ensaios para determinar quais substratos eram essenciais para manter o metabolismo do intestino delgado. Demonstraram a partir desses estudos a importância relativa da glutamina em comparação à glicose, como substrato respiratório principal para intestino de ratos alimentados, o importante papel da glutamina, glutamato e do aspartato no metabolismo energético do intestino e a função metabólica do intestino delgado na conversão da

glutamina circulante e da glutamina, aspartato e glutamato dietéticos em precursores nitrogenados para a biosíntese de uréia e arginina.

Em relação ao papel do aminoácido no metabolismo das células imunes, não foi senão com os trabalhos pioneiros de Ardawi e Newsholme⁶⁵ e Newsholme⁶⁶, no início da década de 80, que se estabeleceu que linfócitos e macrófagos poderiam utilizar, além de glicose, glutamina em elevadas taxas.

A partir dos trabalhos de Windmueller e Spaeth^{62,64} ficou demonstrado que além de seu importante papel na geração de energia para o intestino, a glutamina era precursora de uma série de vias metabólicas importantes, especialmente aquelas que conduzem à síntese de ornitina, citrulina, prolina e arginina.

Entretanto, problemas técnicos geravam desafios importantes para os pesquisadores quando tentavam determinar as concentrações de glutamina nos tecidos, de tal forma que muitos dos estudos fundamentais realizados na última metade do século XX não conseguiram quantificar a glutamina nos tecidos e determinar sua importância como carreador de nitrogênio interórgãos, ou como substrato específico de um órgão⁵⁸.

Somente quando protocolos foram desenvolvidos para determinar com precisão suas concentrações nos fluídos e tecidos orgânicos, a importância do aminoácido na bioquímica nutricional e metabolismo integrativo começou a ser avaliada^{58,67}.

Desde então, as informações publicadas sobre glutamina começaram a crescer exponencialmente. Estudiosos têm mencionado sua importância em diversas áreas, incluindo a síntese protéica da musculatura esquelética, estrutura e função dos intestinos, regulação do metabolismo da glicose, metabolismo antioxidante e melhora da função imune. Há mais de duas décadas, estudos clínicos e pré-clínicos têm buscado dar suporte ao conceito de que a suplementação de glutamina deve ser benéfica para seres humanos com doenças do trato digestivo, ou doenças sistêmicas, quando em estresse agudo.

3.2.3 Papel e mecanismos de ação da glutamina

A glutamina é o aminoácido livre mais abundante do organismo, perfazendo cerca de 60% do aminoácido livre intracelular no músculo esquelético e, juntamente com glutamato e alanina, perfaz cerca de 80 % do *pool* de aminoácidos que podem ser incorporados em proteínas nos seres humanos^{11,68,69}. Trata-se do principal transportador de grupos amina na circulação, cumprindo importante papel no fluxo de nitrogênio do músculo para a região esplâncnica e sistema imune em donças graves. Tanto a glutamina quanto o glutamato, podem ser transportados para dentro das células por vários mecanismos⁵⁶.

A glutamina é rápida e extensamente metabolizada em glutamato que, por sua vez, entra no ciclo de Krebs para ser metabolizado a alfa-cetoglutarato. O aspartato também entra no ciclo de Krebs para produzir oxalacetato. As duas vias metabólicas constituem, dessa forma as duas substâncias como principal fonte de energia para as células do intestino delgado⁵⁶.

Durante doenças graves, hipermetabólicas, tanto os níveis plasmáticos quanto os tissulares do aminoácido podem se encontrar reduzidos, pois sua produção endógena pode não ser suficiente para fazer face ao aumento das necessidades. Dessa forma, redução de até 50% de seus níveis pode ser observada nesses quadros^{13,70,71}. Assim, pela sua abundância, importância metabólica e pela redução significativa de seus níveis em doenças graves, a glutamina, apesar de sintetizada em grande quantidade pelo corpo humano em situações normais, tem sido considerada “condicionalmente essencial” nas situações de grande estresse metabólico⁷¹⁻⁷⁶. Os níveis de glutamina plasmática têm se mostrado significativamente reduzidos em pacientes com queimaduras extensas no grande trauma e em uma coorte heterogênea de pacientes submetidos a cuidados

intensivos^{68,77,78}. Ocorre também redução dos níveis de glutamina livres no músculo, principal fonte em pacientes com doenças graves⁷⁸.

Além desta redução dos níveis séricos largamente demonstrada em vários tipos de pacientes submetidos a terapia intensiva, Oudemans-van Straten et al⁷⁹ estabeleceram correlação significativa entre baixos níveis plasmáticos de glutamina obtidos até 24 horas após a admissão e mortalidade hospitalar mais elevada, mesmo após ajuste para o escore APACHE II (Acute Physiology and Chronic Health Evaluation).

A qualificação da glutamina como aminoácido “condicionalmente essencial”, embora largamente difundida na literatura, foi questionada por Alpers⁵⁶. O autor admite, entretanto, que os dados existentes indicam que tanto glutamina quanto glutamato são fontes importantes de energia para uma variedade de células e a glutamina pode ser um importante transportador de nitrogênio no organismo, particularmente em situações de estresse metabólico. Não há também dúvida de que glutamato e glutamina sejam, em geral, elos fundamentais entre o metabolismo do carbono e do nitrogênio em mamíferos, e entre o metabolismo do carbono de carboidratos e proteínas, em particular⁸⁰.

3.2.3.1 Papel da glutamina: mucosa intestinal

O questionamento quanto à “essencialidade condicional” da glutamina fundamenta-se, entre outras razões, no fato de que, embora o aminoácido seja mais utilizado do que o glutamato por alguns tecidos, incluindo o intestino, essa diferença em tecidos de animais maiores não é a mesma que aquela originalmente prevista a partir de estudos em ratos^{58,63}. Em ratos, observou-se que a adição de glutamina a preparações de intestino isolado ocasionou produção duas vezes mais elevada de CO₂ e entrada três vezes maior de carbono no ciclo do ácido cítrico do que quando se adicionou glutamato^{58,63}. Coincidentemente, os estudos cujos resultados demonstram maior efeito protetor da

glutamina sobre a mucosa intestinal submetida a injúria experimental, são aqueles realizados em ratos.

A situação é um pouco diferente quanto se avalia animais maiores ou humanos. Em suínos, o glutamato luminal é extraído quase totalmente (96%) em primeira passagem pelo intestino e a glutamina arterial removida pelas vísceras drenadas pelo sistema porta. Em porcos jovens alimentados, a glutamina e o glutamato derivam quase que totalmente de síntese *de novo*. O glutamato luminal é extraído à taxa de 95% pelo intestino humano, mais elevada que a taxa da glutamina, cuja extração atinge 64%^{58,63,80}.

O metabolismo da glutamina segue, basicamente, duas vias. Na primeira, o nitrogênio derivado do grupo amida é utilizado na síntese de purinas, pirimidinas e aminoácúcares. Na segunda, a cadeia de carbono e o grupo alfa-amino entram na via que leva à síntese de outros aminoácidos, especialmente prolina, ornitina e arginina. Esta divisão bioquímica do seu metabolismo também reflete sua compartimentação intracelular, já que a primeira via corresponde a uma atividade citoplasmática, ao passo que o metabolismo do esqueleto de carbono, iniciado pela deamidação processada pela glutaminase, é dependente de fosfato existente na mitocôndria. O metabolismo do grupo amida sugere papel fundamental da glutamina na atividade proliferativa e secretória das células intestinais, resultado da síntese de ácidos nucléicos e da glicolização da mucina. Por outro lado, como a utilização do esqueleto de carbono envolve a conversão inicial do aminoácido a glutamato e amônia livre, questiona-se até que ponto a utilização da glutamina pela mucosa intestinal e outros tecidos é, na verdade, função da necessária oxidação do glutamato⁶³.

Não há dados *in vivo* que permitam assegurar a necessidade obrigatória de nitrogênio derivado de grupos amida da glutamina para a saúde da mucosa. Embora já se tenha demonstrado que a ausência de glutamina em linhagens de células intestinais

isoladas inibe sua proliferação de forma substancial, há evidências de que, com respeito à manutenção da massa celular da mucosa intestinal e à sua proliferação, o glutamato é tão eficaz quanto a glutamina⁶³. Além disso, como mencionado, as vias de metabolismo intermediário da célula da mucosa intestinal que utilizam o esqueleto de carbono da glutamina, podem usar de forma semelhante o glutamato. Na verdade, parece que a prolina é mais efetiva na síntese de ornitina, arginina e poliaminas que glutamina ou glutamato. O mesmo se aplica à efetividade do glutamato como precursor da síntese de glutathione pela mucosa⁶³.

Dessa forma, especificamente em relação ao intestino, a importância das duas substâncias é reconhecida, mas não se pode dizer se o papel da glutamina é específico da substância ou secundário ao metabólito glutamato. À partir do conhecimento de que a utilização do esqueleto de carbono da glutamina pela célula da mucosa intestinal envolve sua conversão inicial em glutamato e amônia livre, duas questões importantes precisam ser esclarecidas a fim de se definir a essencialidade da glutamina para o enterócito: 1) até que ponto o elevado índice de oxidação da glutamina é secundário à necessária oxidação do glutamato derivado da deamidação da glutamina, e 2) em qual extensão o glutamato substitui a glutamina nas vias que envolvem a utilização de cadeias de carbono e de moléculas amino⁶³.

A extração da glutamina pelas vísceras irrigadas pela artéria mesentérica, é da ordem de 22%, dobro da extração global de 11%. Sabe-se também que a glutamina arterial contribui com cerca de 15% do CO₂ produzido pelas vísceras drenadas pelo sistema porta. Por outro lado, 95% do glutamato oferecido pela via enteral é utilizado pela mucosa, contra 11% do glutamato que chega pela via arterial. Além disso, 36% do CO₂ produzido pelas vísceras drenadas pelo sistema porta deriva do glutamato enteral, contra os já mencionados 15% derivados da glutamina arterial. Estas e outras observações

sugerem que o glutamato oferecido pela via enteral pode ser um substrato para oxidação na mucosa intestinal mais importante que glutamina ou glicose⁸⁰.

Opinião dos estudiosos indica que a glutamina serve a algum papel específico no intestino, mas não como substrato energético necessariamente preferencial, e que o glutamato pode exercer algumas das funções atribuídas à glutamina. Apontam também que a deficiência de glutamato pode resultar em prejuízo para o crescimento do intestino. Especula-se que a ação da glutamina é sutil, provavelmente relacionada à síntese de amino-açúcares e a algum papel regulador. Apesar de poucos estudos que comparam glutamato e glutamina, parece haver alguma vantagem do glutamato na síntese da mucina e na manutenção da mucosa intestinal⁸¹. Reeds e Burrin⁶³ destacaram que a idéia de um papel regulatório da glutamina sobre a mucosa intestinal, deriva de observações que demonstraram que a glutamina ativa enzimas líticas reconhecidamente envolvidas com a regulação do ciclo celular e que o metabolismo da glutamina parece necessário para essa atividade regulatória. Quanto aos amino-açúcares, supõe-se que esses atuariam na síntese de componentes da matriz extracelular, ensejando efeito benéfico na manutenção da estrutura da mucosa, especialmente na estrutura das junções firmes. Além disso, por se tratar de um potencial precursor para a síntese de N-acetilglicosamina e N-acetilgalactosamina, componentes da mucina, poderia exercer efeito na manutenção da barreira passiva aos microorganismos⁶³.

Outra questão importante para esclarecer o papel da glutamina sobre as células da mucosa refere-se à maneira como captam a glutamina. *In vivo*, a glutamina oriunda da corrente sanguínea é captada pela membrana basal lateral, enquanto a glutamina luminal alcança o interior da célula através da borda em escova. Em situação de indisponibilidade de nutrientes no intestino, o aporte da glutamina se daria predominantemente pelo sangue, através da membrana basal lateral. Há dois tipos de glutaminase no enterócito,

uma independente de fosfato, que se encontra na borda em escova e outra, já mencionada, dependente do fosfato, que se encontra na mitocôndria. Esta última pode ser mais importante para o metabolismo da glutamina em determinadas circunstâncias, *in vivo*. Dessa maneira, a utilização da glutamina poderia não ser muito dependente de sua disponibilidade no lúmen intestinal, desde que a função da glutaminase mitocondrial estivesse preservada e desde que houvesse suficiente aporte arterial do aminoácido⁸². Como o papel da glutamina é tido como importante em situações de doença e estresse metabólico, esses aspectos de seu metabolismo devem ser também examinados nesse grupo de pacientes.

Com referência ao metabolismo de glutamina pelas células intestinais em situações de estresse metabólico, os resultados não são conclusivos. Vários estudos demonstraram redução significativa da utilização e/ou captação da glutamina pelo intestino em sepse ou infusão de endotoxina experimentais⁸³. Austgen et al⁸⁴ demonstraram redução da captação do aminoácido pelo intestino em ratos submetidos a infusão de endotoxina. Essa observação encontrava-se associada à redução do transporte luminal da glutamina e da atividade da glutaminase da mucosa. O lipopolissacáride resultou em redução do transporte da glutamina através da borda em escova em ratos submetidos a tratamento com endotoxina e em humanos sépticos^{82,85}. Salloum et al⁸² especulam que essas alterações podem ocorrer devido à redução da síntese do transportador ou aumento do catabolismo do carreador do aminoácido. Os autores observam ainda que, ao contrário do que ocorre com o intestino, redução da atividade intrínseca de transporte da glutamina não ocorre nos hepatócitos de ratos tratados com endotoxina e que a síntese do carreador de glutamina no pulmão se encontra aumentada na endotoxemia. Salloum et al⁸² levantam a possibilidade de que o intestino se torne subserviente às necessidades de outros órgão, como parte de processo de repriorização da síntese protéica em estados de

estresse metabólico. Os autores destacam que a importância dessas observações é a possibilidade de estimulação do transporte e uso desses substratos através de sua oferta, como tem sido especulado por meio de extensa literatura sobre o papel do intestino em pacientes graves em estresse^{74,82}.

Alguns trabalhos geraram observações discordantes com aquelas de Austgen et al⁸⁴ quanto ao comportamento do enterócito no metabolismo da glutamina. Dudrick et al⁸⁶ observaram que a atividade de transporte da glutamina na borda em escova encontra-se aumentada após quatro horas do estímulo com endotoxina, mas que o transporte da glutamina arterial pela membrana basal-lateral encontra-se reduzido. Nose et al⁸³, em estudo sobre o uso da glutamina em sepse induzida pela ligação do ceco em ratos, observaram que a captação e a utilização da glutamina podem depender do estágio da sepse, aumentada nas fases iniciais, mas reduzida tardiamente. Sugere também que as alterações de captação do aminoácido podem estar relacionadas aos níveis de glutaminase e que, embora tenha havido demonstração experimental de aumento da atividade da glutaminase com a suplementação de glutamina, seu estudo não corroborou esse achado^{83,87}.

Outras observações apontam aumento de captação de glutamina em animais submetidos à terapêutica com esteróides e pós-operados⁸⁸. No entanto, tratamento com IL-1 diminui a captação intestinal de glutamina, ao passo que a atividade da glutaminase de linfócitos de linfonodos mesentéricos encontra-se aumentada em ratos sépticos^{84,89}. Karinch et al⁹⁰ observam que a utilização de glutamina por linfócitos em proliferação é 10 vezes maior que outras células em repouso e que, em consequência, a redução de captação de glutamina pelo intestino na sepse ocorreria primariamente nas células da mucosa, em oposição aos tecidos linfáticos, que consumiriam mais glutamina em situações de estresse. Estas observações sugerem que condições clínicas diferentes e

diferentes tecidos podem ensejar comportamentos diversos no transporte do aminoácido e na disponibilidade de glutaminase.

Novak et al⁷⁶ sugerem que a via parenteral é responsável por melhores desfechos que a via digestiva para a suplementação de glutamina, conforme observado em metanálise. Essa superioridade pode estar relacionada às doses ministradas ou aos aspectos relacionados à captação e metabolismo pelo enterócito. Não se pode descartar, entretanto, que eventuais efeitos benéficos possam encontrar-se localizados em outros pontos do metabolismo, conforme procuraremos discutir. Em parte, a baixa dosagem obtida pela via enteral, relaciona-se à conhecida dificuldade de uso de nutrição enteral em pacientes graves. Recentemente, sugeriu-se que o uso de grânulos de glutamina por via enteral poderia oferecer resultados próximos aos obtidos com a via parenteral⁹¹.

O uso da glutamina por via parenteral resulta em níveis circulantes mais elevados do aminoácido e melhora do balanço nitrogenado, embora com resultados clínicos ainda controversos. Por outro lado, a glutamina enteral raramente permite obter aumento do nível circulante ou algum efeito sobre o balanço nitrogenado, mas resulta em melhora de aspectos da patologia do intestino delgado. Entretanto, tal melhora é observada principalmente em modelos animais⁹².

Depois desse sumário dos estudos experimentais, por um lado observa-se que vários demonstram efeitos benéficos da glutamina sobre a morfologia da mucosa e sua função de barreira, mas o mesmo não acontece em voluntários sadios e em populações de pacientes. Autores diversos freqüentemente assinalam que estudos em roedores demonstram efeitos da suplementação de glutamina consideravelmente maiores do que em humanos⁹³⁻⁹⁵.

Van der Hulst et al⁹⁶, em estudo clássico, avaliaram inicialmente que o fornecimento de solução de nutrição parenteral, enriquecida com glutamina, a pacientes

com doenças do aparelho digestivo, permitia que a função de barreira estudada pela permeabilidade intestinal, e a morfologia da mucosa intestinal observada por biópsia, se mantivessem inalteradas ao longo do experimento, enquanto os pacientes que usaram nutrição parenteral padrão sem glutamina, apresentaram piora desses parâmetros.

Posteriormente, como o grupo de pesquisadores permaneceram em dúvida quanto à semelhança das condições basais dos pacientes submetidos ao experimento, o estudo foi repetido em pacientes desnutridos, internados com doenças do aparelho digestivo, mas desta vez procurando-se maior homogeneidade das condições basais das amostras dos grupos com e sem glutamina. Para tal, os pacientes foram submetidos a período de estabilização, no qual permaneceram em dieta parenteral hipocalórica, com cerca de 50% das necessidades calóricas e sem glutamina, por período de cerca de 40 horas, acrescido do período necessário para a realização de diversas medidas, incluindo biópsia duodenal, permeabilidade intestinal e dosagem de glutamina plasmática. Os pacientes que apresentavam sinais clínicos de estresse metabólico mais grave, como febre, hipotermia, evidência de sepse ou abscesso intrabdominal, foram excluídos do estudo.

Não foram observados efeitos da adição da glutamina à nutrição parenteral em relação à morfologia da mucosa, incluindo avaliação de alterações inflamatórias da lâmina própria, bem como em relação à permeabilidade intestinal, que permaneceu inalterada. Os níveis de glutamina também não foram afetados, embora estivessem na faixa da normalidade para ambos os grupos ao início. Nesse estudo foram observados valores de permeabilidade “extremamente anormais” em paciente com câncer, fato considerado sem explicação⁹³.

Como na pesquisa inicial havia maior número de pacientes com inflamação ativa do que o estudo mais recente, os autores decidiram levar a cabo um terceiro experimento no sentido de avaliar o papel do processo inflamatório nos níveis de glutamina, nas

medidas de permeabilidade e na morfologia da mucosa⁹⁷. Este estudo não envolveu intervenção com glutamina e, ao contrário do último, incluiu pacientes com inflamação sistêmica. Observaram então que, embora as medidas antropométricas não se correlacionassem com os níveis plasmáticos de glutamina, estes se encontravam significativamente reduzidos em pacientes com sinais de atividade inflamatória, assim como os níveis do aminoácido na mucosa intestinal. As medidas de permeabilidade intestinal encontravam-se significativamente mais elevadas nos pacientes com sinais de atividade inflamatória, mas não foram afetadas pela presença de desnutrição isoladamente. Em contraste com os outros parâmetros, a morfologia da mucosa não foi afetada pela presença de atividade inflamatória.

Assim, os autores concluem que a desnutrição isoladamente pode não afetar a cinética da glutamina, ao contrário do que ocorre na vigência de inflamação ativa. Dessa maneira, a suplementação da glutamina seria benéfica nas condições em que as alterações na cinética do aminoácido decorrem de alterações metabólicas secundárias à inflamação sistêmica. Não obstante, não ficou claro o papel do intestino nesse processo, mas permaneceu a sugestão de que a oferta de glutamina não deve afetar a mucosa intestinal de pacientes que se encontram apenas desnutridos, sem inflamação ativa, ao contrário do que ocorre experimentalmente em roedores⁹⁷.

Em resumo, os dados reunidos dos três estudos parecem indicar que a glutamina poderia afetar positivamente as medidas da permeabilidade intestinal em pacientes com atividade inflamatória, mas não se pode dizer de maneira segura que o acréscimo de glutamina teria algum efeito sobre a função de barreira avaliada pela medida de permeabilidade intestinal, que foi correlacionada com a existência de inflamação. Esse efeito, caso ocorresse, poderia se manifestar nos aspectos funcionais da mucosa, mas não necessariamente morfológicos, como sugere o estudo, questão que procuraremos

comentar adiante. Essa distinção entre alterações da barreira medidas pela permeabilidade e alterações morfológicas da mucosa é de importância fundamental.

As alterações morfológicas da mucosa intestinal com o jejum prolongado, nutrição parenteral ou doenças graves em humanos, são muito mais sutis ou difíceis de se demonstrar do que aquelas que ocorrem em roedores. Da mesma forma, o papel da glutamina na preservação da morfologia da mucosa é muito mais facilmente demonstrável em roedores do que em humanos. Apesar do trabalho inicial de Van der Hulst e colaboradores⁹⁶ ter demonstrado maior preservação da mucosa nos pacientes que fizeram uso da glutamina, a diferença no tamanho das vilosidades entre os dois grupos foi pequena. No grupo que fez uso de glutamina a altura das vilosidades foi, em média, de 474 μ ao início do estudo e de 450 μ ao término (NS), ao passo que no grupo controle foi de 450 μ e de 435 μ ao término ($p < 0,05$).

Buchman et al⁹⁸ observaram que alterações morfológicas e funcionais da mucosa intestinal que ocorreram em um grupo de voluntários submetidos à nutrição parenteral como única fonte de nutrição, ocorreram na ausência de alterações dos níveis de glutamina. Em artigo de revisão subsequente, ao mencionar os achados de seu estudo, o autor comenta que suas observações “lançam dúvida sobre a teoria de que a deficiência de glutamina é a única responsável pelas alterações morfológicas e funcionais que ocorrem em humanos durante a nutrição parenteral”⁹⁵.

Alterações de permeabilidade intestinal podem ocorrer na ausência de alterações morfológicas importantes, conforme demonstraram Hulsewé et al⁹⁷. Cabe, portanto, avaliar se a glutamina exerce algum papel sobre a barreira mucosa, independente de eventuais efeitos sobre sua morfologia.

Jiang et al⁹⁹ mostraram que o uso de nutrição parenteral enriquecida com glutamina reduziu significativamente a intensidade do aumento da permeabilidade

intestinal em pacientes submetidos a cirurgias abdominais de maior porte. Zhou et al¹⁰⁰ obtiveram resultados semelhantes em pacientes queimados, com o uso de nutrição enteral suplementada com glutamina. Peng et al⁹¹ obtiveram redução das alterações de permeabilidade em pacientes queimados que fizeram uso de glutamina em grânulos por via entérica. Estes dados parecem indicar que efeito positivo da glutamina sobre as medidas de permeabilidade intestinal pode ocorrer no grupo de pacientes com doenças graves, estressados, mas não na ausência de estresse agudo. Pacientes com elevações da permeabilidade de caráter crônico, portadores de doenças como AIDS e doença de Crohn, não apresentaram o mesmo efeito com o uso da glutamina¹⁰¹⁻¹⁰³. Entretanto, os estudos nesse grupo de pacientes foram realizados com glutamina oral. Assim, esses dados parecem apontar para efeito benéfico da glutamina sobre a barreira mucosa intestinal de pacientes submetidos a estresse agudo, em atividade inflamatória, que poderia ser caracterizado como funcional, sem referência à manutenção da integridade da mucosa, avaliada do ponto de vista morfológico.

As observações enumeradas sugerem que as alterações da barreira mucosa intestinal não podem ser explicadas a partir de modificações morfológicas secundárias a deficiência de glutamina e de conseqüente “desnutrição” da mucosa. Outros mecanismos devem ser invocados para explicar efeitos benéficos e protetores do aminoácido.

Alterações da barreira mucosa são desencadeadas por vários distúrbios, sobre os quais a glutamina poderia exercer efeito protetor ou regulador. São eles o estresse oxidativo e aumento da produção de óxido nítrico e derivados, liberação de citocinas inflamatórias, hipóxia e redução do pH, todos provavelmente interrelacionados.

Embora o significado clínico da translocação microbiana e do aumento da permeabilidade intestinal em humanos não esteja ainda determinado, acredita-se que a ruptura da barreira mucosa relacionada a esses distúrbios esteja implicada na

manutenção da atividade inflamatória nos estados de estresse metabólico que resultam em falência de múltiplos órgãos⁹⁵.

Nessas situações, apesar do aumento das necessidades de oxigênio pela mucosa decorrente do aumento do metabolismo, paradoxalmente, sua disponibilidade encontra-se reduzida por razões hemodinâmicas, ou por redução de sua extração. Ocorre então, glicólise anaeróbica, com redução de ATP e acidose intracelular, fatores predisponentes a aumento de permeabilidade da mucosa¹⁰¹. Devido ao mecanismo de contracorrente a que se encontra submetido o fluxo sanguíneo da mucosa intestinal, esta é particularmente sensível à isquemia por redução do fluxo esplâncnico que ocorre em diversas condições graves como traumas, choque, cirurgia cardíaca e aórtica¹⁰⁴. A injúria à mucosa pode ser agravada pelo tratamento dessas condições que, ao permitir o retorno do fluxo sanguíneo aos órgãos isquêmicos, enseja a formação de metabólitos reativos de oxigênio pela ativação da via da xantina-oxidase e se acompanha de um excesso de polimorfonucleares ativados no próprio trato digestivo^{101,104}.

Distúrbios circulatórios adicionais são causados pela lesão endotelial e ativação de neutrófilos, contribuindo para a continuidade desse processo e das alterações de permeabilidade intestinal. As junções firmes, particularmente sensíveis a essas alterações, constituem-se em importante ponto de ruptura da barreira mucosa¹⁰¹.

O papel das citocinas nessas circunstâncias é também reconhecido. Seu efeito é potencializado na presença de ambiente ácido e pelas espécies reativas de oxigênio. Outros oxidantes potentes aí formados pelo metabolismo do óxido nítrico danificam o DNA celular e promovem peroxidação dos lipídeos das membranas celulares, oxidação de moléculas essenciais, inativação da aconitase mitocondrial e regulação para baixo de diversas proteínas chave para a função das junções firmes¹⁰¹.

Sabe-se que a síntese de glutathione na mucosa intestinal é muito elevada. Esta substância, produto do metabolismo da glutamina e do glutamato, participa na detoxificação de xenobióticos e é muito eficiente na neutralização de radicais livres de oxigênio, protegendo as células contra compostos reativos de oxigênio. Ao efetuar a redução de peróxidos, a glutathione não somente protege as membranas celulares do dano oxidativo causado por essas substâncias, mas também ajuda a manter o grupo sulfidril de diversas proteínas na forma reduzida, fato necessário para manter sua função e permitir assim, a modulação da atividade de diversas enzimas. A glutathione encontra-se envolvida na síntese de DNA e proteínas e tem importante papel na resposta inflamatória e resposta do sistema imune a infecções. Encontra-se envolvida na síntese de leucotrienos e é necessária para proliferação de linfócitos, para a citotoxicidade mediada por células e por anticorpos e para a proteção de linfócitos contra superóxidos produzidos por células T, em sua função de destruição de patógenos^{105,106}. A depleção da glutathione em nível sistêmico é encontrada em diversas situações de inflamação, o que leva à suposição de que isto ocorra por aumento de seu consumo. Estudo realizado em suínos demonstrou redução da síntese de glutathione na mucosa intestinal quando os animais foram submetidos a desnutrição e inflamação¹⁰⁷. A glutamina, pela via do glutamato, cisteína e glicina, pode ser considerada o aminoácido precursor da glutathione, que se apresenta na célula nas suas formas reduzida e oxidada. A razão glutathione reduzida/glutathione oxidada é a maior responsável pela regulação do potencial de oxirredução da célula e se relaciona com a concentração de seus precursores, entre eles a glutamina, e a atividade da peroxidase e redutase da glutathione. Deduz-se, portanto, possível papel do glutamato e da glutamina na manutenção do potencial de oxirredução nas células da mucosa intestinal.

Estudos que avaliaram o papel da glutamina em situações experimentais de isquemia/reperfusão, mostraram resultados contraditórios, com aumento da sobrevivência ou redução marcante da mesma^{108,109}. O momento da aplicação da substância diferiu nos dois estudos, sendo que no primeiro seu uso ocorreu ao longo dos cinco dias que antecederam ao procedimento que levou à isquemia e no segundo, logo após a indução da isquemia. Sugere-se que, no que tange à lesão do tipo isquemia/reperfusão, o momento do uso da glutamina é importante na busca de seu efeito protetor.

A revisão da literatura não permite concluir se existe algum papel específico da glutamina sobre o enterócito de seres humanos, bem como um mecanismo principal que explique seus eventuais efeitos sobre a barreira mucosa.

Tais elementos poderiam ocorrer de formas mais sutis, ou então serem exercidos em outros pontos da barreira, que não as células da mucosa propriamente ditas, conforme procuraremos discutir adiante. De qualquer maneira, a idéia de que o problema da barreira mucosa localiza-se unicamente na desnutrição do enterócito, a ser resolvido pela oferta de substratos aos intestinos como forma de estimular o metabolismo celular e o trofismo da mucosa, parece se constituir em simplificação em relação ao papel dos diversos constituintes da barreira mucosa e em relação aos efeitos potenciais da glutamina.

Dessa forma, seria importante interrogar sobre outros aspectos da ação da glutamina responsáveis por seus possíveis efeitos benéficos.

3.2.3.2 Papel da glutamina: sistema imunológico

Outro ponto importante da ação da glutamina para buscar explicar seus efeitos benéficos é o sistema imunológico.

Sabe-se que a glutamina é usada em elevadas taxas por células isoladas do sistema imune, tais como linfócitos, macrófagos e neutrófilos¹¹⁰. Embora a atividade da enzima responsável pelo metabolismo do aminoácido, a glutaminase, possua níveis elevados nessas células, as taxas de oxidação da glutamina são baixas. Boa parte da glutamina é convertida a glutamato, aspartato (pela via do ácido tricarboxílico), lactato e CO₂.

Em relação aos linfócitos T, a concentração extracelular *in vitro* de glutamina encontra-se em proporção direta com sua proliferação, assim como a produção de interleucina 2 (IL2) e a expressão de seus receptores¹¹⁰. A diferenciação de linfócitos B em células de síntese e secretoras, *in vitro*, é dependente de glutamina e aumenta significativamente à medida do aumento das concentrações fisiológicas do aminoácido¹¹¹. Observou-se que a deficiência de glutamina limitava o número de células LAK (*Lymphokine-Activated Killer cells*) geradas em resposta a estímulo imunológico¹¹². Em relação aos macrófagos, a redução da disponibilidade de glutamina afetou a expressão de antígenos maiores de histocompatibilidade associados à função de apresentação de antígenos aos linfócitos, assim como a apresentação de antígenos induzida pelo toxóide tetânico. Observou-se também redução da fagocitose de bactérias opsonizadas, células de fungo não opsonizadas e hemácias de carneiro opsonizadas^{113-115,117}.

Sabe-se também que a ativação de macrófagos *in vivo*, através da exposição ao bacilo Calmette-Guerin, ou *in vitro*, através da exposição à endotoxina, leva a aumento significativo da utilização de glutamina. Explicação possível para as necessidades aumentadas de glutamina pode ser encontrada na elevada necessidade de arginina, metabólito da glutamina, pelos macrófagos ativados, aliadas à impossibilidade de utilização da arginina extracelular, devido à elevada taxa de secreção da arginase por células nas condições experimentais mencionadas^{66,116}. As concentrações do óxido

nítrico, da qual a arginina é precursora, encontram paralelismo com os níveis de utilização da glutamina em meio de cultura onde macrófagos são cultivados na ausência de arginina⁶⁶.

Vários autores demonstraram aumento da produção de citocinas – IL1 β , IL6 e FNT α – em modelos de macrófagos de murídeos expostos ao lipopolissacáride, em resposta a maior disponibilidade da glutamina, assim também como produção de IL-8 por macrófagos humanos^{115,117-119}.

A glutamina, juntamente com a glicose, constitui-se em importante fonte energética no metabolismo de macrófagos, avaliado pela produção de ATP e consumo de O₂⁶⁶.

Neutrófilos e monócitos humanos, *in vitro*, podem responder à adição de glutamina ao meio de cultura com aumento de sua atividade fagocitária e taxa de produção de superóxido, de forma dose-dependente. A melhora da função fagocitária ocorreu de forma mais intensa no sangue de pacientes com maior atividade inflamatória e menores níveis de glutamina¹²⁰. A capacidade bactericida de neutrófilos humanos retirados de pacientes pós-operados é aumentada pela glutamina¹²¹. Pithon-Curi et al¹²² investigaram o efeito da suplementação de glutamina na apoptose espontânea de neutrófilos e na sua capacidade fagocítica, tanto em ratos quanto em seres humanos. Seus resultados mostraram um retardamento no processo de apoptose em neutrófilos de ambas espécies, além de melhor função mitocondrial e maior capacidade fagocitária para *E. coli*, quando incubados com glutamina. Especularam que os efeitos da glutamina na apoptose pudessem estar relacionados aos efeitos antioxidantes da glutathione.

Pode-se indagar porque a glutaminólise, via incompleta e relativamente ineficiente de oxidação da glutamina, assim como a glicólise anaeróbia relativamente à glicose, ocorre em elevadas taxas em células do sistema imune. Newsholme⁶⁶ sugere que a produção do NADPH é via comum a partir da qual diversas funções importantes podem

ocorrer: fornecimento de amônia e aspartato para síntese de purinas e pirimidinas para linfócitos em replicação, manutenção da atividade secretória e da síntese protéica de células inflamatórias e produção de espécies reativas de oxigênio, superóxido e óxido nítrico. Esta produção de NADPH pode ocorrer tanto por oxidação incompleta via glutaminólise, quanto por oxidação completa, esta, em macrófagos. A glicose poderia também responder por essa produção, mas quando há fagocitose ou pinocitose ativa, o carbono da glicose pode ser desviado para produção de lipídeos, comprometendo a via das pentoses.

A provisão de glutamina a animais em modelos de infecção experimental estimulou significativamente a proliferação de linfócitos do sangue e a proliferação *in vitro* de linfócitos sanguíneos estimulados com mitógenos^{123,124}. Camundongos submetidos a inoculação do vírus influenza e que receberam glutamina parenteral, conseguiram manter a produção de linfócitos a partir da placa de Peyer, assim como a integridade intestinal¹²⁵.

Ziegler et al¹²⁶ estudaram linfócitos circulantes e subtipos de linfócitos em pacientes submetidos a transplante de medula e observaram que o grupo tratado com glutamina apresentava maior percentual de linfócitos após a pega do enxerto. Estudos de citometria de fluxo realizados uma a duas semanas após a alta mostraram que as concentrações de linfócitos no sangue encontravam-se aumentadas, particularmente na população de linfócitos T, sendo que linfócitos B e células tipo *natural killer*, não mostraram diferenças. A glutamina afetou positivamente tanto linfócitos CD4 quanto CD8.

Pacientes pós-operados que receberam glutamina parenteral apresentaram aumento de síntese de DNA pelos linfócitos T, em comparação aos que receberam nutrição parenteral sem glutamina, embora não tenha ocorrido diferença quanto à produção de citocinas¹²⁷. Outro estudo em pacientes cirúrgicos submetidos a nutrição parenteral, mostrou número significativamente maior de linfócitos T e linfócitos CD4

medido por citometria de fluxo em pacientes cirúrgicos que usaram dipeptídeo de glutamina. Não houve diferença quanto aos desfechos primários¹²⁸.

A par do papel da glutamina na proliferação das células inflamatórias, imunoestimulador portanto, vários estudos sugerem papel imunomodulador e antiinflamatório, tanto em nível sistêmico, quanto local, no intestino.

A atribuição desse papel antiinflamatório exclusivamente a uma função protetora específica exercida pela glutamina sobre a barreira mucosa intestinal, impeditiva à passagem de organismos e substâncias desencadeadoras de resposta inflamatória, não pode ser suficientemente demonstrada, em face da a incerteza sobre a essencialidade da glutamina em relação às funções proliferativa e secretória da mucosa, conforme já comentado. Por outro lado, diversos estudos indicam a possibilidade de um efeito imunomodulador da glutamina, em decorrência de sua ação sobre as células inflamatórias do intestino¹²⁹.

Quanto a este aspecto, o impacto da via e do tipo de nutrição sobre a imunidade da mucosa tem sido objeto de grande interesse^{130,131}. Cinquenta por cento da imunidade total do organismo reside na lâmina própria dos tratos digestivo e respiratório e as interações que ocorrem no intestino entre antígenos, anticorpos, principalmente IgA secretória, linfócitos e citocinas são variadas e multifacetadas. O tecido linfóide associado ao intestino detém importante papel na função de barreira da mucosa intestinal, prevenindo os efeitos danosos da passagem de bactérias da luz intestinal para a corrente sanguínea. Cerca de um quarto da mucosa é constituída pelo tecido linfóide associado ao intestino, conhecido como GALT (*Gut Associated Lymphoid Tissue*), constituído por linfócitos intraepiteliais, da lâmina própria, das placas de Peyer e dos linfonodos mesentéricos.

Macrófagos e polimorfonucleares constituem a primeira linha de defesa na eliminação de bactérias nos estágios iniciais de infecções peritoneais. Seu acúmulo é

mediado por células B e T e citocinas no GALT. Recente estudo que investigou a capacidade funcional e de exsudação de neutrófilos polimorfonucleares em peritonite experimental, sugeriu a possibilidade de que a glutamina melhora a funcionalidade do GALT. A exsudação de polimorfonucleares e macrófagos e a quantidade total de células peritoneais foi significativamente menor no grupo de ratos submetidos à nutrição parenteral sem glutamina, quando comparado ao grupo de nutrição parenteral com glutamina e o grupo controle que recebeu ração. O grupo que recebeu nutrição parenteral não suplementada expressou fagocitose de polimorfonucleares do peritônio menos intensa em relação ao grupo suplementado com glutamina e o grupo controle que recebeu ração¹³².

O papel da glutamina nas interações entre imunidade e intestino foi sugerido também por estudos que demonstraram preservação dos níveis de IgA intestinal e extraintestinal, associadas a níveis preservados de citocinas antiinflamatórias produzidas por linfócitos *helper* do tipo 2 (Th2), em animais que receberam nutrição parenteral enriquecida com glutamina, à semelhança daqueles que receberam ração normal, em contraste com os animais que receberam nutrição parenteral não enriquecida. Estes apresentaram níveis reduzidos das citocinas antiinflamatórias IL-4 e IL10 no intestino e menores níveis de IgA intestinal e respiratória¹³³.

Estudos adicionais desses autores utilizando tecido linfóide da lâmina própria estimulado com lipopolissacáride, mostrou preservação dos níveis de RNA mensageiro de interleucina 4 e 10, assim como de IgA em animais que usaram glutamina. Foi demonstrada também redução da expressão intestinal da molécula que promove a adesão dos neutrófilos à parede vascular do endotélio e responsável por injúria tissular, nos animais que receberam glutamina. Níveis mais elevados de expressão da molécula intracelular de adesão parecem estar associados a menores níveis da IL-4 e IL10^{130,134}.

Nove voluntários foram submetidos a randomização para receber glutamina ou solução salina por via enteral, sendo biopsiados ao fim de seis horas. As biópsias dos tecidos duodenais foram cultivadas a seguir com ou sem glutamina por 24 horas. Demonstrou-se redução da produção da citocina pró-inflamatórias IL-8 na mucosa intestinal de voluntários submetidos ao aporte enteral apenas com solução salina, quando suas biópsias foram cultivadas com glutamina. Nos pacientes perfundidos com glutamina e com biópsias também tratadas com glutamina, houve redução ainda mais marcante de IL-8, assim como da IL-6, também pró-inflamatória. Não houve alteração do RNA mensageiro das citocinas, o que sugere mecanismo pós-transcricional¹³⁵. Estes achados são coerentes com a observação da redução de níveis plasmáticos e da produção intestinal da IL-8 em ratos submetidos a colite experimental e tratados com glutamina. Observou-se também redução da produção de IL-8 por células mononucleares cultivadas de pacientes com pancreatite aguda, depois de perfundidas com glutamina¹³⁶. Outro estudo em pacientes com pancreatite aguda mostrou redução dos níveis de proteína C-reativa e aumento do número de linfócitos totais em pacientes que usaram glutamina na forma de dipeptídeo, associada à nutrição parenteral, comparativamente àqueles que não receberam o aminoácido¹³⁷.

Recentemente, estudos apontam possível papel da glutamina na modulação da ativação do FN- $\kappa\beta$. Pesquisa que utilizou culturas de enterócitos imaturos de linhagem H4 e maduros de linhagem Caco-2 mostrou que a produção da citocina pro-inflamatória IL-8 encontra-se aumentada na vigência de baixa concentração de glutamina, especialmente na linhagem imatura. Os achados mostraram que, após estímulo com endotoxina, a deficiência de glutamina correlacionou-se com a redução da síntese do inibidor I $\kappa\beta\alpha$, que era seguida pelo aumento do FN- $\kappa\beta$ no núcleo. A provisão de glutamina inibiu a elevação da IL-8 em ambas as linhagens celulares, cuja produção depende de uma série de

eventos intracelulares, iniciados a partir da ativação receptores *toll like* na membrana que levam à ativação do FN- $\kappa\beta$ que, por sua vez, ativa a transcrição e transdução de IL-8¹³⁸. A glutamina foi também capaz de reduzir a expressão de FN- $\kappa\beta$ em modelo de colite experimental em ratos que se associou à redução de dano colônico, do estresse oxidativo e da expressão de mediadores inflamatórios¹³⁹. Em células de carcinoma de mama humano, a depleção de glutamina induziu, de maneira importante, a síntese de IL-8 e de RNA mensageiro, fato relacionado ao aumento da síntese de FN- $\kappa\beta$ ocorrida em resposta à baixa concentração de glutamina¹⁴⁰. Em vista da importância do FN- $\kappa\beta$ no desenvolvimento da mucosite, conforme mencionado, este fato constitui outro mecanismo a ser avaliado para a ação da glutamina em pacientes submetidos a TCTH – a redução da síntese desta substância poderia se relacionar a possível atenuação da tempestade citocínica e, possivelmente, redução da gravidade e incidência da DECH.

3.2.3.3 O papel da glutamina: metabolismo

A glutamina é o aminoácido mais abundante encontrado no plasma. É de fundamental importância no transporte de nitrogênio dos locais onde é sintetizada – músculo esquelético, fígado e pulmão, aos locais de utilização, como rins, intestinos, neurônios, células imunológicas e, sob determinadas condições de equilíbrio ácido básico, o fígado.

O tecido muscular é o principal local de síntese de glutamina no corpo humano e contém cerca de 90% do *pool* corporal total do aminoácido. Estudos quantitativos em humanos demonstraram que, no estado pós-absortivo, 60% dos aminoácidos disponibilizados correspondem a glutamina e alanina¹⁰⁵.

Parte substancial - cerca de um terço - de todo o nitrogênio derivado do metabolismo protéico é transportado no sangue sob a forma de glutamina, assim como o

nitrogênio muscular mencionado. Esse mecanismo transportador oferece meio não tóxico de levar amônia da periferia para as vísceras. Uma vez atingido o órgão alvo, a amônia é novamente sintetizada para a excreção ou formação de uréia, sendo a glutamina o principal fornecedor de nitrogênio para a ureagênese hepática. Nos rins, a quebra da glutamina detem papel fundamental na eliminação de nitrogênio na urina, sendo a formação de amônia de fundamental importância na eliminação de prótons e manutenção do equilíbrio ácido-básico⁷⁴.

Como já mencionado, a glutamina constitui importante fonte de carbono e nitrogênio para compostos intermediários do metabolismo e síntese de macromoléculas. É usada na síntese protéica e atua como precursora na síntese de outros aminoácidos. A partir da hidrólise para formar glutamato, o grupo α -amino pode ser utilizado em reações de transaminação, que incluem a síntese de alanina a partir do piruvato, do aspartato a partir do oxalacetato e formação da serina. Além disso, o glutamato pode sofrer deaminação para ser convertido em prolina e o esqueleto de carbono da glutamina, após conversão do glutamato em alfacetoglutarato, pode entrar no ciclo de Krebs e, através do oxalacetado, participar da síntese de aspartato, alanina, asparagina, metionina, treonina, isoleucina e lisina. Exerce ainda importante papel na síntese de ácidos nucléicos⁷⁴.

Estados catabólicos como grandes traumas, cirurgias de grande porte, sepse, quimio e radioterapia intensivas, bem como transplante de medula óssea, estão associados a níveis plasmáticos reduzidos de glutamina^{71,75-79,141}. Esses estados caracterizam-se por metabolismo consumptivo, que resulta em rápida perda de massa magra e importantes alterações na composição corporal. Os eventos mencionados podem desencadear a resposta hipermetabólica, que consiste em uma complexa cascata de eventos neuro-hormonais mediados pelo sistema nervoso simpático, glucagon, cortisol, insulina, hormônio de crescimento, citocinas e outros mediadores inflamatórios. As

características clínicas distintivas dessa resposta incluem taquicardia, taquipnéia, perda de peso, gordura e massa magra, bem como expansão do fluido extracelular.

Nas situações de estresse metabólico, a glutamina é liberada em quantidades progressivamente maiores pelo tecido muscular, a despeito do fato de que seus níveis séricos se reduzem quase imediatamente após o trauma desencadeador do estado catabólico. Em sua maior parte, a glutamina liberada do músculo é captada pela circulação esplâncnica, fígado e células do sistema imune¹⁴². Aparentemente, órgãos diferentes liberam e captam simultaneamente a glutamina, dependendo da condição clínica. A resultante pode ser a perda e redução do nível da glutamina muscular, através da manutenção da taxa de sua liberação e redução de captação e, concomitantemente, aumento de captação pelos órgãos centrais do metabolismo, com redução da taxa de liberação pelos mesmos¹⁴². A despeito da manutenção deste fluxo inter-órgãos de glutamina, o resultado final parece ser a depleção ao nível de diversos tecidos. Esse padrão em estados catabólicos não é exclusivo da glutamina, podendo ocorrer com aminoácidos, tais como arginina e taurina, e com eletrólitos, o que enseja um questionamento sobre a queda da glutamina como evento específico e com significado prognóstico próprio, ou apenas como marcador inespecífico da depleção mais generalizada de nitrogênio¹⁴².

De qualquer maneira, o músculo parece programado para não responder ao aporte exógeno de glutamina nas condições catabólicas. A abertura de canais de cloreto e potássio do miócito em doenças graves leva à queda do potencial de membrana e alteração no transporte de glutamina dependente do sódio, o que explica redução súbita e contínua da glutamina intracelular muscular após doença aguda ou trauma. Por outro lado, fígado e células imunes – mas não o intestino – continuam a captar glutamina, mesmo com níveis plasmáticos baixos¹⁴².

Apesar disso, estudos mostram que, em determinadas situações, pode ocorrer captação pelo músculo de glutamina oferecida em caráter exógeno. Em pacientes sépticos pode não haver aumento de níveis de glutamina muscular com a oferta exógena, ao passo que isso pode ocorrer em pacientes com traumas¹⁴¹. Em queimados, pode haver depleção significativa do *pool* de glutamina intramuscular, assim como de seus níveis séricos, mas já se demonstrou, em humanos, aumento de nível sérico de glutamina e evidências de melhora da síntese protéica em resposta à administração de glutamina por via enteral^{91,100}. Pacientes pós-operados apresentaram aumento de níveis séricos de glutamina e melhor balanço nitrogenado, quando o APACHE era inferior a seis, o mesmo não ocorrendo nos pacientes mais graves, com APACHE igual ou maior a seis¹²⁸. Outros estudos referem melhora do balanço nitrogenado com o uso de suplemento em nutrição parenteral em população de pacientes catabólicos, particularmente pós-operados e pacientes submetidos a transplante de medula óssea^{9,143-145}. Wilmore¹⁴⁶ aponta que dados obtidos em pacientes cirúrgicos que receberam nutrição parenteral suplementada com glutamina são consistentes em mostrar que a suplementação do aminoácido correlacionou-se com atenuação da queda da glutamina intracelular e aumento da síntese protéica muscular, sem alterações significativas dos seus níveis plasmáticos. Parece-nos demonstrar que a depleção do *pool* intracelular muscular e dos níveis plasmáticos de glutamina é fenômeno sistemático em pacientes com doenças hipermetabólicas, podendo haver resposta à administração exógena de glutamina, com melhora destes níveis e manutenção do balanço nitrogenado, na dependência da gravidade do catabolismo, da natureza do estímulo catabólico, da via e do tempo de oferta da glutamina.

Outro aspecto metabólico resultante de possível efeito benéfico da glutamina diz respeito a seu papel no metabolismo da glicose. Em ensaio clínico que avaliou desfechos em grupos de pacientes de terapia intensiva submetidos a nutrição, parenteral com e sem

glutamina, a hiperglicemia foi significativamente mais freqüente no grupo controle, sem glutamina¹³. A redução da hiperglicemia foi apontada como uma causa possível da redução das complicações infecciosas encontrada no estudo, particularmente a pneumonia. Estudo realizado para avaliar a resistência insulínica em pacientes de terapia intensiva randomizados, que receberam suporte nutricional, com ou sem suplementação de glutamina, mostrou que, a despeito de níveis comparáveis de glicemia entre os dois grupos, houve piora significativa da resistência insulínica nos pacientes do grupo controle ao longo do experimento, em comparação ao grupo experimental. Demonstrou-se também, aumento da quantidade de glicose necessária para evitar hipoglicemia pela técnica do *clamp* euglicêmico hiperinsulinêmico no grupo suplementado com glutamina¹⁴⁷. A glutamina tem sido relacionada ao aumento da secreção de insulina pelas células β do pâncreas, em resposta à glicose ou leucina, mas não parece promover secreção de insulina por si própria. A glutamina pode agir na célula β como precursor anaplerótico no fornecimento dos substratos glutamato e 2-oxoglutarato, para o ciclo do ácido tricarboxílico, estimulando, desta forma, a oxidação catalítica da glicose. Esse processo de geração energética se encontra intimamente conectado com a secreção de insulina¹⁰⁵.

O glutamato é considerado substrato importante para reações mitocondriais da célula β que resultam em aumento da secreção de insulina em canais dependentes de potássio, não dependentes de ATP. É também considerado substrato importante nas células β para a enzima decarboxilase do ácido glutâmico que produz o ácido gama-amino-butírico, molécula sinalizadora que parece ser importante para a regulação de secreção de insulina nas ilhotas de Langerhans. Além disso, mutações em sítio alostérico da desidrogenase do glutamato resultam em aumento de secreção de insulina e seus níveis nos indivíduos afetados. Dessa forma, a importância do glutamato e enzimas a ele relacionadas em relação à secreção de insulina encontra-se firmemente estabelecida,

mas as inter-relações entre glicose e glutamato derivado de aminoácidos e suas implicações para a regulação da secreção de insulina pelas células β ainda não foi determinada¹⁰⁵.

Estudos experimentais dão suporte a essas hipóteses. A suplementação de glutamina a ratos da linhagem B/6J submetidos a dietas ricas em gorduras atenuou a hiperglicemia e a hiperinsulinemia decorrentes da mesma. Embora tenha sido também realizada suplementação com alanina, com resultados semelhantes ao da glutamina até três meses, depois desse período, somente o grupo suplementado com glutamina manteve níveis glicêmicos semelhantes ao grupo que recebeu dieta pobre em gordura e sacarose. O papel dos aminoácidos parece estar relacionado à sua capacidade de geração de substratos intermediários para o ciclo de Krebs, inibindo dessa forma a oxidação de gorduras e seu possível efeito inibidor sobre a oxidação da glicose¹⁴⁸.

Outro estudo experimental realizado em cães, utilizando-se da técnica de *clamp* euglicêmico demonstrou aumento das necessidades de glicose para manutenção de níveis normais de glicemia no grupo suplementado com glutamina¹⁴⁹.

3.3 Estudos sobre suplementação de glutamina em pacientes submetidos a quimioterapia e a TCTH

Com o objetivo de revisar os estudos de avaliação dos efeitos da glutamina em pacientes submetidos a quimioterapia em geral e a TCTH em particular, realizou-se busca no Medline com os termos “mucosites”, “chemotherapy”, “stem cell transplantation”, “bone marrow transplantation”, usando o operador “and” para cruzá-las com a palavra “glutamine”. Foram excluídos da análise estudos em animais, estudos não publicados na íntegra e estudos duplicados de estudos já publicados. Foram excluídos também estudos

retrospectivos e de caso-controle, restando apenas pesquisas em humanos, aleatórias e cegas. Não foram analisados também estudos com efeitos colaterais de quimioterapia sobre outros sistemas (sistema nervoso central, cardiovascular, etc). Foram analisados também artigos de revisão e metanálises relacionadas ao tema, com o objetivo de verificar algum estudo que não tivesse sido localizado em nossa busca no Medline.^{8,56,57,150,151} Foram localizados 15 estudos sobre o uso da glutamina em quimioterapia e 11 em TCTH. As tabelas 1 e 2 resumem os principais dados dos estudos obtidos em estudos que envolveram quimioterapia (tabela 1) e TCTH (tabela 2).

Tabela 1: Ensaios clínicos utilizando a glutamina em pacientes submetidos à quimioterapia em geral ou radioterapia, por doenças neoplásicas diversas

Autor	Neoplasia/tratamento	n	Dose diária de GLN e tempo de uso	Via	Desfechos	Ref
Van Zaanen 1994	Leucemia/linfoma de Burkitt (alguns TSCH?); QTs com combinações de citarabina, amsacrina, ciclofosfamida, vincristina e antraciclínas	20	26 g, até leuc > 500 alagln	EV (NP)	= desfechos (mortalidade, mucosite, neutropenia transfusão)	152
Jebb 1994	Ca TGI. Qt com 5FU e ácido folínico	28	16 g, 8d	Oral	= mucosite oral	153
Bozzetti 1997	Ca de mama. QT com doxifluridina e leucovorina	65	30 g, 8d	Oral	= diarreia e reposta à QT	154
Anderson 98	Sarcoma, sarc. De Ewig, osteosarcoma, rabdomyosarcoma, neuroblastoma; Qt com doxorubicina, 5FU + leucovorin, carboplatina + etoposido e metotrexate em dose alta	24	2 g/m ² /d, pelo menos 14 d	Oral (precedida de bochecho), pacientes como próprios controles	< duração e gravidade da mucosite (p = 0.0005 e 0.002)	155
Yoshida 1998	Ca avançado de esôfago, QT e RxT	13	30 g, 28d	Oral	Maior contagem de linfócitos e formação de blastos; menor excreção urinária de fenoltaleína oral	156
Okuno 1999	Não especificado; QT com 5FU, larga predominância de 5FU, leucovorin e levamisole	134	8 g, 14d	Oral (precedida de bochecho)	= mucosite oral	157
Decker 1999	Ca colo-retal metastático, QT c/5FU e ac. Folínico	24 (3 ciclos)	0,4 g/kg/d gli-gln, 5 d/ciclo	EV, sem NP	↓ mucosite endoscópica, ↑ relação vilo/crípta; = sintomas clínicos	158
Huang 2000	Ca de cabeça e pescoço, RxT	17	6 g/d, 5 semanas	Bochecho	↓ duração e gravidade da mucosite oral ao exame físico, = sintomas clínicos exceção mucosite grau 3 (↓)	159
Daniele 2001	Ca colo-retal metastático, QT c/5FU ac folínico	70	18 g/d, 15 d, iniciar 5 d antes do início da QT	Oral	↓ necessidade de antidiarreicos (p=0,002), melhora da absorção (d-xilose, p<0,0001) e PI (celbiose/manitol, p<0,0001)	160

Scheid 2004	Leucemia aguda; QT com tioguanina, citarabina e daunorrubicina, ou citarabina em dose alta e mitoxantrona, ou idarubicina, fludarabina e Ciotarabina	30 (40 ciclos)	20 g de gli-gln/d até estabelecer VO (média 13 dias)	EV (NP)	↓ dias para atingir 500 leuc; = contagem de cd4 e cd8; = t de permanência	161
Cerchietti 2006	Ca de cabeça e pescoço em QT (cisplatina + 5FU) e RxT	29	0,4 g /kg/d de L-alanil-L-glutamina	EV, sem NP	↓ da intensidade da mucosite oral, ↓ do tempo livre de mucosite	162
Li 2006	Ca de mama, QT neoadjuvante com ciclofosfamida e 5FU venoso	60	30g/dia, 12 d	oral	↑ dos níveis de glutamina sérica ($p < 0.05$); ↓ da PI ($p < 0.05$); = estomatite e diarreia	163
Peterson 2007	Ca de mama, QT baseada em antraciclinas	366	7,5 g/d durante Qt + 14 dias ou até 5 d após resolução da mucosite	Oral (precedida de bochecho), pacientes como próprios controles	↓ da intensidade da mucosite oral entre grupos e no mesmo grupo de um ciclo para outro	164
Choi 2007	Ca colo-retal, QT c/5FU ac folínico	51	30 g/dia, 15d	Oral	↓ intensidade mucosite oral ($p < 0,001$); redução da PI ($p < 0,001$); correlação positiva redução da mucosite e PI ($r = 0,898$, $p < 0,001$)	165
Ward 2007	Ca pediátrico, QT, usadas como próprio controle em outro ciclo idêntico	76	0,65g/kg/dia, 7d	Enteral	↓ necessidade e tempo de NP; = duração e intensidade da mucosite	166

GLN = glutamina Ca = câncer; QT = quimioterapia; RxT = radioterapia; PI = permeabilidade intestinal; 5FU = 5-fluoruracil; EV = endovenoso; NP = nutrição parenteral; d = dias; ↑ = aumento; ↓ = redução; g = grama; d = dia; kg = quilograma; m² = metro quadrado

Dos 15 estudos em quimioterapia, 11 usaram glutamina por via oral ou enteral, sendo seis apenas oral, três oral precedida de bochecho, um enteral e um apenas bochecho. Quatro estudos restantes utilizaram glutamina venosa, sendo dois associados à nutrição parenteral e dois como infusão isolada.

A dose e o tempo de duração da glutamina oral foram bastante variáveis, não aparentando haver relação clara entre dose e efeito positivo. Efeitos positivos sobre a gravidade e duração da mucosite foram obtidos com doses baixas como $2\text{g}/\text{m}^2/\text{dia}$ ¹⁵⁵, $6\text{g}/\text{dia}$ apenas por bochecho¹⁵⁹ e $7,5\text{ g}/\text{dia}$ ¹⁶⁴; doses intermediárias de $18\text{g}/\text{dia}$ ¹⁶⁰ e doses elevadas, de $30\text{g}/\text{dia}$ ¹⁶⁵. Por outro lado, doses de 16g ¹⁵³ e 30 g ^{154,156} não mostraram efeito sobre a mucosite, embora efeitos sobre a contagem de linfócitos e sobre a excreção de fenofaleína, tenham sido observados em um estudo¹⁵⁶.

Dos estudos que usaram glutamina associada à nutrição parenteral^{152,161}, as doses foram semelhantes (26 e 20g) e não foram observados efeitos sobre a mucosite, embora um deles¹⁶¹, tenha referido efeitos hematológicos. Dos estudos que usaram a glutamina venosa não associada à nutrição parenteral, apenas um deles mostrou redução de mucosite observada por método endoscópico e histológico¹⁵⁸, sem alterar, entretanto, a mucosite clínica; o outro revela redução da intensidade da mucosite e do tempo sem este efeito¹⁶². As doses de glutamina foram de $0,4\text{g}/\text{kg}/\text{dia}$, embora o composto do dipeptídeo de glutamina tenha sido diferente, um associado à glicina e outro à alanina.

Observa-se grande variedade de neoplasias e tratamentos entre os estudos e, às vezes, dentro do mesmo estudo. Considerando os diferentes mecanismos e diferentes intensidades de mucosite relacionados aos diversos tratamentos, essa variedade dificulta a extrapolação para a população de pacientes oncológicos em geral. O tamanho das amostras em geral é pequeno, com exceção dos estudos de Okuno et al¹⁵⁷ e Peterson et

al¹⁶⁴. O primeiro, com 134 pacientes, não evidenciou efeitos da glutamina sobre a mucosite. Embora os tipos de câncer não tenham sido especificados, apresenta grande homogeneidade em relação ao tratamento quimioterápico, baseado em 5-fluoruracil. O segundo, com 366 pacientes, incluindo apenas pacientes com câncer de mama, com idades semelhantes e tratamentos baseados em antraciclinas, igualmente distribuídos em ambos os braços do estudo, mostra redução significativa do ponto de vista estatístico da intensidade da mucosite oral entre grupos teste e placebo e, no mesmo grupo quando, em ciclo subsequente de quimioterapia, são designados para o tratamento oposto. Estes dois estudos, apesar de sua adequação metodológica, mostram a dificuldade de se generalizar resultados em populações submetidas a tratamentos quimioterápicos para doenças neoplásicas diferentes.

Outro aspecto que merece consideração é o pequeno número de estudos que apresentaram modificações em desfechos com significado clínico evidente. Embora sete dos 15 estudos revelem redução em grau variável da intensidade e duração da mucosite oral e/ou diarreia, além da redução da necessidade de opióides e de nutrição parenteral, em geral, o uso da glutamina não resultou na modificação de desfechos como mortalidade, incidência de infecções e redução do tempo de permanência hospitalar. Embora alguns autores assinalem que a mucosite pode se relacionar com infecção e óbitos, esta associação não foi, praticamente, investigada. Em outros oito estudos, alguns desfechos substitutivos (“surrogate endpoints”) como parâmetros hematológicos e medidas da função intestinal por meio de permeabilidade e absorção foram investigados, mas não houve demonstração de associação entre estes desfechos e desfechos clínicos.

Estudo colaborativo da Biblioteca Cochrane¹⁵⁰, que incluiu cinco estudos dentre os mencionados^{153,155,157,159,162}, concluiu que nenhuma das metanálises encontrou qualquer diferença significativa entre glutamina e placebo. Afirmam também que a evidência é

insuficiente para dar suporte ou refutar a efetividade da glutamina em relação ao placebo na prevenção da mucosite¹⁵⁰. Cabe ressaltar que essa é uma metanálise sobre mucosite oral, embora outros desfechos tenham sido avaliados nos estudos em questão. A mesma conclusão foi alcançada em outra metanálise¹⁵¹. Nenhuma das duas metanálises, entretanto, incluiu o estudo de Peterson et al, com 366 pacientes¹⁶⁴, com potencial para afetar os resultados das mesmas, por se tratar de estudo recente.

Em resumo, a glutamina parece apresentar efeitos de redução da mucosite oral e modificação de alguns desfechos substitutivos em alguns grupos de pacientes submetidos à quimioterapia para câncer, sem modificação importante de outros parâmetros clínicos. Destarte, a redução da necessidade de nutrição parenteral em alguns estudos pode ter efeito na redução do tempo de internação e infecções, embora essa associação fosse registrada, bem como a associação da redução de mucosite com mortalidade.

No que concerne os estudos sobre glutamina em TCTH, foram levantados 11 trabalhos, sendo seis com uso intravenoso e cinco com uso oral (Tabela 2).

Tabela 2: Ensaios clínicos com o uso de glutamina em pacientes submetidos a TCTH

Autor	Neoplasia/tratamento	n	Dose de GLN e tempo de uso	Via	Resultados	Ref
Ziegler 1992	Neoplasias hematológicas e linfoma de Hodgkin. Qt de alta dose + irradiação corporal total ou só Qt	45	0,57 g/kg, ≈27 d	EV, com NP	↓de infecção (culturas e clínica); melhora do balanço nitrogenado; ↓da permanência; = sobrevida em 6m	9
Schloerb 1993	Neoplasias hematológicas e linfoma Hodgkin e não Hodgkin, tumores sólidos, Tx alogêncio e autólogo. Cy + irradiação corporal total ou Cy + busulfan	29	≈28 g/dia, ≈30d	EV, com NP	↓da permanência, = infecção, mucosite, leucopenia	10
Jebb 1995	Leucemias, mieloma, linfoma Hodgkin e não Hodgkin; Tx alogênico; Qt com BCNU, etoposido e melfalan para todos	24	16 g/dia, do D+1 até resolução da mucosite ou alta,	Oral (precedida de bochecho)	= duração e intensidade da mucosite, uso de opióides, duração da NP, parâmetros hematológicos e tempo de internação	167
Anderson 1998	Neoplasias hematológicas, tumores sólidos, aplasia e doenças genéticas, alogênicos e autólogos. Irradiação, Mtx/profilaxia DECH	193	4 g/m ² /d, início no condicionamento até d+28	Oral (precedida de bochecho) Obs: randomização pelo tipo de Tx (autólogo, relacionado, não relacionado)	↓da intensidade da mucosite e do uso de morfina em Tx autólogo, não alogênico	168
Brown 1998	Neoplasias hematológicas e linfoma Hodgkin e não Hodgkin, mieloma, Tx alogêncio e autólogo. BCNU+etoposido+ citarabina+ Melfalan, ou Cy+busulfan ou Cy + irradiação corporal	34	50 g de gli-gln/d, do condicionamento a alta da unidade	EV, com NP	Maiores níveis de albumina e proteína C	169
Schloerb 1999	Neoplasias hematológicas e tumores sólidos, tx autólogo e alogênico	66	30 g, critério de início não claro, até atingir 50% das necessidades energéticas	Oral	= permanência, dias de NP, recuperação de neutrófilos, infecção, mucosite e diarreia	170
Coghlin-Dickson 2000	Tx autólogo e alogênico	58	30 g/d por VO	Oral, desde condicionamento	= estado nutricional, número de dias em NP, duração da hospitalização, duração e intensidade da mucosite, , diarreia	171

Autor	Neoplasia/tratamento	n	Dose de GLN e tempo de uso	Via	Resultados	Ref
Pytlík 2002	Limfomas Hodgkin e não Hodgkin, mieloma, leucemias, esclerose múltipla e tumores sólidos, Tx autólogo. Qt BCNU, etoposida, ara-C, melfalan ou melfalan dose elevada, ou ifosfamida dose elevada, carboplatina, etoposido; ou ciclofosfamida dose elevada ou melfalan, mitoxantrona, ou etoposido, busulfan ou etoposido com irradiação corporal total	40	20 g/dia ala-gln (=13,46g de glutamina)	EV, sem NP, do dia +1 ao dia +14	↑ mortalidade e recidivas, mucosite oral, custos; ↓ diarreia; = parâmetros hematológicos e subtipos de linfócitos	172
Piccirillo 2003	Leucemias, mieloma, linfoma de Hodgkin e osteosarcoma; diversos regimes de condicionamento; Tx autólogo	27 - estudo1 21 - estudo2	20g/dia glutamina livre (estudo1) 20 g/dia ala-gln (=13,46g de glutamina) (estudo2)	EV, com NP	↓ duração e intensidade da mucosite, dias para > 500 linfócitos ($10^9/l$)	173
Blijlevens 2004	Leucemias, linfomas não hodgkin e síndromes mielodisplásicas, Qt com idarubicina, ciclofosfamida e irradiação corporal total	35	0,57 g/kg de ala-gln, ≈ 18d	EV, com NP	Níveis de citrulina e albumina mais elevados, menor intensidade da mucosite no d+7; = parâmetros hematológicos, tempo de NP, remoção de cateter, permanência e óbitos	174
Aquino 2005	Leucemias, linfomas, neuroblastomas, outros tumores sólidos, doenças malignas e não malignas. Maior parte irradiação corporal total, quando alogênico, profilaxia de DECH com metotrexate, transplantes alogênicos e autólogos	120	2 g/m ² /dose, 2 X, max de 4g	VO	↓ redução do número de dias de opióides ($p=0,03$) e NP ($p=0,01$). = intensidade da mucosite ($p=0,07$)	175

GLN = glutamina; Qt = quimioterapia; Tx = transplante; Cy = ciclofosfamida; Mtx = metotrexate; BCNU = carmustina; Ara C = citosina arabinosídeo; EV = endovenoso; NP = nutrição parenteral; VO = via oral; d = dias; ↑ = aumento; ↓ = redução; g = grama; d = dia; kg = quilograma; m² = metro quadrado; max = máximo; ≈ = próximo de

Nos estudos em que a glutamina foi utilizada pela via venosa, em cinco ela foi associada à nutrição parenteral e em apenas um ela foi aplicada isoladamente¹⁷². As doses apresentaram variação significativa, sendo de 0,57 g/kg/dia de glutamina⁹, 28 g/dia¹⁰, 50 g/dia do dipeptídeo glicina-glutamina¹⁶⁹, 20 g/dia do dipeptídeo alanina-glutamina, correspondendo a 13,5 g de glutamina^{172,173}, e 0,57 g/kg/dia de alanina-glutamina¹⁷⁴, correspondente a 0,38 g/kg/dia de glutamina. O tempo de uso variou entre 14 e 30 dias. Em um dos estudos, a duração do tratamento não foi explicitada¹⁷³.

Os estudos em TCTH em que se usou glutamina por via oral, as doses variavam entre 2 g/m²/dia a 30g/dia, com tempo de uso nem sempre esclarecido, iniciando-se junto com o condicionamento ou no dia +1, com duração enquanto houvesse mucosite ou até o dia +28.

Os estudos de Ziegler et al⁹ e Shloerb e Amare¹⁰ com suplementação de glutamina à nutrição parenteral, registraram redução significativa do tempo de internação hospitalar, sendo que o primeiro evidenciou também redução de infecção clinicamente definida e culturas positivas. Alguns estudos registraram redução de intensidade da mucosite e/ou parâmetros hematológicos, sendo dois com glutamina VO^{168,175} e dois com glutamina venosa^{173,174}. Dois estudos registraram manutenção de níveis séricos de glutamina com o uso da glutamina venosa^{169,174}.

Assim como ocorreu nos estudos sobre mucosite e glutamina, em pacientes submetidos a TCTH, não se observou relação entre doses e relatos de efeitos positivos. Nos estudos em TCTH observou-se também variação nos tipos de neoplasia, nos regimes de condicionamento e mistura de transplantes autólogos e alogênicos^{10,168-171,175}. Com alguma frequência, não foi

mencionada ou não houve randomização por grupo de tipo de transplante e por tipo de neoplasia tratada. Apesar de não haver demonstração de diferença estatística na frequência do tipo de transplante ou neoplasia entre grupos devido ao pequeno tamanho da amostra, as diferenças numéricas eram substanciais^{10,168,169,175}. Três estudos avaliaram apenas TCTHs alogênicos^{9,167,174} e dois apenas autólogos^{172,173}.

Metanálise da Biblioteca Cochrane sobre suporte nutricional em TCTH abordou o uso de glutamina em soluções nutricionais⁸. Em relação à glutamina por via oral, embora em triagem inicial, os estudos de Jebb et al¹⁶⁷, Anderson et al¹⁶⁸, Schloerb e Skikne¹⁷⁰ e Coghlin Dickson et al¹⁷¹ tivessem sido levantados, apenas os estudos de Jebb et al¹⁶⁷ e Schloerb e Skikne¹⁷⁰ foram considerados para a análise estatística final. Desta análise resultou que o grupo de administração de glutamina foi semelhante ao placebo quanto ao tempo de internação, tempo de suporte nutricional parenteral, hemoculturas positivas e sobrevivência em 100 dias, e estatisticamente inferior no tempo para atingir contagem normal de neutrófilos.

No que diz respeito aos estudos que usaram glutamina por via parenteral, apenas os dados dos estudos de Ziegler et al⁹, Schloerb e Amare¹⁰ e Brown et al¹⁶⁹ foram incluídos^{9,10,169}. Quatro outros estudos foram excluídos por representarem duplicata do estudo original de Ziegler. Os estudos de Pytlic et al¹⁷² e Blijlevens et al¹⁷⁴ não foram mencionados. Os dados compilados pela metanálise indicam superioridade da nutrição parenteral suplementada com glutamina na duração da internação e no desenvolvimento de hemoculturas positivas. Não foram detectadas diferenças quanto a gravidade da mucosite,

peso corporal, tempo de nutrição parenteral, incidência de DECH em grau superior a 2, duração da neutropenia e sobrevivência em 100 dias.

Cabe ressaltar que a avaliação cuidadosa dos três estudos selecionados aponta para problemas metodológicos importantes em dois deles. Embora Ziegler et al⁹ incluam população homogênea de pacientes submetidos a TCTH alogênico, com pequenas diferenças diagnósticas entre os dois grupos, os outros dois incluem TCTHs alogênicos e autólogos, bem como tumores sólidos, além de apresentarem diferenças diagnósticas entre os grupos^{10,169}. Não são estatisticamente significativas, mas, como os tamanhos de amostra são pequenos, as diferenças numéricas existentes não devem ser ignoradas. Além disso, variáveis com potencial para influenciar o prognóstico não foram sistematicamente controladas. Apenas o parentesco do doador em um estudo⁹ e o regime de condicionamento em dois^{9,169}. Outro aspecto metodológico a se destacar é que tais estudos não fazem menção às possíveis diferenças de prognóstico decorrentes do tipo e estágio da doença no momento do transplante. Embora se admita correto que o estágio da doença, se recidivada ou não, se em primeira remissão ou não, tenha impacto na mortalidade tardia ou falha terapêutica, foi apontado também sua influência na mortalidade precoce^{15,176,177}. Deve-se, portanto, levar em conta o estágio da doença em estudos sobre intervenções suportivas em TCTH.

A associação de transplantes alogênicos e autólogos em um mesmo estudo pode ser outro fator importante de confusão, pois, além da diferença existente nos efeitos colaterais, condicionamento e prognóstico, o trabalho realizado por Pytlic et al¹⁷² sugere que o uso da glutamina em TCTH autólogo encontra-se relacionado a pior prognóstico, fato não observado em

transplantes alogênicos. Dessa forma, a mistura de transplantes autólogos a amostras de transplantes alogênicos poderia mascarar eventual efeito positivo da glutamina em transplantes alogênicos.

Permanece válida, portanto, a observação de Muscaritoli et al ⁵⁷, de que “... a maioria desses estudos foi realizada em populações não homogêneas submetidas tanto a transplante alogênico quanto autólogo, para tumores sólidos ou neoplasias hematológicas, o que torna a interpretação dos resultados bastante difícil...”.

3.4 As medidas da permeabilidade e seu papel na avaliação da barreira mucosa em pacientes submetidos a quimioterapia e a TCTH

A permeabilidade intestinal é medida da permissividade da barreira mucosa para macromoléculas. Relaciona-se à facilidade com a qual determinada molécula pode ultrapassá-la por mecanismo de difusão não mediada, ou seja, segundo um gradiente de pressão ou concentração, sem a assistência de um sistema carreador bioquímico, ativo ou passivo^{178,179}.

Em condições patológicas pode ocorrer aumento da permeabilidade a macromoléculas em consequência de insultos à mucosa, que podem ser de caráter infeccioso, tóxico ou farmacológico.

A permeabilidade deve ser distinguida de absorção intestinal. O aumento da passagem de macromoléculas pela barreira mucosa não implica necessariamente em maior absorção. Isto pode ser claramente demonstrado em situações em que o aumento de permeabilidade coexiste com situações de

absorção inadequada, como, por exemplo, na doença celíaca, servindo aí como um marcador de lesão da mucosa intestinal.

Também são diferentes os mecanismos de permeabilidade e absorção: difusão não mediada de macromoléculas na permeabilidade - mecanismo passivo dependente de gradiente - e difusão mediada - transporte ativo de nutrientes - na absorção¹⁸⁰.

As medidas de permeabilidade intestinal são empregadas para a verificação de alterações da barreira mucosa intestinal em doenças gastrintestinais como a doença celíaca, doença de Crohn, em lesões provocadas por drogas antiinflamatórias não esteróides e etanol e na lesão da barreira mucosa provocada pela quimioterapia do câncer. Apresenta a vantagem de ser método quantitativo, relativamente simples e inócuo, permitindo sua utilização em larga escala.

Macromoléculas de açúcares são habitualmente utilizadas para a realização das medidas de permeabilidade. Excetuando-se o polietilenoglicol 400 (PEG-400), observam-se basicamente dois grupos de moléculas com mecanismos de permeação distinta: o de moléculas menores, de permeação até 30 vezes maior que as do outro grupo, constituído por arabinose, l-ramnose e manitol, com massas moleculares entre 150 e 182 Da e aquele de moléculas maiores, entre 342 e 3000 Da, constituído por lactulose, celobiose, ⁵¹Cr-EDTA, rafinose, ⁹⁹Tc-DTPA e dextran. O PEG 400 não pode ser classificado no grupo de pequenas ou grandes moléculas. Usualmente, comporta-se como o grupo das moléculas menores, de maneira oposta à lactulose e ao EDTA^{181,182}, mas em situações clínicas específicas pode ter comportamento de moléculas maiores, como nas doenças inflamatórias intestinais¹⁸³.

A teoria clássica sobre permeabilidade sugere que a mucosa intestinal é barreira porosa, perfurada de forma heterogênea por uma grande população de pequenos poros (0,4 a 0,7 nm de diâmetro) e por uma pequena população de poros grandes (6,5 nm). Os poros menores (0,4 nm) seriam eletricamente neutros e situados na membrana apical das células intestinais. Na região intercelular estariam localizados poros grandes, de 6,5 nm, eletricamente neutros e, possivelmente, poros de 0,7 nm, seletivos para cations. A passagem de moléculas grandes ficaria restrita aos poros grandes e as moléculas pequenas passariam por ambos os tipos de poros. Os poros grandes contribuiriam pouco na passagem de moléculas menores pelo seu número relativamente pequeno. Corresponderiam às junções firmes que, longe de serem estruturas estreitas, apertadas, conforme poderia sugerir a terminologia, na verdade constituem uma estrutura dinâmica que pode abrir e fechar e permite a passagem de grandes quantidades de nutrientes, fluidos e compostos de tamanho médio em direção à lâmina própria, dentre os quais água e nutrientes solúveis em água, tais como glicose, aminoácidos e alguns eletrólitos¹⁷⁸.

Teoria alternativa estabelecida por Hollander¹⁸³ em 1992, indica que a passagem de macromoléculas solúveis em água através do epitélio intestinal, não somente as de maior diâmetro, mas também as pequenas, ocorreria predominantemente através das junções firmes paracelulares e não por poros das membranas celulares. O autor indica que as características distintas das junções firmes de vilos e criptas permitem explicar as diferenças nos padrões de eliminação das diversas moléculas teste.

A permeabilidade em áreas de vilosidades e criptas seria diferente, maior a permeabilidade das junções firmes das criptas comparativamente à dos vilos. Desta maneira, antígenos luminiais, peptídeos, partículas bacterianas, ou outros compostos hidrossolúveis poderiam penetrar a mucosa intestinal em percentuais diferenciados, dependendo de sua capacidade de alcançar e penetrar o epitélio dos vilos ou criptas, ou dependendo de situações de doença em que as junções firmes das criptas estivessem mais expostas. Os compostos menores como o PEG 400 e o manitol penetrariam o epitélio em índices superiores aos de compostos maiores, porque essas substâncias podem alcançar e penetrar com mais facilidade os vilos, onde as junções firmes são mais estreitas e apertadas. Os compostos maiores como a lactulose não podem penetrar as junções firmes dos vilos, devendo alcançar o epitélio das criptas e suas junções firmes mais abertas para penetrar o epitélio¹⁸³.

Como a absorção, em condições de normalidade, ocorre principalmente na região das vilosidades e como o acesso de compostos luminiais aos espaços em torno dos vilos e próximos às criptas é usualmente muito limitado, somente pequenas quantidades de compostos maiores deveriam ser absorvidas.

Seja qual for a teoria, os testes de permeabilidade intestinal, em sua grande maioria, se baseiam na associação de uma molécula menor e uma molécula maior, habitualmente lactulose ou celobiose e manitol ou ramnose. Isso ocorre no intuito de se avaliar as duas vias propostas de permeação e de garantir que fatores intraluminiais, tais como a degradação bacteriana, ajam igualmente sobre ambas as moléculas, de tal forma que a razão da excreção das duas moléculas permaneça inalterada na presença destes fatores. A ação

da degradação bacteriana sobre um fator isoladamente poderia ensejar uma falsa redução da permeabilidade atribuída a fatores da mucosa. Assim, a razão da excreção dos dois açúcares, como por exemplo, a relação lactulose/manitol, é considerada por muitos como a melhor medida da permeabilidade intestinal.

Do ponto de vista prático, situações em que ocorre atrofia da mucosa, haveria redução da permeação de moléculas menores, que ocorre predominantemente nas vilosidades, podendo haver aumento da passagem de moléculas maiores, uma vez que as criptas, onde ocorre a permeação das mesmas, poderiam ficar mais expostas. O resultado final, de qualquer forma seria um aumento da relação molécula maior/molécula menor. Na aplicação de verificação do efeito de drogas citotóxicas, pode ocorrer também redução da excreção de moléculas menores e aumento da excreção das maiores pelo mesmo motivo. Entretanto, cabe destacar que os atributos da junção firme podem entrar em jogo, mesmo sem atrofia ou lesão significativa da mucosa, permitindo alterações mais significativas na excreção das moléculas maiores, por exemplo.

Bjarnason e Peters¹⁸⁴, em revisão sobre a enteropatia por antiinflamatórios não esteróides, observaram que as junções firmes parecem ser particularmente suscetíveis a vários estímulos nocivos e que talvez sejam as primeiras organelas a entrarem em sofrimento quando o fornecimento de energia se encontra prejudicado. Segundo os autores, esse fato poderia provocar perda da integridade da junção e aumento de permeação de macromoléculas.

Matthews et al¹⁸⁵, em estudo sobre alterações de permeabilidade em células de cultura sob hipóxia quimicamente induzida, afirmam que há crescente evidência de que a função de barreira das junções firmes é regulada por grande variedade de condições fisiológicas. Consideram também evidente que essa função de barreira pode ser alterada sob diversas condições patológicas, como ocorre durante a transmigração de neutrófilos, como resultado de toxinas de bactérias do gênero *Clostridium*, ou como resultado da ação de citocinas. Heyman et al¹⁸⁶ apontam a influência do fator de necrose tumoral em conjunção com o interferon- α em alterações da função intestinal encontradas na alergia ao leite de vaca. Ryan et al¹⁸⁷ sugerem ainda que o aumento de permeabilidade encontrado em seus pacientes portadores de câncer avançado estudados com polietileno-glicol, possa se dever ao aumento de produção de citocinas, em resposta à presença do tumor. Travis e Menzies¹⁷⁸ listam observações isoladas indicando o papel de mediadores inflamatórios no aumento de permeabilidade intestinal, incluindo fator de necrose tumoral, interleucinas, interferon e o fator de agregação plaquetária. Sugere ainda a possibilidade que este efeito seja resultado da ação destes mediadores sobre as junções firmes. Helton¹⁸⁸ discute a possibilidade de que pequenos antígenos alimentares e peptídeos bacterianos são capazes de cruzar o epitélio intestinal e contribuir para o aumento da permeabilidade da mucosa, ao estimularem os linfócitos intraepiteliais a produzirem γ -interferon. Este, por sua vez, pode aumentar a permeabilidade do epitélio ao estimular a contração dos anéis de actina-miosina ligados às junções firmes, conduzindo-as à abertura¹⁸⁸.

Mais recentemente, com a descoberta da zonulina, proteína endógena similar em estrutura e função à toxina da *zonula ocludens*, produzida pelo *Clostridium difficile*, com papel provável de regulação do fluxo de fluidos, eletrólitos, moléculas e células através das junções firmes e responsiva a diversos estímulos, tais como endotoxinas, citocinas e alterações do estado oxidativo, o papel dinâmico das junções firmes ficou bem caracterizado^{189,190}.

As alterações da permeabilidade ocorreriam, portanto, por fatores estruturais decorrentes de lesão histológica, e fatores funcionais, ligados às junções firmes. No primeiro caso, as moléculas menores, que dependem das vilosidades para sua passagem, seriam mais afetadas e, no segundo caso, as moléculas maiores tenderiam a apresentar mais alterações.

Provável papel das junções firmes é ilustrado, do ponto de vista clínico, pelo estudo já mencionado, realizado por Hulsewé et al⁹⁷ que demonstraram correlação entre a presença de inflamação e redução dos níveis séricos de glutamina e da concentração de glutamina na mucosa intestinal. Nesse estudo, alteração de medidas de permeabilidade também ocorreu em associação à presença de inflamação e na ausência de alterações morfológicas significativas.

Na situação específica das alterações de permeabilidade relacionadas a tratamentos com citotóxicos, a intensidade e cronologia dessas alterações pode variar de acordo com o regime citotóxico, segundo o mecanismo de ação das drogas na proliferação celular e conseqüentes efeitos sobre as diversas fases da mucosite¹⁹¹. Aumento precoce na relação dissacarídeo/monossacarídeo, em torno do segundo dia, foi observada em pacientes com câncer de mama após tratamento com doxorrubicina ou em

pacientes acometidos por sarcoma, tratados com doxorubicina e agentes alquilantes^{192,193}. Aumento máximo na relação dissacarídeo/monossacarídeo foi observado após cerca de uma semana em pacientes tratados com 5-fluoruracil¹⁹⁴. Postula-se que o aumento precoce pós-quimioterapia na relação molécula maior/molécula menor pode ocorrer em resposta às alterações inflamatórias e vasculares observadas nas fases iniciais da mucosite, decorrentes de alterações de osmolaridade dos vilos e desordens das junções firmes por efeito direto das drogas ou das citocinas. Por outro lado, as alterações mais tardias, que ocorrem a partir de sete dias, refletiriam a fase de lesão epitelial caracterizadas por seqüelas morfológicas diversas e redução da proliferação celular¹⁹¹

Essas alterações da permeabilidade intestinal podem estar associadas à gravidade das manifestações clínicas de mucosite, tais como diarréia, vômitos e mucosite oral^{193,194,195}.

As medidas de permeabilidade intestinal têm sido usadas para explorar os danos da mucosa provocados pelos regimes de condicionamento de TCTH, bem como para a avaliação de terapêutica empregada para reduzi-los.

Alterações da permeabilidade têm sido observadas em pacientes com leucemia mielóide aguda antes da quimioterapia de indução, ou antes do condicionamento em pacientes submetidos a TCTH^{196,197}. Autores responsáveis por essas observações apontam a existência de possível disfunção de células imunocompetentes ou infiltrados leucêmicos no trato digestivo¹⁹⁶, ou ainda, ação de citocinas secretadas na presença de leucemia¹⁹⁷. O encontro de alterações de permeabilidade em pacientes com neoplasia de mama antes da quimioterapia foi explicado por meio da secreção

de substâncias como “caquetinas”, resultante da interação tumor-hospedeiro¹⁹². Conforme observado acima, Ryan et al¹⁸⁷ apontaram provável papel de citocinas nas alterações de permeabilidade encontradas em seus pacientes com neoplasia avançada.

Johansson et al² avaliaram as alterações de permeabilidade por meio do ⁵¹Cr-EDTA em pacientes submetidos a TCTH e demonstraram aumento precoce da excreção da molécula-teste, bem como níveis elevados de excreção até o décimo dia pós infusão das células tronco hematopoiéticas, último momento de sua análise. Observaram existir correlação entre mucosite gastrointestinal e alterações de permeabilidade, mas o mesmo não ocorreu com mucosite oral. Destacaram ainda que as alterações precoces de permeabilidade precederam as manifestações clínicas da mucosite. Posteriormente, o mesmo autor usou a mesma metodologia para demonstrar que regimes de condicionamento reduzido provocavam menor lesão da barreira mucosa intestinal¹⁹⁸.

Blijlevens et al¹⁹⁷, usando lactulose e ramnose como substâncias-teste para medida da permeabilidade intestinal em pacientes com diversos tipos de leucemia, síndrome mielodisplásica, linfoma não-Hodgkin e doença mieloproliferativa, submetidos a TCTH, mostrou, além da mencionada alteração de permeabilidade antes do condicionamento, persistência prolongada das alterações de permeabilidade, até quatro semanas após a infusão das células, principalmente à custa do monossacáride ramnose, desde que a excreção da lactulose tendia a se normalizar em tempo menor, de até duas semanas.

Em resumo, as medidas da permeabilidade intestinal sofrem importantes alterações em pacientes submetidos a quimioterapia e TCTH. No TCTH essas

alterações podem preceder o condicionamento e se manterem por período prolongado após a infusão das células tronco. Os testes de permeabilidade têm sido usados para demonstrar a intensidade e a cronologia da lesão da barreira mucosa, bem como para avaliar intervenções que têm como objetivo reduzi-la. Assim como em quimioterapia, as medidas de permeabilidade no TCTH podem se correlacionar com escores de avaliação clínica da mucosite.

Mais recentemente, Johansson e Ekman¹⁹⁹, ao compararem pacientes submetidos a TCTH por regime mieloabativo ou regime de intensidade reduzida de condicionamento, correlacionaram a intensidade da mucosite avaliada pela gravidade clínica e por meio da permeabilidade medida pelo ⁵¹Cr-EDTA, com o desenvolvimento de DECH e sua gravidade. Obtiveram em humanos achados semelhantes aos de modelos animais, em que a associação entre lesão da mucosa intestinal que se segue ao condicionamento, desenvolvimento e gravidade da DECH encontram-se fartamente demonstrados.

4 PACIENTES E MÉTODOS

4.1 Grupos de pacientes

Trata-se de estudo prospectivo, duplo cego e aleatório.

Os pacientes internados para realização de transplante alogênico de células do sistema hematopoiético na Unidade de Transplante de Medula do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais, para tratamento de neoplasias hematológicas, que concordaram em participar do estudo, depois de devidamente esclarecidos e com a assinatura do Consentimento Livre e Informado (Anexo 1), foram alocados aleatoriamente e divididos em dois grupos de estudo, sem conhecimento do grupo para o qual haviam sido designados.

No período de outubro de 2001 a setembro de 2004, 61 pacientes foram selecionados para inclusão no estudo. Destes, 53 foram alocados através do sorteio de números aleatórios gerados pelo programa EPIINFO versão 6 para o Grupo 1 (n=27) e Grupo 2 (n=26).

Grupo 1: 27 pacientes receberam nutrição parenteral enriquecida com o dipeptídeo de glutamina, conforme protocolo descrito em 4.4;

Grupo 2: 26 pacientes receberam nutrição parenteral conforme protocolo do descrito em 4.4

Os oito pacientes restantes não foram incluídos por não desejarem receber a glutamina (cinco pacientes) ou por não haver glutamina disponível na Farmácia no dia de realização do TCTH (três pacientes).

4.2 Critérios de inclusão e exclusão

4.2.1 Critérios de inclusão:

- Idade igual ou superior a 18 anos e igual ou inferior a 65 anos.
- Portadores de neoplasias hematológicas não sólidas

4.2.2 Critérios de exclusão:

- Portadores de insuficiência renal.
- Doenças sistêmicas que interferem com a absorção e fluxo de líquido e solutos (cirrose hepática, insuficiência cardíaca congestiva, insuficiência renal, síndrome nefrótica).

4.3 Cálculo amostral

Com base no estudo de Ziegler et al⁹ obteve-se a incidência de infecção, principal desfecho avaliado por estudos de glutamina e TCTH. A taxa foi de 12,5% (3 casos em 24) no grupo tratado com glutamina e de 47,6% (10 casos em 21) no grupo não tratado, e o inverso do risco relativo encontrado foi de 3,8. Realizou-se o cálculo através do programa Epiinfo versão 6, utilizando-se os níveis de confiança de 90 e 95%.²⁰⁰ Foram obtidos tamanhos de amostra de 51 pacientes com nível de confiança de 90% e 62 pacientes com nível de confiança de 95%.

4.4 Suporte nutricional dos pacientes dos grupos 1 e 2

A solução de dipeptídeo com glutamina foi acrescentada ao frasco de nutrição parenteral na Farmácia, onde a farmacêutica responsável realizou sorteio dos números aleatórios gerados pelo programa EPIINFO versão 6 para alocação dos grupos, que não eram conhecidos pelos médicos assistentes da Unidade de Transplante de Medula Óssea, nem pelo pesquisador.

A nutrição parenteral foi iniciada no dia da infusão das células hematopoiéticas (D0 do TCTH), através da via distal do cateter semi-implantável tipo Hickman, com duração mínima de sete dias e, posteriormente, até que o paciente atingisse 60% de suas necessidades nutricionais pela via oral apenas. A solução parenteral enriquecida com glutamina foi fornecida nos primeiros sete dias, do dia da infusão da medula (D0) ao sexto dia pós-infusão (D+6), retornando após este período para solução parenteral padrão, caso persistisse indicação para seu uso.

A solução utilizada foi preparada com a mistura de 500 mL de aminoácidos cristalinos a 10% com 500 mL de soro glicosado hipertônico a 50% produzindo uma concentração final de glicose a 25% e uma relação caloria/grama de nitrogênio de aproximadamente 110 cal/g de nitrogênio. Foram acrescentadas também as necessidades diárias de eletrólitos, vitaminas e microelementos.

Os pacientes do Grupo 2 receberam esta solução sem modificações. Os pacientes do Grupo 1 tiveram sua solução de aminoácidos parcialmente substituída por solução de alanil-glutamina (Dipeptiven® – N(2)L-alanina-L-glutamina, Fresenius Kabi, Campinas, Brasil). A dose diária de 1,5 a 2 mL/kg

da solução de alanil-glutamina (0,3 a 0,4 g de alanil-glutamina/kg ou 0,2 a 0,27 g/kg de peso corporal de glutamina pura) foi acrescentada aos frascos de nutrição parenteral, retirando-se o volume da solução de aminoácidos que, multiplicado pela sua concentração, equivalesse à massa de alanil-glutamina acrescentada.

Permitiu-se que os pacientes se alimentassem por via oral segundo sua vontade.

4.5 Desfechos avaliados

As variáveis dependentes principais foram a ocorrência de óbito em 100 dias e em seis meses. As secundárias foram incidência e localização de DECH aguda, tempo de internação hospitalar, infecção clinicamente definida e tempo de contagem de leucócitos inferior a 500 células/mm³. A DECH aguda foi classificada em graus de 1 a 4 conforme Przepiorka et al²⁰¹ (tabela 3).

Tabela 3: Classificação clínica da doença enxerto contra hospedeiro²⁰¹

Grau	Estádio			Alteração funcional
	Pele	Fígado	intestino	
0 (sem DECH)	0	0	0	0
1 (leve)	1 a 2	0	0	0
2 (moderado)	1 a 3	1	1	1
3 (grave)	2 a 3	2 a 3	2 a 3	2
4 (risco de vida)	2 a 3	2 a 3	2 a 3	2 a 4

Todos pacientes receberam antibióticos profiláticos, conforme protocolo da unidade. Infecção clínica foi definida como necessidade de se adicionar ou

modificar antimicrobianos conforme julgamento dos médicos da unidade, baseado nos achados clínicos sugestivos de infecção.

4.5.1 Medidas da permeabilidade intestinal

Além disso, os pacientes elegíveis para o estudo foram submetidos ao teste de permeabilidade intestinal na urina de seis horas no primeiro dia após internação (D-6), no sexto dia após a infusão das células (D+6) e no 14^o dia após a infusão das células (D+14) do TCTH. Os parâmetros usados para as medidas de permeabilidade foram: 1) fração de excreção da lactulose, 2) fração da excreção do manitol e 3) relação entre as frações de excreção da lactulose e manitol, correspondente ao quociente entre as duas frações.

Objetivando realizar as medidas de permeabilidade intestinal, os pacientes receberam uma dose de solução isosmolar de 120 mL contendo 6,0g de lactulose (PA Sigma-Aldrich®, Pensilvânia, EUA) e 3,0g de manitol (PA Sigma-Aldrich®, Steinheim, Alemanha). A seguir, foram orientados a permanecer em jejum nas duas horas seguintes à ingestão da substância, podendo, a seguir, se alimentar livremente.

Iniciou-se a marcação de tempo para a coleta da urina de seis horas a partir do momento da ingestão, quando se procedeu também ao esvaziamento da bexiga. Ao término das seis horas, a última micção foi coletada em frascos especiais, graduados e etiquetados, contendo o conservante timerosal (Labsynth, São Paulo, Brasil), e levados para a geladeira. Os frascos foram vedados com tampa de rosca, evitando-se a perda e evaporação. A coleta da urina foi supervisionada pela enfermeira chefe do plantão, pelo pesquisador ou

pelo aluno bolsista de iniciação científica, que voltava à enfermaria para verificar a coleta.

No horário correspondente ao término da coleta da urina de seis horas, o bolsista, o pesquisador ou a enfermeira-chefe recolhiam o frasco com a urina, homogeneizaram seu conteúdo através de movimentos circulares, recolhendo duas alíquotas de 50 mL para dosagem de lactulose e manitol, medindo o volume urinário de seis horas em frascos graduados, desprezando a urina restante a seguir. Os frascos com as alíquotas foram lacrados, etiquetados e encaminhados ao Laboratório do Grupo de Estudos da Barreira Gastrointestinal, Faculdade de Medicina da UFMG, 1º andar, sala 103, Belo Horizonte, MG, para dosagem da lactulose e do manitol.

Para a dosagem das substâncias administradas foi utilizado o aparelho de Cromatografia Líquida de Alta Performance (HPLC), Shimadzu® (Japão), composto por uma bomba injetora, um auto-injetor, um controlador integrado a um “software” que permitia que as leituras fossem interpretadas sob uma plataforma do tipo “workstation”, e um medidor de índice de refração. Dez microlitros de urina, depois de filtrada (filtros Milipore, 0,2 mm, São Paulo, Brazil) e passada por uma resina de troca iônica (Mixed Bed Resin TMD-8, Sigma Chemical Co, St. Louis, Missouri, EUA), eram introduzidos no aparelho através de um auto-injetor. Simultaneamente, uma solução de ácido fosfórico a 0,1% era utilizada na fase móvel a um fluxo pré-determinado de 0,5mL/min. Uma pré-coluna (Supelcogel 33H®, Sigma-Aldrich, Pensilvânia, EUA) e uma coluna (Supelcogel C-610H®, Sigma-Aldrich, Pensilvânia, EUA) foram utilizadas para separação das substâncias. No módulo que operava por índice de refração, amplitudes diferentes de ondas geradas pela solução contendo a

lactulose e o manitol eram captadas e interpretadas pela “workstation”. Na “workstation”, tais leituras de amplitude de onda geravam elementos gráficos sob a forma de curvas, sendo que as áreas sob as mesmas eram lidas pelo aparelho.

Para padronização do teste e o adequado conhecimento dos valores medidos na unidade g/L, foram preparadas soluções com concentrações progressivas conhecidas das duas substâncias e realizada regressão linear simples para elaboração de equação da reta para as mesmas. Os valores obtidos através da leitura pela “workstation” das áreas debaixo das curvas de lactulose e manitol eram colocados na equação das retas para gerar resultados de concentrações dos açúcares nas amostras de urina. A partir destas, calculou-se a excreção dos açúcares que foi expressa em fração de excreção de lactulose e manitol (em relação à dose ingerida) e relação entre os percentuais de excreção da lactulose e manitol.

Foram registradas variáveis correspondentes a fatores prognósticos, possível ou sabidamente relacionadas à maior gravidade e piores desfechos – o risco relacionado ao diagnóstico, o tipo de condicionamento, o tipo de profilaxia da doença enxerto contra hospedeiro, a fonte do enxerto (medula ou sangue periférico), o sexo do doador, a correspondência entre o sexo do doador e do receptor e a faixa etária.

4.6 Análise estatística

A sobrevida em 100 dias e aos seis meses foi analisada através de curvas atuariais de Kaplan-Meier, comparando-se a variável dicotômica uso da

glutamina, nos Grupos 1 e 2, através do teste de *log-rank*, bem como outras variáveis dicotômicas correspondentes aos fatores prognósticos relacionados. Para este fim, utilizou-se o programa estatístico KMSURV²⁰². À análise univariada de Kaplan-Meier, as variáveis que resultassem em valor de *p* inferior a 0,2, seriam colocadas em modelo de regressão de Cox para verificar se permaneciam com significância estatística.

Para a análise atuarial de Kaplan-Meier e sua eventual utilização no modelo de regressão, o risco relacionado ao diagnóstico foi classificado de forma dicotômica como alto ou baixo, conforme os seguintes fatores, reconhecidos como os mais importantes pela literatura^{15,177}: diagnóstico, remissão completa e sua duração, recaída, tempo entre remissão e recaída e, no caso de LMC, fase crônica e sua duração e se acelerada ou blástica.

O condicionamento foi classificado de maneira dicotômica como padrão ou não. O condicionamento considerado padrão foi busulfan 16 mg/kg do dia -7 ao dia -4 e ciclofosfamida 120 mg/kg nos dias -3 e -2. Os condicionamentos não padrão foram aqueles que envolveram fludara ou VP 16, em substituição ou associação ao esquema padrão. Quanto à profilaxia para a doença enxerto contra hospedeiro, foi considerada padrão aquela com ciclosporina A e metotrexate, 15 mg/m² no dia +1 e 10 mg/m² nos dias +3, +6 e +11 e não padrão aquela que não envolvesse o metotrexate.

O teste do qui-quadrado e, quando necessário, o teste exato de Fisher, foram usados para comparação da proporção de desfechos dicotômicos entre os grupos estudados.

Quanto à permeabilidade intestinal, para a comparação de médias em amostras independentes, grupo 1 *versus* grupo 2, foi empregado o teste de t

para amostras não pareadas. Quando os dados não apresentavam distribuição gaussiana foi realizado a comparação de medianas pelo teste de Kruskal-Wallis. Para comparação das medidas no mesmo grupo de pacientes, entre D-6 e D+6 e entre D+6 e D+14, foi utilizado o teste t de Student pareado.

Foi considerado o valor de 5% ($p < 0,05$) como limiar de significância estatística. As análises estatísticas foram realizadas por meio do programa EPIINFO, versão 6.²⁰⁰

A fim de se cotejar os valores obtidos com aqueles encontrados em indivíduos normais, utilizou-se, como ponto de corte, os valores obtidos em estudo prévio²⁰³. Para a relação entre as frações de excreção de lactulose e manitol, bem como para a fração de excreção de lactulose, usou-se a média mais 2 desvios padrão. Para a fração de excreção de manitol, usou-se a média menos 2 desvios padrão.

Para avaliar possível efeito de quimioterapias prévias em pacientes submetidos ao TCTH, convencionou-se definir quimioterapia recente como aquela há menos de 50 dias da admissão do paciente ao hospital para realização do TCTH.

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais (Anexo 2), bem como o Termo de Consentimento.

5 RESULTADOS

5.1 Características demográficas e clínicas

Os principais dados demográficos, clínicos e terapêuticos dos pacientes encontram-se descritos de forma detalhada no Anexo 3.

Em relação aos pacientes que foram submetidos ao sorteio, 14 dos 27 pacientes do Grupo 1 eram do sexo feminino (51,9%) e 14 de 26 no Grupo 2 (53,8%), diferença não significativa. As médias das idades também não mostraram diferença significativa ($37,33 \pm 11,06$ versus $35,96$ anos $\pm 8,71$).

Todos os pacientes eram portadores de neoplasias hematológicas não sólidas, com distribuição semelhante do diagnóstico e de risco relacionado ao diagnóstico em ambos os grupos, conforme resumido na tabela 4.

Tabela 4: Distribuição dos pacientes nos dois grupos, de acordo com os diagnósticos e os riscos a eles relacionados

Diagnóstico		LMC	LMA	LLA	LAS/SMD	Total (risco)	<i>p</i>
Grupo 1	Br	13	2	0	0	15 (55,56%)	0,877
	Ar	4	3	2	3	12 (44,44%)	
	Total (Dx)	17	5	2	3		
Grupo2	Br	13	2	0	0	15 (57,69%)	
	Ar	3	4	3	1	11 (42,31%)	
	Total (Dx)	16	6	3	1		
Total		33	11	5	4	53	

Br = baixo risco; Ar = alto risco; LMC = leucemia mielóide crônica; LMA = leucemia mielóide aguda; LLA = leucemia linfóide aguda; LAS/SMD = leucemia aguda secundária/síndrome mielodisplásica; Dx = diagnóstico

Houve 33 casos de leucemia mielóide crônica, 17 no Grupo 1, sendo quatro de fase acelerada, classificados como alto risco, tendo ocorrido um caso de recidiva pós-TCTH). Dos 16 casos do Grupo 2, três casos foram de fase acelerada, de alto risco, com uma recidiva pós-TCTH.

Foram observados 11 casos de leucemia mielóide aguda, cinco no Grupo 1 e seis no Grupo 2. Em relação a esse diagnóstico, no Grupo 1, três casos eram de recidivas, considerados de alto risco e dois casos de remissão, considerados de baixo risco. No Grupo 2, dos seis casos, quatro eram de recidivas, de alto risco e dois de remissões, de baixo risco.

A frequência de leucemia linfóide aguda foi de dois casos no Grupo 1 e três casos no Grupo 2, todos recidivados e de alto risco.

Houve ainda quatro casos de síndrome mielodisplásica/leucemia aguda secundária, três no Grupo 1 e um no Grupo 2, todos considerados de alto risco.

Assim, entre os 23 casos de risco elevado (43%), ocorreram 12 casos no Grupo 1 (12/27, 44,44%) e 11 no Grupo 2 (11/26, 42,31%), diferença não significativa ($p = 0,877$).

Eventual diferença entre os Grupos 1 e 2 na incidência de suas características terapêuticas foi também avaliada. Conforme a tabela 5, observa-se que não houve significância estatística na análise do tipo de condicionamento, ao tipo de profilaxia para DECH, ao tipo de fonte de células para o TCTH e quanto a eventual discordância de sexo entre doador e receptor.

Dos 53 casos, 41 haviam recebido quimioterapia recente, sendo 21 (77,78%) no Grupo 1 e 20 (76,92%) no Grupo 2, sem diferença estatística.

Tabela 5: Comparação dos aspectos terapêuticos observados nos dois grupos, com referência aos parâmetros condicionamento, profilaxia da DECH, fonte de células e sexo doador/receptor

Parâmetro	Grupo 1 (n=27)	Grupo 2 (n=26)	p
Condicionamento	22 (81,48%)	24 (92,31%)	0,420
Padrão X ã padrão			
Profilaxia DECH	24 (88,89%)	24 (92,31%)	1,000
Padrão X ã padrão			
Fonte	19 (70,37%)	19 (73,08%)	0,829
CTP X MO			
Doador de sexo diferente	16 (59,26%)	11 (42,31%)	0,222
Doador feminino p/ receptor masculino	4 (14,81%)	6 (23,08%)	0,447

CTP = células-tronco periféricas; MO = medula óssea

O índice de massa corporal (IMC) à admissão foi obtido em 25 pacientes do Grupo 1 e em todos os 26 do Grupo 2 e foram semelhantes entre si ($24,99 \pm 5,32$ versus $25,09 \pm 4,08$, respectivamente, $p = 0,940$).

Os pacientes do Grupo 1 receberam em média 23,4g de glutamina por dia, correspondendo a 49% do aporte protéico médio diário por via parenteral. Este correspondeu a 47,9g no Grupo 1 e 50 g/dia no Grupo 2, diferença não significativa. Este aporte protéico correspondeu a um aporte calórico médio por via parenteral de 1000 calorias/dia nos dois grupos.

5.2 Avaliação da sobrevida

Aos 100 dias, a sobrevida global foi de 73,58% (14 óbitos), 85,19% (4 óbitos) no Grupo 1 e 61,54% (10 óbitos) no Grupo 2. Aos 180 dias, a sobrevida global foi de 60,38 (21 óbitos), 74,07% (7 óbitos) no Grupo 1 e 46,15% no Grupo 2 (14 óbitos).

Análise de sobrevida de Kaplan-Meier para o uso de glutamina, bem como para os diversos fatores prognósticos, mostrou diferença cujo valor de p era inferior a 0,2 apenas para uso de glutamina em 100 e 180 dias (tabela 6, figura 1).

Tabela 6: Análise de sobrevida (*log-rank*) aos 100 e 180 dias para os diversos fatores prognósticos, analisados dicotomicamente

Fator prognóstico	p (log-rank) 100 d	p (log-rank) 180 d
Glutamina (Grupo 1 X Grupo 2)	0,052	0,027
Sexo (M X F)	0,846	0,609
Risco (baixo X alto)	0,424	0,540
Condicionamento (padrão X ã padrão)	0,256	0,420
Profilaxia DECH (padrão X ã padrão)	0,289	0,730
Idade (até 40 X >40)	0,981	0,560
Fonte (CTP X MO)	0,424	0,340
Coincidência de sexo doador-receptor	0,364	0,769

(CTP X MO): célula tronco periférica X medula óssea; M = masculino; F = feminino; d = dias

Todos os outros fatores prognósticos avaliados apresentaram valores de p tanto aos 100, quanto aos 180 dias, superiores a 0,2. Dessa forma, optou-se por não realizar análise de regressão de Cox.

A diferença da sobrevida entre os Grupos 1 e 2 aproximou-se da significância estatística aos 100 dias ($p = 0,052$, *log-rank*) e atingiu significância estatística aos 180 dias ($p = 0,028$, *log-rank*, figura 1).

A fim de se analisar eventual influência da exclusão dos casos não randomizados no estudo estatístico, a análise da sobrevida foi feita também com a inclusão dos oito casos não randomizados no grupo que não usou a glutamina.

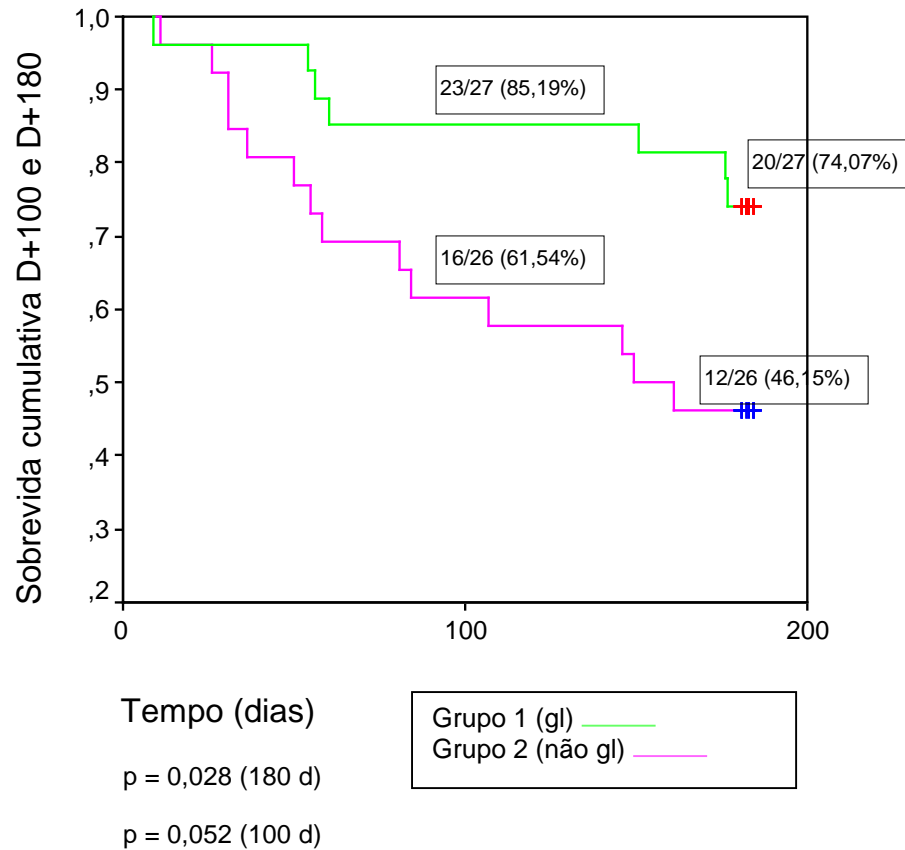


Figura 1: Gráfico representativo da sobrevivência cumulativa aos 100 e 180 dias: Grupo 1 X Grupo 2

Ao se realizar esta inclusão, a análise evidenciou sobrevivência aos 100 dias de de 85,19% (quatro óbitos em 27 pacientes) no Grupo 1 e 58,82% (14 óbitos em 34 pacientes) no Grupo 2 ($p = 0,025$). Aos 180 dias a sobrevivência foi de 74,07% (sete óbitos em 27 pacientes) no Grupo 1 e 47,06% (18 óbitos em 34 pacientes) no Grupo 2 ($p = 0,023$).

Maior mortalidade global (14 pacientes) e por grupo (quatro no Grupo 1 e 10 no Grupo 2) ocorreu antes de D+100 em comparação ao período subsequente (tabela 7). Frequência mais elevada de DECH como causa de morte ocorreu no Grupo 2 (75%) em comparação com o Grupo 1, embora sem significância estatística ($p = 0,156$). Observa-se que dos oito óbitos por DECH,

seis (75%) ocorreram antes do D+100, sendo cinco no grupo 2. Três casos de falha do enxerto ocorreram no Grupo 2.

Tabela 7: Momentos e causas de morte nos dois grupos estudados (Grupos 1 e 2)

Causas de morte	Momento			
	Grupo1 (n=27)		Grupo 2(n=26)	
	D100	D180	D100	D180
DECH	1	2	5	6
Infecção	2	3	3	4
Falha do enxerto	0	0	2	3
Recidiva	0	1	0	1
SARA	1	1	0	0
Mortalidade cumulativa	15%	26%	38%	54%

SARA = síndrome da angústia respiratória do adulto

5.3 Desfechos secundários

Houve 17 casos (62,96%) de DECH agudo no Grupo 1 e 14 casos no Grupo 2 (53,85%), diferença não significativa ($p=0,505$). A distribuição da DECH conforme a localização e gravidade encontra-se discriminada na tabela 8.

Em relação à gravidade da DECH (tabela 8), dos 17 casos do Grupo 1, 10 casos (58,82%) foram classificados como graus 1 e 2 e sete casos (41,18%) classificados como graus 3 e 4. No Grupo 2, seis casos (35,71%) foram classificados como graus 1 e 2 e oito casos (64,29%) como graus 3 e 4, diferença não significativa ($p=0,384$).

O trato digestivo foi envolvido isoladamente, ou em associação, em 20 casos, 11 no Grupo 1 e nove no Grupo 2. Acometimento em grau 3-4 do trato digestivo ocorreu em seis pacientes no Grupo 1 e sete no Grupo 2, diferença não significativa (tabela 8). Dez pacientes que faleceram antes do D+100

tiveram DECH do trato digestivo. Embora nem todas estas mortes possam ser necessariamente atribuídas à DECH, sete (seis antes de D+100) de nove pacientes que desenvolveram DECH do trato digestivo no Grupo 2 morreram, enquanto somente três de 11 (todos antes de D+100) com DECH do trato digestivo no Grupo 1 vieram a falecer.

Tabela 8: Localização e gravidade da DECH nos grupos estudados (Grupos 1 e 2)

Local Grau	Grupo 1		Grupo 2		Total
	1-2	3-4	1-2	3-4	
pele + trato digestivo	4	4	1	1	10
Pele	5	0	2	1	8
trato digestivo	1	1	1	2	5
pele + fígado + trato digestivo	0	1	0	4	5
pele + fígado	0	1	1	1	3
Fígado	0	0	0	0	0
Total	10	7	6	8	31

A média do tempo de internação dos dois grupos foi semelhante: 39,44 \pm 12,02 dias para o Grupo 1 e 38,35 \pm 11,59 dias para o Grupo 2 ($p=0,736$).

Vinte e um de 27 (77,78%) pacientes do Grupo 1 usaram antibióticos e/ou antifúngicos com objetivo terapêutico, caracterizando infecção clinicamente definida. No Grupo 2, 24 dos 26 (92,31%) pacientes apresentaram infecção clinicamente definida. Não houve significância estatística ($p=0,250$). Outros dados relativos a infecções encontram-se no Anexo 4 e, assim como nos dados referentes à infecção clínica, apesar de tendência de menor

incidência de infecção, segundo os parâmetros avaliados, sem diferenças significativas entre os grupos.

Em relação ao tempo em que a contagem dos leucócitos permaneceu abaixo de $500/\text{mm}^3$, este período foi de $8,59 \pm 2,99$ dias no Grupo 1 e $10,89 \pm 6,36$ dias no Grupo 2, diferença não significativa ($p=0,177$).

5.3.1 Medidas da permeabilidade intestinal

Dos 53 pacientes estudados, foram obtidas amostras para medida da permeabilidade intestinal em 45 (84,90%) pacientes no D-6, 47 (88,68%) no D+6 e 38 (71,70%) no D+14. Em um paciente no D-6, dois pacientes no D+6 e dois pacientes no D+14, apenas a relação lactulose/manitol foi analisada, por perda do registro do volume urinário. No restante, foram analisados a fração de excreção urinária dos dois açúcares e a relação entre suas frações de excreção.

Os principais resultados das medidas de permeabilidade, conforme o momento do estudo, encontram-se descritos na tabela 9.

Tabela 9: resultados das medidas de permeabilidade intestinal de acordo com o momento da medida, no conjunto dos pacientes estudados

Medida	N	Mínimo	Máximo	Média	Desvio padrão
Lactulose D-6	44	0,001	0,540	0,145	0,096
Lactulose D+6	45	0,030	0,440	0,178	0,098
Lactulose D+14	36	0,050	0,430	0,181	0,091
Manitol D-6	44	0,040	0,420	0,186	0,084
Manitol D+6	45	0,016	0,280	0,137	0,062
Manitol D+14	36	0,010	0,190	0,089	0,042
Rel. lact/manitol D-6	45	0,006	3,500	0,802	0,628
Rel. lact/manitol D+6	47	0,430	3,440	1,426	0,710
Rel. lact/manitol D+14	38	0,740	4,300	2,066	0,988

D-6 = 6^o dia pré-infusão das células hematopoiéticas; D+6 = 6^o dia pós-infusão das células; D+14 = 14^o após infusão das células; Rel. lact/manitol = relação lactulose / manitol

As causas para não obtenção das medidas de permeabilidade intestinal foram a não aceitação por parte dos pacientes devido a quadros clínicos de mucosite oral, diarreia ou infecção, ou a não disposição em acordar para o exame. O uso da glutamina não alterou as medidas da permeabilidade intestinal, como nos mostra a comparação não pareada de suas médias entre os Grupos 1 e 2, que não revelou significância estatística (tabela 10).

Tabela 10: Comparação não pareada das médias das medidas de permeabilidade intestinal entre os pacientes do Grupo 1 e do Grupo 2

	Grupo	<i>n</i>	Média	<i>P</i>
Lactulose D-6	1	23	0,154 ±0,080	0,533
	2	21	0,136 ±0,112	
Lactulose D+6	1	22	0,178 ±0,104	0,992
	2	23	0,178 ±0,094	
Lactulose D+14	1	21	0,188 ±0,101	0,586
	2	15	0,171 ±0,077	
Manitol d-6	1	23	0,185 ±0,089	0,898
	2	21	0,188 ±0,080	
Manitol D+6	1	22	0,126 ±0,057	0,236
	2	23	0,148 ±0,066	
Manitol D+14	1	21	0,087 ±0,032	0,775
	2	15	0,091 ±0,053	
Rel. lact/manitol D-6	1	23	0,882 ±0,717	0,389
	2	22	0,718 ±0,523	
Rel. lact/manitol D+6	1	24	1,525 ±0,752	0,334
	2	23	1,322 ±0,663	
Rel. lact/manitol D+14	1	22	2,163 ±1,043	0,483
	2	16	1,932 ±0,922	

D-6 = 6^o dia pré-infusão de células hematopoiéticas; D+6 = 6^o dia pós-infusão de células; D+14 = 14^o pós-infusão de células; Rel. lact/manitol = relação lactulose / manitol

Houve redução progressiva, indicativa de piora, das médias das diferenças do percentual de excreção do manitol, ainda baixo em D+14, bem como aumento progressivo, também indicativo de piora, da relação entre os percentuais de excreção da lactulose e do manitol (tabela 11).

Tabela 11: Média pareada das diferenças das medidas de permeabilidade intestinal entre os diversos momentos do estudo (sem distinção de grupo)

Medida	<i>n</i>	Médias	média das difs.	<i>p</i>
lactulose D-6	38	0,141 ± 0,099		
lactulose D+6	38	0,178 ± 0,091	-0,037 ± 0,131	0,092
lactulose D+6	31	0,179 ± 0,097		
lactulose D+14	31	0,180 ± 0,093	-0,001 ± 0,123	0,954
lactulose D-6	31	0,141 ± 0,074		
lactulose D+14	31	0,180 ± 0,091	-0,040 ± 0,106	0,044
manitol D-6	38	0,182 ± 0,087		
manitol D+6	38	0,135 ± 0,060	0,047 ± 0,094	0,004
manitol D+6	31	0,143 ± 0,060		
manitol D+14	31	0,094 ± 0,038	0,049 ± 0,062	<0,001
rel. lact/manitol D-6	41	0,812 ± 0,650		
rel. lact/manitol D+6	41	1,460 ± 0,655	-0,648 ± 0,721	<0,001
rel. lact/manitol D+6	34	1,366 ± 0,668		
rel. lact/manitol D+14	34	1,974 ± 0,878	-0,608 ± 0,930	0,001

Média das difs. = média das diferenças; D-6 = 6^o dia pré-infusão de células hematopoiéticas; D+6 = 6^o dia pós-infusão de células; D+14 = 14^o pós-infusão de células; Rel. lact/manitol = relação lactulose / manitol

Não houve aumento significativo dos percentuais de excreção da lactulose entre D-6 e D+6, bem como entre D+6 e D+14, embora tenha ocorrido aumento significativo entre D-6 (média = 0,141 ± 0,074) e D+14 (0,180 ± 0,091), com média das diferenças de 0,040 ± 0,106 (*p*=0,044). Essas alterações encontram-se ilustradas nas figuras 2, 3 e 4.

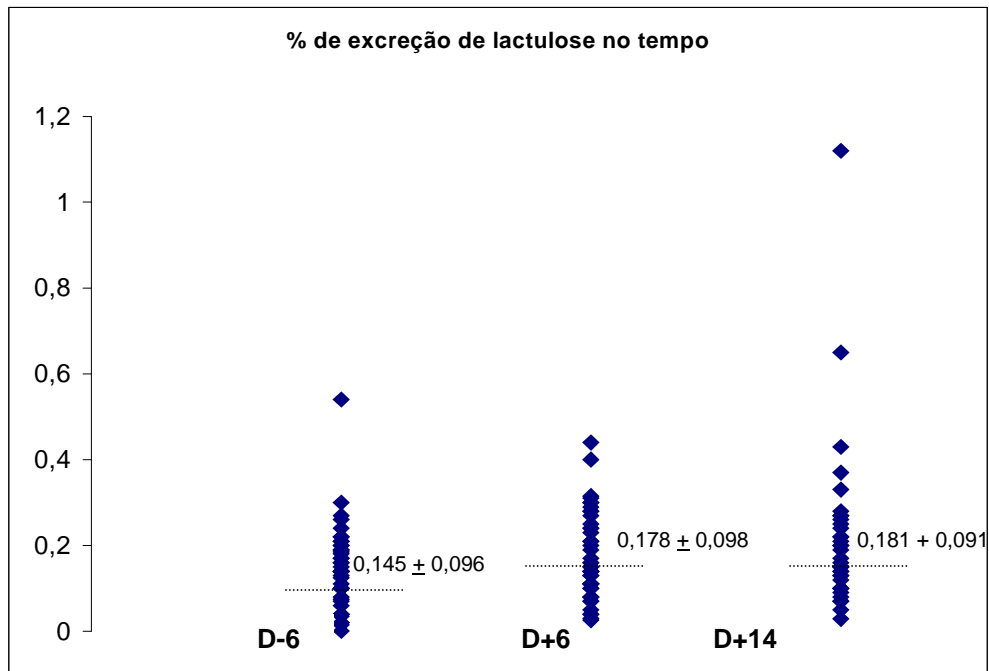


Figura 2: Gráfico representativo das frações de excreção de lactulose e suas médias em D-6, D+6 e D+14

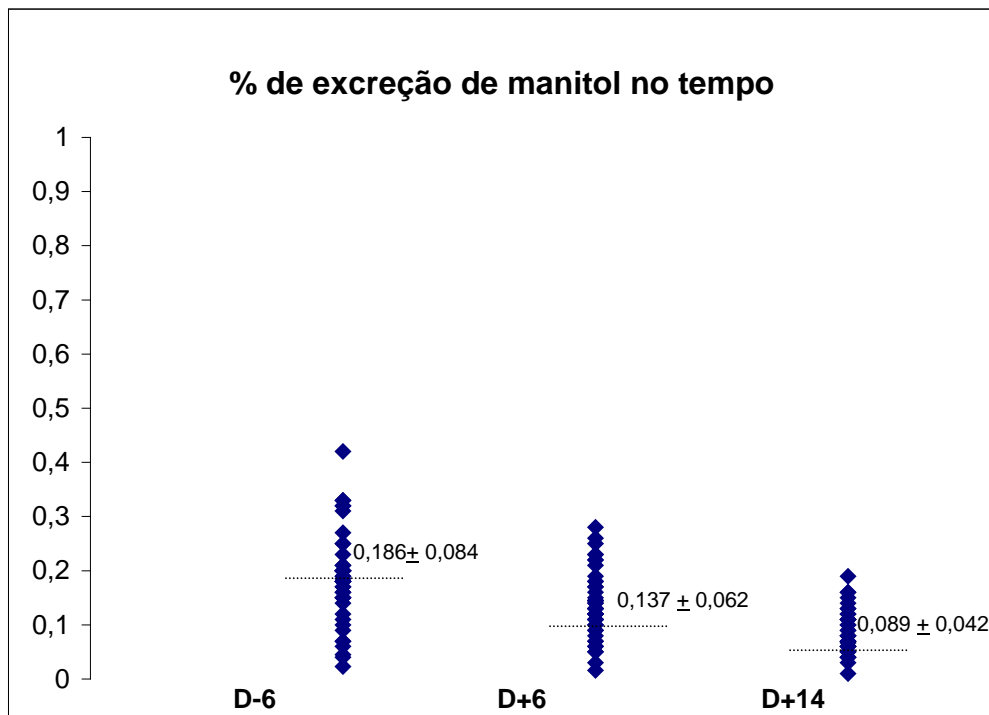


Figura 3: Gráfico representativo das frações de excreção de manitol e suas médias em D-6, D+6 e D+14

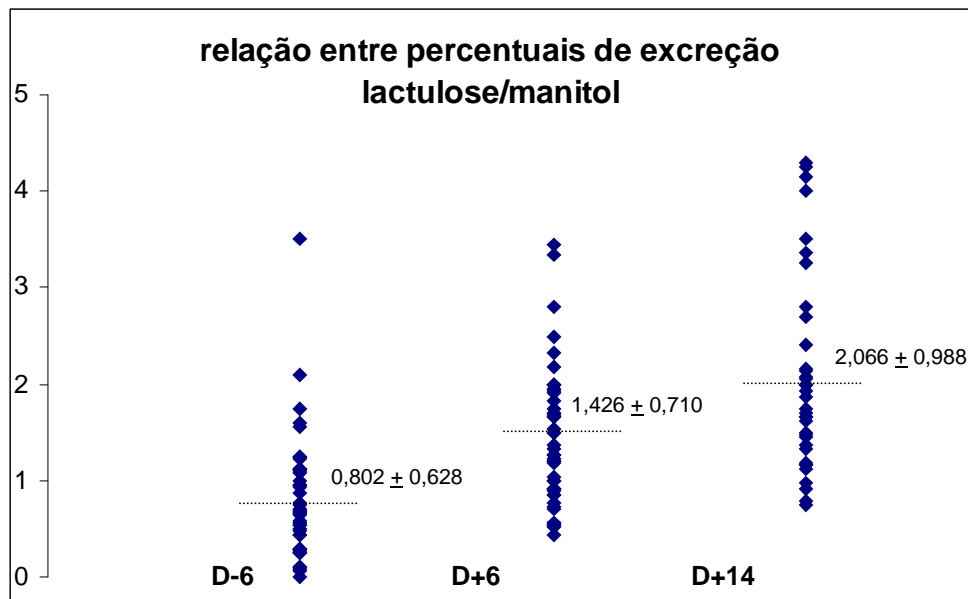


Figura 4: Gráfico representativo da relação entre as frações de excreção de lactulose e manitol e suas médias em D-6, D+6 e D+14

Com referência aos controles normais, a maior parte das 45 observações das medidas iniciais (D-6) da relação entre as frações de excreção da lactulose e do manitol encontrava-se alterada, com apenas seis (13,3%) das medidas abaixo da média mais dois desvios padrões dos controles normais. A maior parte das 44 observações das medidas da fração de excreção de lactulose também encontrava-se alterada antes do TCTH, com apenas oito (18,2%) abaixo da média mais dois desvios padrões. Das 44 observações das medidas da fração de excreção do manitol, a maioria encontrava-se dentro da normalidade, com 39 observações (88,6%) acima da média menos dois desvios padrões.

5.3.1.1 Relação entre realização de quimioterapia recente e permeabilidade intestinal.

A realização de quimioterapia recente não apresentou diferença detectável ao teste do qui-quadrado com as medidas iniciais (D-6) da permeabilidade intestinal avaliadas dicotomicamente, utilizando-se pontos de corte definidos a partir de controles normais. Alterações de permeabilidade intestinal foram observadas mesmo em pacientes não submetidos a quimioterapia recente, assim como alterações de permeabilidade não ocorreram de forma sistemática nos pacientes submetidos a quimioterapia recente (tabela 12)

Tabela 12: Medidas de permeabilidade intestinal em D-6 em pacientes submetidos a quimioterapia recente em toda a casuística estudada, sem distinção dos grupos

Medidas da PI		QT recente		p
		sim (n)	não (n)	
relação	Normal	6	0	0,311
L/M	Elevada	28	11	
lactulose	Normal	7	1	0,656
	Elevada	26	10	
Manitol	Normal	23	6	0,468
	Baixo	10	5	

QT = quimioterapia; Relação L/M = relação lactulose / manitol; PI = permeabilidade intestinal

Ao se comparar também as diferenças das médias das medidas de permeabilidade intestinal entre pacientes submetidos ou não a quimioterapia recente, não se observaram diferenças significativas. Pacientes que realizaram quimioterapia recente ($n=33$) apresentaram relação lactulose/manitol de $0,797 \pm 0,664$ e aqueles que não a fizeram ($n=11$) apresentaram valores médios

0,949 \pm 0,483 ($p=0,902$). Não houve também diferença nos percentuais de excreção de lactulose (0,146 \pm 0,104 X 0,150 \pm 0,073, $p=0,902$), nem de manitol (0,188 \pm 0,089 X 0,179 \pm 0,078, $p=0,758$).

Para se avaliar a influência do tipo de quimioterapia recente nas medidas de permeabilidade intestinal, os pacientes portadores de leucemias não mielóides crônicas foram agrupados. Dos 21 pacientes portadores de outras leucemias que não a mielóide crônica, 13 haviam sido submetidos a QT recente. Ao se compararem as médias das relações da fração de excreção da lactulose/manitol neste grupo de leucemias não mielóides crônicas, o grupo submetido a quimioterapia recente apresentou valores médios de 0,813 \pm 0,910 e o grupo não submetido a esse tratamento mostrou valores de 1,036 \pm 0,554 ($p=0,250$). Não houve também diferença estatística quanto à lactulose (0,100 \pm 0,73 X 0,161 \pm 0,075, $p=0,094$) e ao manitol (0,145 \pm 0,084 X 0,189 \pm 0,092, $p=0,299$).

5.3.1.2 Relação entre medidas de permeabilidade intestinal e desfechos

As diferenças das médias não pareadas das medidas de permeabilidade intestinal relacionadas aos desfechos óbito aos 100 dias e 180 dias, ocorrência de DECH grave (graus 3 e 4) e infecção clinicamente determinada, encontram-se registradas no Anexo 5.

Observou-se que os casos de óbito aos 100 dias apresentaram valores significativamente mais elevados da fração de excreção de lactulose em D+14 (0,250 \pm 0,109), em relação aos sobreviventes (0,164 \pm 0,076, $p = 0,014$). As observações desse parâmetro foram realizadas em 36 pacientes (67,92%) da amostra estudada.

Foi possível verificar também diferença com significância estatística entre pacientes que apresentaram DECH grave (graus 3 e 4), quanto às medidas da fração de excreção de lactulose e da relação das frações de excreção da lactulose/manitol antes de se realizar o TCTH (D-6). No caso da fração de excreção de lactulose, pacientes que apresentaram DECH grave mostraram valores mais elevados ($0,190 \pm 0,108$) que aqueles que não apresentaram ou exibiram formas leves ($0,122 \pm 0,082$, $p = 0,025$). Quanto à relação das frações de excreção da lactulose/manitol, ocorreu o mesmo. As médias do grupo mais grave foram de $1,159 \pm 0,811$, contra $0,623 \pm 0,426$ no grupo menos grave ($p = 0,013$). Nesse último caso, como a análise de variância não revelou distribuição normal, foi usado o teste de Kruskal-Wallis. As medianas foram, respectivamente, de 0,950 e 0,570.

Ao se aplicar os pontos de corte anteriormente mencionados para valores da relação das frações de excreção da lactulose/manitol e da fração de excreção da lactulose, com o objetivo de se comparar as proporções de pacientes acima e abaixo do ponto de corte quanto à incidência de DECH grave, observou-se significância estatística para a fração de excreção da lactulose e, nessa circunstância o valor de p manteve-se próximo à significância, para a relação das frações de excreção da lactulose/manitol (tabela 13).

Tabela 13: Proporções de pacientes acima e abaixo dos pontos de cortes da relação entre as frações de excreção da lactulose/manitol e da fração de excreção de lactulose em D-6 quanto à incidência de DECH grave (sem distinção de grupo)

DECH				
Medida	não grave	Grave	Total	<i>P</i>
rel. lac/man ↔	7	0	7	0,077
rel. lac/man ↑	23	15	38	
Total	30	15	45	
lactulose ↔	8	0	8	0,037
lactulose ↑	21	15	36	
Total	29	15	44	

rel. lac/man ↔: relação entre as taxas de excreção lactulose/manitol normal; rel. lac/man ↑: relação entre as taxas de excreção lactulose/manitol aumentada; lactulose ↔: taxa de excreção de lactulose normal; lactulose ↑: taxa de excreção de lactulose aumentada

6 DISCUSSÃO

6.1 Aspectos metodológicos

6.1.1 Randomização

Foi realizado estudo aleatório, cego, sendo o sorteio dos participantes promovido pela farmacêutica responsável pelo preparo da nutrição parenteral, sem conhecimento dos pesquisadores ou dos médicos assistentes. O aspecto dos frascos de nutrição parenteral era idêntico, não permitindo identificação dos mesmos.

Oito casos potenciais não foram incluídos na randomização, cinco pacientes por não consentirem em participar do estudo e três por não haver glutamina disponível.

Aspecto a se avaliar refere-se à melhor abordagem metodológica para tratar as exclusões, especialmente a utilização de análise por intenção de tratamento. As análises por intenção de tratamento, em oposição às análises de eficácia, procuram levar em conta as situações do mundo real, em que os pacientes estariam submetidos aos efeitos colaterais e outros fatores relacionados que dificultariam adesão ao tratamento avaliado. Nos ensaios clínicos, estes são eventos pós-randomização que a análise por intenção de tratamento busca abordar²⁰⁴. Entretanto, a recusa em fazer parte de um estudo não tem o mesmo significado que não adesão. A recusa constitui um evento pré-randomização, não passível de abordagem a partir de análise por intenção de tratamento.

Outro aspecto a ser considerado é que, uma vez que um paciente concordasse em participar do estudo e fosse incluído na randomização, seria pouco provável que houvesse problemas de adesão, já que o aminoácido encontrava-se associado à nutrição parenteral, a ser ministrada em veia central já puncionada, como parte do tratamento rotineiro conhecido dos pacientes.

Por outro lado, a falta do medicamento poderia ser considerada evento pós-randomização. Entretanto, a decisão de incluir na randomização um paciente para o qual o medicamento houvesse faltado não é simples. A falta do medicamento não constitui evento rotineiro em hospital, passível de ser considerado evento pós-randomização característico, a ser levado em conta na análise do tipo intenção de tratamento. No caso em questão, a falta da glutamina ocorreu porque o aminoácido não fazia parte do formulário do Hospital das Clínicas e era fornecida de acordo com as necessidades do estudo pelo laboratório fabricante. Este fluxo dependia de que as informações da Unidade de Transplantes sobre data de internação e número de pacientes passassem pela farmácia e chegassem ao fornecedor. Nas três ocasiões mencionadas esta seqüência não ocorreu de maneira satisfatória. Pelas razões mencionadas e levando-se em conta as justificativas para não realização de análise por intenção de tratamento, considerada como aspecto importante na qualidade de ensaios clínicos, entende-se que este pode ser considerado um estudo de eficácia.

6.1.2 Obtenção de parâmetros para definição do tamanho da amostra

A obtenção de parâmetros para a definição da amostra foi dificultada, em virtude da ausência de esclarecimento desses critérios nos estudos sobre

suplementação de glutamina associada à nutrição parenteral em TCTH e pela grande variedade de desfechos avaliados nos mesmos, o que poderia implicar em diferentes cálculos de amostra para cada tipo de desfecho. Dúvidas existiram sobre qual desfecho usar para obtenção de risco relativo e razão de chances para os cálculos, bem como se o desfecho em questão era aquele clinicamente mais relevante.

Tendo em vista essas considerações, foi realizado cálculo de tamanho amostral com o objetivo de balizar o recrutamento dos pacientes, baseando-se no estudo sobre glutamina em nutrição parenteral e TCTH considerado de melhor qualidade metodológica, o elaborado por Ziegler et al⁹, e escolhendo-se o desfecho infecção clínica como o de maior importância clínica naquele estudo.

A interrupção do estudo com 53 pacientes recrutados, amostra intermediária entre os 51 pacientes para o nível de confiança de 90% e 62 pacientes para o nível de 95%, se deveu a diversas razões. Conforme sugere o pequeno tamanho de amostra dos estudos envolvendo a suplementação de glutamina venosa a pacientes submetidos a TCTH ($n= 45, 29, 34, 40, 27$ e 35 , tabela 2)^{9,10,169,172,173,174}, a obtenção de sujeitos de pesquisa a partir de um único centro é trabalhosa, uma vez que o procedimento envolve várias etapas e longo período preparatório, até a realização do enxerto das células hematopoiéticas do doador. Esta dificuldade fica evidenciada pelo período de recrutamento dos estudos mencionados que, quando explicitado nos artigos, variou entre 11 meses e três anos, mesmo em centros transplantadores importantes. No caso do estudo de Schloerb e Amare¹⁰, de menor duração (11 meses), o n foi de 29 pacientes e incluiu transplantes alogênicos ($n = 13$) e

autólogos, estes de mais fácil recrutamento²⁹. Blijlevens et al¹⁷⁴ levou 3 anos para recrutar 35 pacientes submetidos a transplante alogênico.

No caso específico de nosso estudo, a homogeneidade da amostra, importante aspecto metodológico, foi obtida graças ao predomínio absoluto de pacientes leucêmicos ($n = 53$), especificamente aqueles com leucemia mielóide crônica ($n = 33$, 62,26%). Próximo à época do final do estudo, cerca de três anos após seu início, o mesilato de imatinibe, que já era disponível pelo Sistema Único de Saúde desde 2001, por meio de portaria do Ministério da Saúde, como segunda escolha para o tratamento da leucemia mielóide crônica, contribuiu significativamente para a redução dos pacientes com leucemia mielóide crônica indicados para TCTH, dificultando assim a captação de pacientes.

O estudo foi interrompido após atingir 53 pacientes randomizados, levando-se em consideração os aspectos mencionados e o fator de se haver alcançado nível de confiança de mais de 90%, conforme os cálculos realizados.

De qualquer maneira, considerando-se as dificuldades para o estabelecimento do tamanho de amostra adequado, apesar de nosso estudo apresentar o maior número de pacientes em meio à literatura consultada sobre suplementação de glutamina em TCTH, pode ocorrer a possibilidade de que a redução de mortalidade observada tenha acontecido ao acaso. Para isso concorrem, tanto o nível de confiança no cálculo da amostra, quanto o fato de não ter havido cálculo específico para o desfecho mortalidade.

6.1.3 Controle de variáveis com potencial de confundimento

Conforme comentado na revisão, os estudos existentes sobre o uso de glutamina padecem da grande variedade de neoplasias tratadas, o que implica na existência de diversos protocolos de condicionamento e da mistura que ocorre, em diversos deles, de pacientes submetidos a transplantes autólogos e alogênicos. Essa variabilidade resulta, conseqüentemente, em variabilidade de efeitos colaterais e curso clínico pós-transplante, com diferença de intensidade da mucosite, mielossupressão, infecção, doença enxerto contra hospedeiro e alterações nutricionais.

Embora a metanálise realizada por Murray e Pindoria⁸ sugira efeitos positivos da suplementação venosa de glutamina na incidência de hemoculturas positivas e no tempo de hospitalização, a observação cuidadosa dos três artigos selecionados pelos autores aponta para a existência dos problemas mencionados em dois deles, que incluem, apesar de randomização, grande variedade de neoplasias, inclusive sólidas, e mistura de transplantes autólogos e alogênicos^{10,169}.

A mortalidade precoce em TCTH, considerada aquela que ocorre até 100 dias, decorre basicamente de infecção, doença enxerto contra hospedeiro e disfunção de múltiplos órgãos. Esta mortalidade precoce é inferior em transplantes autólogos, em comparação aos alogênicos¹⁶. Além disso, os transplantes autólogos não padecem da DECH, tornando, dessa forma, a mistura de casuística de transplantes autólogos e alogênicos na avaliação do desfecho de curto prazo criticável do ponto de vista metodológico. Ressalte-se ainda o estudo de Pytlik et al¹⁷², que evidenciou piores resultados, incluindo mortalidade, com a suplementação de glutamina em pacientes submetidos a

TCTH autólogo. Na eventualidade dessa ocorrência, a inclusão de estudos em TCTH autólogo pode obscurecer eventuais resultados positivos da glutamina em transplantes alogênicos.

Outro aspecto mencionado de forma superficial na metanálise diz respeito ao risco do paciente no momento do transplante, relacionado ao diagnóstico e ao estágio da doença – se os pacientes estavam ou não em remissão, se houve recaídas prévias, ou se estavam em fase acelerada no caso das leucemias mielóides crônicas. Os três artigos selecionados pela metanálise de Murray e Pindoria⁸ não fazem menção a este tipo de viés possível. Dos demais sobre glutamina intravenosa, apenas o de Piccirillo et al¹⁷³ menciona estratificação segundo o risco. Os estudos que usaram glutamina por via oral padecem igualmente da grande variedade de diagnósticos e tipos de transplantes e, da mesma maneira, não estratificam os pacientes conforme o risco da doença.

Embora a associação entre estágio da doença e óbitos por recaída seja evidente, à primeira vista, no entanto, a ligação entre o estágio e óbitos precoces por complicações do transplante não parece muito clara. Todavia, esta vinculação já foi estabelecida. A mortalidade aos 100 dias depois de transplante alogênico com doador HLA-idêntico varia entre 10% e 15% para pacientes com formas de leucemia avaliadas como de menor risco e 20% e 30% para formas avançadas, de maior risco e se justifica pelo estado clínico dos pacientes, após recaídas e quimioterapias diversas¹⁷⁶.

Dessa forma, a randomização realizada garantiu a formação de grupos comparáveis em relação aos diagnósticos e riscos (tabela 4), além das

semelhanças quanto à idade, sexo, regime de condicionamento, profilaxia da DECH, fonte do enxerto e coincidência de sexo do doador e receptor (tabela 5).

6.1.4 Aspectos nutricionais

Os pacientes eram semelhantes do ponto de vista nutricional, com IMCs comparáveis.

Embora o papel da nutrição parenteral em TCTH esteja sendo questionado²⁰⁵, na época em que o estudo foi realizado, o uso da nutrição parenteral constituía padrão de cuidado para pacientes submetidos ao TCTH, de acordo com Weisdorf et al⁶ que indicavam aumento da sobrevida em seis meses em pacientes que usavam nutrição parenteral a partir da data da infusão das células hematopoiéticas.

Foi possível garantir que os pacientes dos dois grupos recebessem a mesma quantidade de proteínas e calorias por via parenteral. Embora a quantidade oferecida tenha sido inferior às necessidades calórico-protéicas da maioria dos pacientes, estes se encontravam liberados para alimentar segundo sua vontade. Considerando a necessidade calórica em torno de 1800 calorias e protéica em torno de 60g em paciente de 60 kg, a oferta calórica parenteral foi superior a 50 % e a oferta protéica próxima de 80% das necessidades diárias para a maioria dos pacientes. Dessa forma, a complementação oral da dieta permitia alcançar aporte calórico-protéico próximo da necessidade diária. Nossa opção em não fornecer o aporte total pela via parenteral deveu-se exatamente à possibilidade de complementação oral, que poderia elevar o fornecimento a quantidades superiores às necessidades diárias, caso o aporte parenteral fosse igual às necessidades. Tal possibilidade aumentaria o risco de

complicações relacionadas à nutrição parenteral, em especial aquelas relacionadas ao chamado “overfeeding”, ou seja, hiperglicemia, retenção de escórias nitrogenadas e alteração da função hepática.

Não foi possível, por razões operacionais, registrar o aporte calórico-proteico correspondente à ingesta oral, de tal forma que não se pode garantir que tenham sido semelhantes nos dois grupos, fato que se constitui em possível razão de erro. Entretanto, a observação dos pacientes e a homogeneidade existente nos grupos, permite supor que as dificuldades de alimentação decorrentes da quimioterapia de condicionamento, encontravam-se igualmente distribuídas nos dois grupos.

A dose ideal de glutamina não é ainda conhecida⁷⁶. Embora os trabalhos de Ziegler et al⁹ e Scholterb e Amare¹⁰ tenham usado doses de 0,57g/kg/dia de glutamina, significativamente superiores às de 0,2 a 0,27 g/kg dia usadas em nosso estudo, outros autores utilizaram doses também inferiores, como 13,46 g/dia^{172,173} e 0,38 g/kg/dia¹⁷⁴.

Revisão sistemática que avaliou o papel da glutamina em estudos de pacientes de terapia intensiva dividiu arbitrariamente os pacientes em grupos de dose baixa e dose elevada de glutamina, com um ponto de corte de 0,20 g/kg/dia. Os dados obtidos nesse trabalho sugerem que doses elevadas encontram-se associadas a melhores resultados terapêuticos. A dose usada em nosso estudo, de 0,3 a 0,4 g/kg/dia do dipeptídeo, corresponde a 0,2 a 0,27g/kg/dia de glutamina pura, portanto, dentro da faixa de dose elevada, especificada por Novak et al⁷⁶.

6.2 Análise dos desfechos

6.2.1 Sobrevida e desfechos secundários

A análise da sobrevida cumulativa mostra-nos melhora, tanto aos 100 dias ($p = 0,052$), quanto aos 180 dias ($p = 0,028$). Esta melhora da sobrevida deveu-se principalmente à redução da mortalidade antes dos 100 dias. Conforme já mencionado (tabela 7), a mortalidade aos 100 dias foi de 15% no Grupo 1, contra 38% no Grupo 2, mas, após o D+100, correspondeu a 11% no Grupo 1 contra 15% no Grupo 2. Se levarmos em consideração o caso de recaída ocorrido em cada grupo, evento não afetado pela glutamina, esse resultado pode ser ainda mais expressivo. Embora esses números sejam pequenos e não permitam atingir significância estatística, podem sugerir que um suposto efeito da glutamina teria ocorrido antes de D+100.

A análise das causas de morte evidenciou, como principais fatores antes do D+100, DECH e infecção. Ainda que a incidência de DECH grave, de grau 3 e 4 não seja diferente nos grupos, 75% (6/8) das mortes associadas a DECH ocorreram no Grupo 2, cinco delas antes de D+100. O intestino foi envolvido pela DECH, isoladamente ou em combinação, em 20 pacientes. Envolvimento de grau 3 e 4 ocorreu em seis pacientes no Grupo 1 e sete no Grupo 2. Dez pacientes que faleceram antes de D+100 apresentavam DECH gastrointestinal. Embora nem todas estas mortes possam ser atribuídas à DECH, sete (seis antes de D+100) de nove pacientes que desenvolveram DECH gastrointestinal no Grupo 2 morreram, enquanto somente três de 11 pacientes com DECH gastrointestinal no Grupo 1 evoluíram para o óbito. Em resumo, ainda que os números sejam pequenos e destituídos de significância estatística, chamam a

atenção os dados que relacionam morte por DECH aguda e uso da glutamina, assim como aqueles sobre a mortalidade no grupo de DECH aguda gastrointestinal e o uso de glutamina. Estudo anterior mostrou menor incidência de DECH agudo de grau igual ou superior a 2 em pacientes que receberam suplementação de glutamina, embora sem revelar significância estatística¹⁷⁴.

A segunda causa de óbito em termos cumulativos, tanto aos 100, quanto aos 180 dias, foram as infecções, sem diferença estatística entre os dois grupos, mas, ocorrendo, em sua maioria, antes de D+100 (2/3 no Grupo 1 e 3/4 no Grupo 2). Certamente, a infecção é causa importante de mortalidade precoce nos TCTH, devido ao período prolongado de leucopenia, à ruptura das barreiras mucosas e à imunossupressão, mas pode também se associar à DECH, devido à intensificação da imunossupressão nessa circunstância.

Verificou-se menor incidência de infecção clínica no grupo que usou glutamina, mas sem significância estatística. Observou-se também menor duração da neutropenia, também sem significância. É possível que esses desfechos, sem significância estatística isoladamente, tenham contribuído, em conjunto, para a redução da mortalidade.

O trabalho de Ziegler et al⁹, provavelmente o mais citado sobre possíveis efeitos benéficos da glutamina em TCTH, tem como principal achado a redução de infecções. A meta-análise de Murray e Pindoria⁸, já comentada anteriormente, sugere a redução da infecção de cateter central. Em nosso estudo optamos por usar a definição de infecção clínica, baseada nas decisões observadas no dia-a-dia da enfermagem de transplante, muitas vezes realizadas sem dados microbiológicos. Essa abordagem difere daquela do estudo de Ziegler et al⁹, cujo conceito de infecção clínica inclui tanto dados

bacteriológicos quanto clínicos. Os dados relativos a outros parâmetros de acompanhamento de infecções (Anexo 4), em geral mostram vantagem para o Grupo 1, sem demonstrar, entretanto, significância estatística.

Ainda que os dados referentes a mortalidade e DECH sejam expressivos e mereçam ser avaliados cuidadosamente, não se pode descartar que o efeito observado da glutamina sobre a mortalidade constitua o resultado de mistura de efeitos benéficos diversos, conforme procuraremos discutir, a seguir.

6.2.2 Testes de permeabilidade intestinal.

Análise das medidas de permeabilidade, especialmente da excreção da lactulose e relação lactulose/manitol, mostram, assim como outros estudos, que essas medidas encontravam-se alteradas antes do condicionamento na maior parte dos pacientes. Como a maior parte dos valores de manitol era normal à admissão, se as propriedades dos marcadores utilizados forem consideradas, é possível que a integridade funcional, avaliada pela lactulose, se encontrasse alterada antes do condicionamento. Parte desse efeito poderia ser atribuído à quimioterapia prévia, mas alguns autores sugerem a existência de efeito relacionado à própria leucemia^{196,197}. Conforme tabela 12, não foi demonstrada relação entre quimioterapia recente e alteração de permeabilidade intestinal. Tais alterações foram observadas em pacientes não submetidos a QT recente, assim como não foram observadas sistematicamente naqueles submetidos ao tratamento. Dessa forma, em relação às alterações de permeabilidade em pacientes leucêmicos antecedendo à quimioterapia, é possível relacioná-las a como decorrentes da ação da leucemia sobre a barreira mucosa intestinal. O mecanismo desse efeito pode estar associado a

uma disfunção das células imunes, infiltração leucêmica do intestino ou à produção de citocinas inflamatórias^{196,197}. Ademais, o efeito da quimioterapia sobre a mucosa poderia afetar a estrutura anatômica, com lesão vilositária, que seria traduzida por redução da excreção do manitol e não, predominantemente, da lactulose.

A permeação das moléculas maiores, como a lactulose, parece ocorrer através de vias paracelulares, relacionando-se ao estado funcional das junções firmes, não envolvendo, necessariamente, ruptura da mucosa caracterizada por lesão da mesma e observável morfológicamente. As junções firmes são capazes de responder a diferentes estímulos, tais como endotoxinas, citocinas e alterações do estado oxidativo, por meio de seu relaxamento e abertura, permitindo o aumento da passagem de substâncias através delas¹⁹⁰.

O papel deste intestino “permeável” como efeito da própria leucemia, na patogênese da DECH deve ser avaliado, considerando-se sua possível contribuição para a permeação de endotoxinas mesmo antes do condicionamento.

No estudo houve maior incidência de DECH grave em pacientes com alterações de permeabilidade intestinal à admissão (D-6), observação ainda não encontrada na literatura e, se confirmada, pode contribuir para associar alterações da barreira intestinal induzidas pela leucemia e o desenvolvimento da DECH.

Por outro lado, possível explicação para a relação entre piores medidas de permeabilidade em D+14 e morte em D+100 não é dedutível a partir da análise dos dados. Duas hipóteses poderiam ser aventadas. A primeira decorre do fato de que os pacientes mais graves, de maior risco, com acentuados

efeitos colaterais do condicionamento e portadores de infecções, seriam aqueles que apresentam as alterações mais importantes de permeabilidade, inclusive levando-se em conta o papel das citocinas no aumento da permeabilidade intestinal¹⁹⁰. A segunda seria de que os pacientes com maiores alterações de permeabilidade e, conseqüentemente, maior lesão da barreira mucosa secundárias ao condicionamento, seriam os principais candidatos às formas graves de DECH e, portanto ao óbito. Tal possibilidade tem menor suporte em face da ausência de significância estatística na correlação entre óbitos no D+100 e permeabilidade também em D+6, mais próximo à quimioterapia, bem como entre alterações de permeabilidade nas medidas em D+6 e D+14 e DECH. Vale assinalar que o grupo de pacientes que faleceu em D+100 e apresentava maiores valores de permeabilidade em D+14 apresentaram também aumento significativo das diferenças das médias das permeabilidades entre D+6 e D+14 (diferença = $0,085 \pm 0,082$, $p = 0,022$), ao passo que no grupo dos sobreviventes em D+100, houve redução da permeabilidade, ainda que não significativa, entre D+6 e D+14 (diferença = $-0,028 \pm 0,122$, $p = 0,287$). Essa piora poderia refletir maior gravidade clínica neste grupo de pacientes, o que pode se associar a alterações da permeabilidade intestinal.

As medidas de permeabilidade intestinal se agravaram de forma significativa ao longo do estudo e permaneceram elevadas em D+14 (tabela 11, figuras 2, 3 e 4). Esse tipo de comportamento já foi demonstrado anteriormente e nos mostra que alterações importantes da barreira da mucosa intestinal permanecem, mesmo quando ocorreu melhora significativa dos sintomas da mucosite¹⁹⁷. A deterioração das medidas de permeabilidade

ocorreu, principalmente, em função da redução sistemática da excreção do manitol ao longo do estudo, sugerindo lesão estrutural da barreira mucosa. Tal fato não é surpreendente, em especial pelo uso do metotrexate na profilaxia da DECH que, ministrado próximo à infusão das células hematopoiéticas, acrescenta danos importantes ao trato digestivo. Os níveis de lactulose, que já se encontravam elevados antes do condicionamento, embora apresentem aumento significativo entre a admissão e D+14 ($p = 0,044$), não demonstram diferenças tão expressivas como as alterações do manitol ($p < 0,001$).

Contrariamente à nossa hipótese inicial, a glutamina não exerceu efeito sobre a integridade do trato digestivo avaliada pelos testes de permeabilidade, fato também já assinalado por outros autores¹⁷⁴. Papel específico da glutamina sobre o epitélio do trato digestivo, conforme já assinalado, ainda é objeto de discussão. Se tal efeito de fato existe, explicação possível para sua ausência nesse estudo é que o dano à mucosa é tão intenso nas primeiras semanas após o condicionamento, conforme sugerido pelas importantes alterações das medidas de permeabilidade, que não seria possível demonstrar sua atenuação por essas mesmas medidas.

Os valores de permeabilidade obtidos mostram diferenças em relação aos observados na literatura, em especial os valores da fração de excreção da lactulose e, como conseqüência, da relação lactulose/manitol²⁰⁶. Os valores da fração de excreção do manitol, por outro lado, são semelhantes aos encontrados na literatura. A dificuldade de obtenção de validade externa tem sido assinalada como problema dos estudos de permeabilidade. Sabe-se que as condições de teste influenciam de forma significativa a permeação das moléculas solúveis em água e variações entre laboratórios são observadas

freqüentemente¹⁸². Ademais, diferenças geográficas nas medidas de permeabilidade têm sido descritas, com países em regiões tropicais mostrando valores de permeabilidade superiores aos observados em países temperados²⁰⁶. De qualquer maneira, mesmo que as diferenças das medidas de permeabilidade devam ser assinaladas, seu comportamento foi semelhante ao observado por outros autores, a saber, alterações antecedendo o condicionamento, piora progressiva ao longo do tempo, manutenção, mesmo em fases tardias do transplante, de alterações importantes e ausência efeito da glutamina sobre estas medidas.

6.3 Mecanismos possíveis de ação da glutamina

A ausência de efeitos da glutamina sobre as medidas de permeabilidade que avaliam a barreira mucosa intestinal aponta para a necessidade de se buscar explicações alternativas para o efeito positivo observado no estudo.

No entanto, em face das referências mencionadas na literatura a respeito da ação protetora da glutamina sobre a mucosa intestinal e, devido a observações de alguns estudos sobre o uso de glutamina em quimioterapia e TCTH, com resultado positivo sobre permeabilidade e mucosite, o efeito sobre a mucosa merece algumas considerações.

Conforme discutido na revisão bibliográfica, a ação protetora específica da glutamina sobre o enterócito ainda é objeto de controvérsia. No caso específico da quimioterapia, alguns estudos mostram efeito benéfico sobre as medidas de permeabilidade intestinal^{160,165}. Diversos outros estudos apontam também efeitos benéficos sobre os sintomas de mucosite, evidência indireta de

proteção da barreira mucosa. Entretanto, metanálise da Biblioteca Cochrane sobre intervenções para redução da mucosite, concluiu não haver evidências de ação positiva da glutamina sobre a mucosite¹⁵⁰.

Estudos sobre o uso de glutamina em TCTH sugerem também resultados benéficos sobre a mucosite, mas não existem evidências de ação sobre as medidas de permeabilidade intestinal. Especificamente, o estudo de Blijlevens et al¹⁷⁴ não mostra efeito sobre as medidas de permeabilidade intestinal, mas sugere que possa haver proteção específica da barreira mucosa avaliada pela dosagem de citrulina, a indicar recuperação das células da mucosa intestinal.

A intensidade e duração da mucosite podem variar muito conforme o regime usado. A lesão da mucosa decorrente do condicionamento do TCTH é, de fato, muito intensa e prolongada e talvez não seja possível demonstrar seu efeito protetor, avaliado pelas medidas de permeabilidade, a curto prazo. Os estudos de Daniele et al¹⁶⁰ e Choi et al¹⁶⁵ que demonstraram a ação da glutamina sobre a permeabilidade, foram realizados em pacientes submetidos à terapêutica com 5-fluoruracil, esquema diferente daqueles usados em TCTH.

De qualquer maneira, a ênfase na ação da glutamina apenas sobre a mucosa intestinal e de maneira mais específica sobre o enterócito, não parece fazer justiça à complexidade e diversidade dos mecanismos metabólicos, celulares e fisiológicos dos quais participa o aminoácido. Ademais, o que se convencionou chamar barreira mucosa intestinal, que inclui aspectos físicos, funcionais e imunológicos, apresenta grande complexidade, que não é habitualmente levada em consideração quando usamos o termo. Componentes como a IgA secretória, células dendríticas, células M, linfócitos GALT, que

inclui linfócitos das placas de Peyer, da lâmina própria e intraepiteliais, bem como um grande número de substâncias que podem exercer proteção contra diversos insultos, incluindo o estresse oxidativo, encontram-se em interação dinâmica e contínua com células da mucosa e com elementos extra-mucosa, incluindo a flora bacteriana. Ações locais e à distância dessas interações, assim como efeitos sobre o intestino de eventos ocorridos em outros sítios do organismo, incluindo o papel das endotoxinas e citocinas, têm sido largamente estudados e não parecem estar em harmonia com uma teoria unificadora sobre o papel da glutamina na proteção dessa “barreira mucosa”, em especial quando se enfatiza o elemento enterócito e os aspectos morfológicos.

Na revisão bibliográfica já foram discutidos os efeitos estimuladores da glutamina sobre células imunes e parâmetros de imunidade em diversas situações experimentais e clínicas, inclusive em pacientes submetidos a TCTH^{110-115,118-120,122,123,126-128}

Outra alternativa de ação da glutamina sobre o sistema imune mencionada, relaciona-se a sua característica imunomoduladora, ao invés de imunoestimuladora, baseada no estímulo à síntese de citocinas anti-inflamatórias, preservação dos níveis de IgA secretória e redução da síntese de citocinas pró-inflamatórias^{131,134-137}.

Esses efeitos são compatíveis com a indução pela glutamina de resposta a estímulos lesivos do tipo Th2 pelos linfócitos GALT. Na patogênese da DECH aguda, se considerarmos o paradigma da polarização dos linfócitos doadores, como sendo de resposta predominantemente do tipo Th1, pode-se especular a respeito da contribuição da glutamina na indução de uma resposta Th2 e, conseqüentemente, na atenuação da DECH. Essa ação

imunomodulatória poderia explicar o aumento da sobrevida precoce, especialmente no que se relaciona aos efeitos sobre a tempestade citocínica que se segue ao condicionamento e seu papel no desenvolvimento da DECH.

Outro aspecto a se levar em consideração é o papel central que o fator de transcrição FN- $\kappa\beta$ exerce na patogênese da mucosite, em seus diversos estágios e na tempestade citoquímica. Existem evidências a partir de modelos experimentais de que a falta da glutamina encontra-se associada a redução da síntese do inibidor I $\kappa\beta$, que é seguida por um aumento na produção do FN- $\kappa\beta$. A provisão de glutamina nessas situações parece atenuar a resposta do FN- $\kappa\beta$ e reduzir a produção da citocina pró-inflamatória IL-8¹³⁸. Já se especulou também que a ativação do FN- $\kappa\beta$ depende do estado de oxi-redução e, portanto, da glutathione intracelular. A remoção do I- $\kappa\beta$ é controlada por enzimas sensíveis ao estado de oxiredução que, à ativação, fosforilam rapidamente o I- $\kappa\beta$, permitindo a liberação do FN- $\kappa\beta$ de sua proteína inibitória e sua passagem ao núcleo, onde regula a transcrição de diversos genes. Dessa forma, a provisão de glutamina aumenta a glutathione intracelular, que por sua vez reduz a atividade das enzimas dependentes do estado oxidativo e inibe a liberação do FN- $\kappa\beta$ de sua proteína inibitória, podendo, nesse cenário reduzir a expressão das citocinas dependentes do FN- $\kappa\beta$ ¹⁰⁶. Em suma, a atenuação dos efeitos da mucosite através da inibição da liberação do FN $\kappa\beta$ pode se constituir em efeito interessante da glutamina, que poderia exercer papel na tempestade citocínica e no desenvolvimento da DECH.

Efeitos metabólicos, especialmente melhor balanço nitrogenado e menores níveis de glicose têm também sido invocados como ações

importantes da glutamina na população de terapia intensiva, assim como na de TCTH e devem ser avaliados como possíveis causas de melhores desfechos^{12,10}.

7 CONCLUSÕES

1. Nessa casuística a suplementação de glutamina à nutrição parenteral na primeira semana após infusão das células tronco, associou-se à redução da mortalidade em pacientes leucêmicos submetidos a transplante alogênico de células tronco hematopoiéticas
2. Esse efeito não pode ser atribuído à proteção da mucosa intestinal, em face da ausência de resposta das medidas de permeabilidade intestinal à suplementação de glutamina.

8 PROPOSTAS PARA CONTINUIDADE DA LINHA DE PESQUISA

1. Procurar esclarecer o mecanismo de ação da glutamina, buscando avaliar a atuação da suplementação do aminoácido na tempestade citocínica, por meio da determinação, durante essa fase, de substâncias tais como citocinas, FN- $\kappa\beta$ e do inibidor I $\kappa\beta$, assim como a relação dessas substâncias com o desenvolvimento de DECH e com as medidas de permeabilidade intestinal;
2. Avaliar a relação entre lesão da barreira mucosa avaliada pelas medidas de permeabilidade intestinal e o desenvolvimento de DECH;
3. Avaliar o uso da glutamina venosa isolada, não associada à nutrição parenteral, nos desfechos clínicos pós-TCTH, uma vez que a literatura vem indicando preferência da nutrição pelo trato digestivo em pacientes submetidos a esse procedimento.

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Armitage JO. Bone Marrow transplantation. *N Engl J Med* 1994; 330:827-38.
2. Johansson JE, Ekman T. Gastrointestinal toxicity related to bone marrow transplantation: disruption of the intestinal barrier precedes clinical findings. *Bone Marrow Transplant* 1997; 19:921-25.
3. Weisdorf SAS, Payne WD. Gastrointestinal complications of solid organ and bone marrow transplantation. In Fedldman M, Scharschmidt B F, Sleisenger M H. Sleisenger and Fordtran's Gastrointestinal and liver disease: pathophysiology, diagnosis and management. 6^a ed. Philadelphia: W. B. Saunders, 1998: Cap. 27, p. 376-86.
4. Couriel D, Caldera H, Champlin R, Komanduri K. Acute graft-versus-host disease: pathophysiology, clinical manifestations, and management. *Cancer* 2004; 101:1936-46.
5. Weber JR, Ryan JC. Effects on the gut of systemic disease and other extraintestinal conditions. In Fedldman M, Scharschmidt B F, Sleisenger M H. Sleisenger and Fordtran's Gastrointestinal and liver disease: pathophysiology, diagnosis and management. 6^a ed. Philadelphia: W. B. Saunders, 1998: Cap. 29, p. 411-38.
6. Weisdorf SA, Lysne J, Wind D, Haake RJ, Sharp HL, Goldman A et al. Positive effect of prophylactic total parenteral nutrition on long-term outcome of bone marrow transplantation. *Transplantation* 1987; 43:833-8.
7. Szeluga DJ, Stuart RK, Brookmayer R, Utermohlen V, Santos GW. Nutritional support of bone marrow transplant recipients: a prospective randomized clinical

- trial comparing total parenteral nutrition to an enteral feeding program. *Cancer Res* 1987; 47:3309-16.
8. Murray SM, Pindoria S. Nutrition support for bone marrow transplant patients (Cochrane Review). In: *The Cochrane Library*, Issue 4, 2007. Oxford: Update Software.
 9. Ziegler TR, Young LS, Benfell K, Scheltinga M, Hortos K, Bye R et al. Clinical and metabolic efficacy of glutamine-supplemented parenteral nutrition after bone marrow transplantation. *Ann Int Med* 1992; 116:821-28.
 10. Schloerb PR, Amare M. Total parenteral nutrition with glutamine in bone marrow transplantation and other clinical applications (a randomized, double blind study). *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 1993; 17:407-13.
 11. Ziegler TR, Smith RJ, Byrne TA, Wilmore DW. Potential role of glutamine supplementation in nutrition support. *Clin Nutr* 1993;12(s):S582-S90.
 12. Sheean PM, Freels SA, Helton WS, Braunschweig CA. Adverse clinical consequences of hyperglycemia from total parenteral nutrition exposure during hematopoietic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2006;12:656- 64.
 13. Déchelotte P, Hasselmann M, Cynober L, Allaouchiche B, Coëffier M, Hecketsweiler B et al. L-alanyl-L-glutamine dipeptide-supplemented total parenteral nutrition reduces infectious complications and glucose intolerance in critically ill patients: the French controlled, randomized, double-blind multicenter study. *Crit Care Med.* 2006;34:598-604.
 14. Soubani AO. Critical care considerations of hematopoietic stem cell transplantation. *Crit Care Med* 2006; 34(s):S251–S67.

15. Serna DS, Lee SJ, Zhang MJ, Baker KS, Eapen M, Horowitz MM et al. Trends in survival rates after allogeneic hematopoietic stem-cell transplantation for acute and chronic leukemia by ethnicity in the United States and Canada. *J Clin Oncol* 2003; 21:3754-60.
16. International Bone Marrow Transplant Registry / Autologous Blood and Marrow Transplant Registry Report on state of the art in blood and marrow transplantation – Part I of the IBMTR/ABMTR summary slides with guide. Volume 10, Issue 1, November 2003.
17. Dykewicz CA. Summary of the guidelines for preventing opportunistic infections among hematopoietic stem cell transplant recipients. *Clin Infect Dis* 2001; 33:139-44.
18. Niscola P, Romani C, Cupelli L, Scaramucci L, Tendas A, Dentamaro T et al. Mucositis in patients with hematologic malignancies: an overview. *Haematologica* 2007; 92:222-31.
19. Sonis ST. The pathobiology of mucositis. *Nat Rev Cancer* 2004; 4:277—84
20. Sun Y, Tawara I, Toubai T, Reddy P. Pathophysiology of acute graft-versus-host disease: recent advances. *Transl Res* 2007; 150:197–214.
21. van Bekkum DW, Knaan S. Role of bacterial microflora in development of intestinal lesions from graft-versus-host reaction. *J Natl Cancer Inst* 1977; 58: 787–90.
22. Iwasaki T. Recent advances in the treatment of graft-versus-host disease. *Clin Med Res* 2004; 2:243-52.

23. Hill G, Ferrara J. The primacy of the gastrointestinal tract as a target organ of acute graft-versus-host disease: rationale for the use of cytokine shields in allogeneic bone marrow transplantation. *Blood* 2000; 95:2754–9.
24. Murai M, Yoneyama H, Ezaki T, Suematsu M, Terashima Y, Harada A et al. Peyer's patch is the essential site in initiating murine acute and lethal graft-versus-host reaction. *Nat Immunol* 2003; 4:154–60.
25. Cooke KR, Hill GR, Crawford JM, Bungard D, Brinson YS, Delmonte J Jr et al. Tumor necrosis factor-alpha production to lipopolysaccharide stimulation by donor cells predicts the severity of experimental acute graft versus host disease. *J Clin Invest* 1998; 102: 1882–91.
26. Cooke KR, Gerbitz A, Crawford JM, Teshima T, Hill GR, Tesolin A et al. LPS antagonism reduces graft-versus-host disease and preserves graft-versus-leukemia activity after experimental bone marrow transplantation. *J Clin Invest* 2001; 107:1581–9.
27. Hill GR, Cooke KR, Teshima T, Crawford JM, Keith JC Jr, Brinson YS et al. Interleukin-11 promotes T cell polarization and prevents acute graft-versus-host disease after allogeneic bone marrow transplantation. *J Clin Invest* 1998; 102:115–23.
28. Krijanovski OI, Hill GR, Cooke KR, Teshima T, Crawford JM, Brinson YS et al. Keratinocyte growth factor separates graft-versus-leukemia effects from graft-versus-host disease. *Blood* 1999; 94:825–31.
29. Panoskaltsis-Mortari A, Lacey DL, Vallera DA, Blazar BR. Keratinocyte growth factor administered before conditioning ameliorates graft-versus-host disease after allogeneic bone marrow transplantation in mice. *Blood* 1998; 92:3960–7.

30. Clouthier SG, Cooke KR, Teshima T, Lowler KP, Liu C, Connolly K et al. Repifermin (keratinocyte growth factor-2) reduces the severity of graft-versus-host disease while preserving a graft-versus-leukemia effect. *Biol Blood Marrow Transplant* 2003; 9:592–603.
31. Hill GR, Crawford JM, Cooke KR, Brinson YS, Pan L, James LM. Total body irradiation and acute graft-versus-host disease: the role of gastrointestinal damage and inflammatory cytokines. *Blood* 1997; 90:3204-13.
32. Slavin S, Nagler A, Naparstek E, Kapelushnik Y, Aker M, Cividalli G et al. Nonmyeloablative stem cell transplantation and cell therapy as an alternative to conventional bone marrow transplantation with lethal cytoreduction for the treatment of malignant and nonmalignant hematologic diseases. *Blood* 1998; 91:756-63.
33. Slavin S, Nagler A, Aker M, Shapira MY, Cividalli G, Or R. Non-myeloablative stem cell transplantation and donor lymphocyte infusion for the treatment of cancer and life-threatening malignant disorders. *Rev Clin Exp Hematol* 2001; 5 :135–46.
34. Sykes M, Romick ML, Hoyles KA, Sachs DH. In vivo administration of interleukin 2 plus T cell-depleted syngeneic marrow prevents graft-versus-host disease mortality and permits alloengraftment. *J Exp Med* 1990; 171:645–58.
35. Sykes M, Romick ML, Sachs DH. Interleukin 2 prevents graft-versus-host disease while preserving the graft-versus-leukemia effect of allogeneic T cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87:5633–7.

36. Yang YG, Dey BR, Sergio JJ, Pearson DA, Sykes M. Donor derived interferon gamma is required for inhibition of acute graft-versus-host disease by interleukin 12. *J Clin Invest* 1998; 102:2126–35.
37. Brok HP, Vossen JM, Heidt PJ. Interferon-gamma-mediated prevention of graft-versus-host disease: development of immune competent and allo-tolerant T cells in chimeric mice. *Bone Marrow Transplant* 1997; 19:601–6.
38. Ellison CA, Fischer JM, HayGlass KT, Gartner JG. Murine graft-versus-host disease in an F1-hybrid model using IFN-gamma gene knockout donors. *J Immunol* 1998; 161:631–40.
39. Burman AC, Banovic T, Kuns RD, Clouston AD, Stanley AC, Morris ES et al. IFN-gamma differentially controls the development of idiopathic pneumonia syndrome and GVHD of the gastrointestinal tract. *Blood*. 2007; 110:1064-72.
40. Sykes M, Pearson DA, Taylor PA, Szot GL, Goldman SJ, Blazar BR. Dose and timing of interleukin (IL)-12 and timing and type of total-body irradiation: effects on graft-vs.-host disease inhibition and toxicity of exogenous IL-12 in murine bone marrow transplant recipients. *Biol Blood Marrow Transplant* 1999; 5:277–84.
41. Sykes M, Harty MW, Szot GL, Pearson DA. Interleukin-2 inhibits graft-versus-host disease-promoting activity of CD4 cells while preserving CD4 and CD8-mediated graft-versus-leukemia effects. *Blood* 1994; 83:2560–9.
42. Sykes M, Szot GL, Nguyen PL, Pearson DA. Interleukin-12 inhibits murine graft-versus-host disease. *Blood* 1995; 86:2429–38.

43. Reddy P, Teshima T, Kukuruga M, Ordemann R, Liu C, Lowler K et al. Interleukin-18 regulates acute graft-versus-host disease by enhancing Fas-mediated donor T cell apoptosis. *J Exp Med* 2001; 194:1433–40.
44. Fowler DH, Kurasawa K, Smith R, Eckhaus MA, Gress RE. Donor CD4-enriched cells of Th2 cytokine phenotype regulate graft-versus-host disease without impairing allogeneic engraftment in sublethally irradiated mice. *Blood* 1994; 84:3540–9.
45. Krenger W, Snyder KM, Byon CH, Falzarano G, Ferrara JLM. Polarized type 2 alloreactive CD4 and CD8 donor T cells fail to induce experimental acute graft-versus-host disease. *J Immunol* 1995; 155:585–93.
46. Pan L, Delmonte J, Jalonen C, Ferrara J. Pretreatment of donor mice with granulocyte colony-stimulating factor polarizes donor T-lymphocytes toward type-2 cytokine production and reduces severity of experimental graft-versus-host disease. *Blood* 1995; 86:4422–9.
47. Reddy P, Teshima T, Hildebrandt G, Williams DL, Liu C, Cooke KR et al. Pretreatment of donors with interleukin-18 attenuates acute graft-versus-host disease via STAT6 and preserves graft-versus-leukemia effects. *Blood* 2003; 101:2877–85.
48. Foley JE, Jung U, Miera A, Borenstein T, Mariotti J, Eckhaus M et al. Ex vivo rapamycin generates donor Th2 cells that potently inhibit graft-versus-host disease and graft-versus tumor effects via an IL-4-dependent mechanism. *J Immunol* 2005; 175:5732–43.
49. Jung U, Foley JE, Erdmann AA, Toda Y, Borenstein T, Mariotti J, Fowler DH. Ex vivo rapamycin generates Th1/Tc1 or Th2/Tc2 effector T cells with

- enhanced in vivo function and differential sensitivity to post-transplant rapamycin therapy. *Biol Blood Marrow Transplant* 2006; 12:905–18.
50. Fowler DH, Gress RE. Th2 and Tc2 cells in the regulation of GVHD, GVL, and graft rejection: considerations for the allogeneic transplantation therapy of leukemia and lymphoma. *Leuk Lymphoma* 2000; 38:221–34.
51. Nikolic B, Lee S, Bronson R, Grusby M, Sykes M. Th1 and Th2 mediate acute graft-versus-host disease, each with distinct endorgan targets. *J Clin Invest* 2000; 105:1289–98.
52. Schmaltz C, Alpdogan O, Horndasch KJ, Muriglan SJ, Kappel BJ, Teshima T et al. Differential use of Fas ligand and perforin cytotoxic pathways by donor T cells in graft-versus-host disease and graft-versus-leukemia effect. *Blood* 2001;97:2886–95.
53. Wasem C, Frutschi C, Arnold D, Vallan C, Lin T, Green DR et al. Accumulation and activation-induced release of preformed Fas (CD95) ligand during the pathogenesis of experimental graft-versus-host disease. *J Immunol* 2001; 167:2936–41.
54. Socie G, Mary JY, Lemann M, Daneshpouy M, Guardiola P, Meignin V et al. Prognostic value of apoptotic cells and infiltrating neutrophils in graft-versus-host disease of the gastrointestinal tract in humans: TNF and Fas expression. *Blood*. 2004; 103:50–57.
55. Jaksch M, Mattsson J. The pathophysiology of acute graft-versus-host disease. *Scand J Immunol* 2005; 61: 398–409.
56. Alpers DH. Glutamine: do the data support the cause for glutamine supplementation in humans? *Gastroenterology* 2006; 130(s1):S106-S16.

57. Muscaritoli M, Grieco G, Capria S, Iori AP, Rossi Fanelli F. Nutritional and metabolic support in patients undergoing bone marrow transplantation. *Am J Clin Nutr* 2002; 75:183-90.
58. Wilmore DW, Rombeau JL. Introduction to the symposium proceedings. *J Nutr* 2001; 131(s):2447S-48S.
59. Damodaran M, Jaaback G, Chibnall AC. The isolation of glutamine from an enzymic digest of gliadin. *Biochem J* 1932; 26:1704-13.
60. Krebs HA. Metabolism of amino-acids: The synthesis of glutamine from glutamic acid and ammonia, and the enzymic hydrolysis of glutamine in animal tissues. *Biochem J* 1935; 29:1951-69.
61. Eagle H, Oyama VI, Levy M, Horton CL, Fleischman R. The growth response of mammalian cells in tissue culture to L-glutamine and L-glutamic acid. *J Biol Chem* 1956; 218:607-616.
62. Windmueller HG, Spaeth AE. Uptake and metabolism of plasma glutamine by the small intestine. *J Biol Chem* 1974; 249:5070-79.
63. Reeds P J, Burrin D G. Glutamine and the Bowel. *J Nutr* 2001; 131(s):2505S-8S.
64. Windmueller HG, Spaeth AE. Respiratory fuels and nitrogen metabolism *in vivo* in small intestine of fed rats: quantitative importance of glutamine, glutamate, and aspartate. *J Biol Chem* 1980;255:107-12.
65. Ardawi MSM, Newsholme EA. Glutamine metabolism in lymphocytes of the rat. *Biochem J*. 1983; 212:835-42.

66. Newsholme P. Why is l-glutamine metabolism important to cells of the immune system in health, postinjury, surgery or infection? *J Nutr* 2001; 131(s): 2515S–22S.
67. Muhlbacher F, Kapadia CR, Colpoys MF, Smith RJ, Wilmore DW. Effects of glucocorticoids on glutamine metabolism in skeletal muscle. *Am J Physiol* 1984;247:E75-E83.
68. Griffiths RD, Jones C, Palmer TEA. Six-month outcome of critically ill patients given glutamine-supplemented parenteral nutrition. *Nutrition* 1997;13:295-302.
69. Rutten EPA, Engelen MPKJ, Schols AMWJ, Deutz NEP. Skeletal muscle glutamate metabolism in health and disease: state of the art. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2005, 8:41–51.
70. Planas M, Schwartz S, Arbós MA, Farriol M. Plasma glutamine levels in septic patients. *JPEN J Parental Enteral Nutr* 1993; 17:299-300.
71. Boelens PG, Nijveldt RJ, Houdijk APJ, Meijer S, van Leeuwen PAM. Glutamine alimentation in catabolic state. *J Nutr* 2001; 131(s): 2569S-77S.
72. Smith RJ, Wilmore DW. Glutamine nutrition and requirements. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 1990; 14(s):94S-9S.
73. Lacey JM, Wilmore DW. Is glutamine a conditionally essential amino acid? *Nutr Rev* 1990; 48:297-30.
74. Labow BI, Souba WW. Glutamine. *World J Surg* 2000; 24:1503-13.
75. Andrew FJ, Griffiths RD. Glutamine: essential for immune nutrition in the critically ill. *Br J Nutr* 2002; 87:3S-S8.

76. Novak F, Heyland DK, Avenell A, Drover JW, Su X. Glutamine supplementation in serious illness: a systematic review of the evidence. *Crit Care Med* 2002;30:2022-29.
77. Stinnett JD, Alexander JW, Watanabe C, MacMillan BG, Fischer JE, Morris MJ et al. Plasma and skeletal muscle amino acids following severe burn injury in patients and experimental animals. *Ann Surg*. 1982; 195:75-89.
78. Askanazi J, Carpentier YA, Michelsen CB, Elwyn DH, Furst P, Kantrowitz LR et al. Muscle and plasma amino acids following injury. Influence of intercurrent infection. *Ann Surg* 1980; 192:78-85.
79. Oudemans-van Straaten HM, Bosman RJ, Treskes M, van der Spoel HJI, Zandstra DF. Plasma glutamine depletion and patient outcome in acute ICU admissions. *Intensive Care Med*. 2001; 27:84-90.
80. Reeds PJ, Burrin DG, Stoll B, Jahoor F. Intestinal Glutamate Metabolism. *J Nutr* 2000; 130(s):978S-82S.
81. Watford M. Session III: Physiological Aspects of Glutamine Metabolism II — Discussion Summary. *J Nutr* 2001; 131(s): 2523S–24S.
82. Salloum RM, Copeland EM, Souba WW. Brush border transport of glutamine and other substrates during sepsis and endotoxemia. *Ann Surg* 1991; 213:401-9.
83. Nose K, Wasa M, Okada A. Gut glutamine metabolism at different stages of sepsis in rats. *Surg Today* 2002; 32:695-700
84. Austgen TR, Chen MK, Flynn TC, Souba WW. The effects of endotoxin on the splanchnic metabolism of glutamine and related substrates. *J Trauma* 1991; 31:742-51.

85. Souba WW, Herskowitz K, Klimberg VS, Salloum RM, Plumley DA, Flynn TC et al. The effects of sepsis and endotoxemia on gut glutamine metabolism. *Ann Surg* 1990; 211:543-9.
86. Dudrick PS, Salloum RM, Copeland EM 3rd, Souba WW. The early response of the jejunal brush border glutamine transporter to endotoxemia. *J Surg Res* 1992; 52:372-7.
87. Salloum RM, Souba WW, Fernandez A, Stevens BR. Dietary modulation of small intestinal glutamine transport in intestinal brush border membrane vesicles of rats. *J Surg Res* 1990; 48:635-8.
88. Souba WW, Plumley DA, Salloum RM, Copeland EM 3rd. Effects of glucocorticoids on lung glutamine and alanine metabolism. *Surgery* 1990; 108: 213-8.
89. Sarantos P, Ockert K, Souba WW. Endotoxin stimulates lymphocyte glutaminase expression. *Arch Surg* 1993; 128:920-4.
90. Karinch AM, Pan M, Lin CM, Strange R, Souba WW. Glutamine metabolism in sepsis and infection. *J Nutr* 2001; 131(s):2535S-8S.
91. Peng X, Yan H, You Z, Wang P, Wang S. Effects of enteral supplementation with glutamine granules on intestinal mucosal barrier function in severe burned patients. *Burns* 2004; 30:135-9.
92. Watford M. Session III: Physiological Aspects of Glutamine Metabolism II — Discussion Summary. *J Nutr* 2001;131(s):2523S-4S.
93. Hulsewé KWE, van Acker BAC, Hameeteman W, van der Hulst RRWJ, Vainas T, Arends JW et al. Does glutamine-enriched parenteral nutrition really affect intestinal morphology and gut permeability? *Clin Nutr* 2004; 23:1217-25.

94. Lipman TO. Bacterial translocation and enteral nutrition in humans: an outsider looks in. *JPEN J Parental Enteral Nutr* 1995; 19:156-65.
95. Buchman A L. Glutamine: commercially essential or conditionally essential? A critical appraisal of the human data. *Am J Clin Nutr* 2001; 74:25–32.
96. Van Der Hulst RRWJ, von Meyenfeldt MF, Deutz NEP, Soeters PB, Brummer RJM, von Kreel BK et al. Glutamine and the preservation of gut integrity. *Lancet* 1993; 341:1363-5.
97. Hulsewé KWE, van der Hulst RWWJ, van Acker BAC, von Meyenfeldt MF, Soeters PB. Inflammation rather than nutritional depletion determines glutamine concentration and intestinal permeability. *Clin Nutr* 2004;23:1209-16.
98. Buchman AL, Moukarzel AA, Bhuta S, Belle M, Ament ME, Eckhert CD et al. Parenteral nutrition is associated with morphologic and functional changes in man. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 1995;19:453–60.
99. Jiang ZM, Cao JD, Zhu XG, Zhao WX, Yu JC, Ma EL et al. The impact of alanyl-glutamine on clinical safety, nitrogen balance, intestinal permeability, and clinical outcome in postoperative patients: a randomized, double-blind, controlled study of 120 patients. *JPEN J Parenter Enteral Nutr*. 1999; 23(s):62S-6S.
100. Zhou YP, Jiang ZM, Sun YH, Wang XR, Ma EL, Wilmore D. The effect of supplemental enteral glutamine on plasma levels, gut function, and outcome in severe burns: a randomized, double-blind, controlled clinical trial. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 2003; 27:241-5.
101. De-Souza DA, Greene LJ. Intestinal permeability and systemic infections in critically ill patients. Effect of glutamine. *Crit Care Med* 2005; 33:1125-35.

102. Noyer CM., Simon D, Borczuk A, Brandt LJ, Lee MJ, Nehra V. A double-blind placebo-controlled pilot study of glutamine therapy for abnormal intestinal permeability in patients with AIDS. *Am J Gastroenterol.* 1998; 93:972-5.
103. Den Hond E, Hiele M, Peeters M, Ghoois Y, Rutgeerts P. Effect of long-term oral glutamine supplements on small intestinal permeability in patients with Crohn's disease. *JPEN J Parenter Enteral Nutr.* 1999; 23:7-11.
104. Ceppa EP, Fuh KC, Bulkley GB. Mesenteric hemodynamic response to circulatory shock. *Curr Opin Crit Care* 2003; 9:127-32.
105. Newsholme P, Lima M M R, Procópio J, Pithon-Curi T C, Dóí S Q, Bazotte R B et al. Glutamine and glutamate as vital metabolites. *Braz J Med Biol Res* 2003; 36:153-63.
106. Roth E, Oehler R, Manhart N, Exner R, Wessner B, Strasser E et al. Regulative Potential of Glutamine - Relation to Glutathione Metabolism. *Nutrition* 2002; 18:217–21.
107. Jahoor F, Wykes LJ, Reeds PJ, Henry JF, Del Rosario MP, Frazer ME. Protein-deficient pigs cannot maintain reduced glutathione homeostasis when subjected to the stress of inflammation. *J. Nutr* 1995; 125:1462-72.
108. Ikeda S, Zarzaur BL, Johnson CD, Fukatsu K, Kudsk KA. Total parenteral nutrition supplementation with glutamine improves survival after gut ischemia/reperfusion. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 2002; 26:169–73.
109. Fukatsu K, Ueno C, Hashiguchi Y, Hara E, Kinoshita M, Mochizuki H et al. Glutamine infusion during ischemia is detrimental in a murine gut ischemia/reperfusion model. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 2003; 27:187–92.

110. Wilmore DW, Shabert JK. The role of glutamine in immunologic responses. *Nutrition* 1998;14: 618–26.
111. Crawford J, Cohen HJ. The essential role of glutamine in lymphocyte differentiation in vitro. *J Cell Physiol* 1985; 24:275–82..
112. Juretic A, Spagnoli GC, Hörig H, Babst R, von Bremen K, Harder F et al. Glutamine requirements in the generation of lymphokine-activated killer cells. *Clin Nutr* 1994; 13:42-9.
113. Spittler A, Winkler S, Götzinger P, Oehler R, Willheim M, Tempfer C et al. Influence of glutamine on the phenotype and function of human monocytes. *Blood* 1995; 86:1564-9.
114. Parry-Billings M, Calder PC, Newsholme EA, Evans J. Does glutamine contribute to immunosuppression after major burns? *Lancet* 1990; 336:523–5.
115. Wallace C, Keast D. Glutamine and macrophage function. *Metabolism*. 1992; 41:1016–20.
116. Murphy CJ, Newsholme P. The importance of glutamine metabolism in murine macrophages and human monocytes to L-arginine biosynthesis and rates of nitrite or urea production. *Clin Sci (Lond)* 1998; 95:397–407.
117. Calder PC, Yaqoob P. Glutamine and the immune system. *Amino Acids* 1999; 17:227-41.
118. Yassad A, Lavoine A, Bion A, Daveau M, Husson A. Glutamine accelerates interleukin-6 production by rat peritoneal macrophages in culture. *FEBS Lett* 1997; 413:81–84.
119. Murphy C, Newsholme P. Macrophage-mediated lysis of a b-cell line, TNF-alpha release from BCG-activated murine macrophages and interleukin-8

- release from human monocytes are dependent on extracellular glutamine concentration and glutamine metabolism. *Clin Sci (Lond)* 1999; 96:89–97.
120. Furukawa S, Saito H, Inoue T, Matsuda T, Fakatsu K, Han I et al. Supplemental glutamine augments phagocytosis and reactive oxygen intermediate production by neutrophils and monocytes from postoperative patients *in vitro*. *Nutrition* 2000; 16:323–9.
121. Saito H, Furukawa S, Matsuda T. Glutamine as an immunoenhancing nutrient. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 1999; 23(s): 59S.
122. Pithon-Curi TC, Schumacher RI, Freitas JJ, Lagranha C, Newsholme P, Palanch AC et al. Glutamine delays spontaneous apoptosis in neutrophils. *Am J Physiol Cell Physiol* 2003; 284:C1355–C1361.
123. Yoo SS, Field CJ, McBurney MI. Glutamine supplementation maintains intramuscular glutamine concentrations and normalizes lymphocyte function in infected early weaned pigs. *J Nutr* 1997; 127:2253–9.
124. Yoshida S, Hikida S, Tanaka Y, Yanase A, Mizote H, Kaegawa T. Effect of glutamine supplementation on lymphocyte function in septic rats. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 1992; 16:30S.
125. Li J, King BK, Janu PG, Renegar KB, Kudsk KA. Glycyl-L-glutamine-enriched total parenteral nutrition maintains small intestine gut associated lymphoid tissue and upper respiratory tract immunity. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 1998; 22:31–6.
126. Ziegler TR, Bye RL, Persinger RL, Young LS, Antin JH, Wilmore DW. Glutamine supplementation on circulating lymphocytes after bone marrow transplantation: a pilot study. *Am J Med Sci* 1998; 315:4-10.

127. O'Riordain MG, Fearon KC, Ross JA, Rogers P, Falconer JS, Bartolo DC et al. Glutamine-supplemented parenteral nutrition enhances T-lymphocyte response in surgical patients undergoing colorectal resection. *Ann Surg* 1994; 220:212-21.
128. Lin MT, Kung SP, Yeh SL, Lin C, Lin TH, Chen KH et al. The effect of glutamine-supplemented total parenteral nutrition on nitrogen economy depends on severity of diseases in surgical patients. *Clin Nutr* 2002; 21:213-8.
129. Neu J, De Marco V, Li N. Glutamine: clinical applications and mechanisms of action. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2002; 5:69-75.
130. Kudsk KA. Effect of route and type of nutrition on intestine-derived inflammatory responses. *Am J Surg* 2003; 185: 16–21.
131. Kudsk KA. Current aspects of mucosal immunology and its influence by nutrition. *Am J Surg* 2002; 183:390–8.
132. Ikeda S, Kudsk KA, Le T, Zarzaur BL, Johnson CD. Glutamine improves impaired cellular exudation and polymorphonuclear neutrophil phagocytosis induced by total parenteral nutrition after glycogen-induced murine peritonitis. *Shock* 2003; 19:50–4.
133. Kudsk KA, Wu Y, Fukatsu K, Zarzaur BL, Johnson CD, Wang R, Hanna MK. Glutamine-enriched total parenteral nutrition maintains intestinal interleukin-4 and mucosal immunoglobulin A levels. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 2000; 24:270-4.
134. Fukatsu K, Kudsk KA, Zarzaur BL, Wu Y, Hanna MK, DeWitt RC. TPN decreases IL-4 and IL-10 mRNA expression in lipopolysaccharide stimulated

- intestinal lamina propria cells but glutamine supplementation preserves the expression. *Shock* 2001; 15:318-22.
135. Coeffier M, Miralles-Barrachina O, Le Pessot F, Lalaude O, Daveau M, Lavoigne A et al. Influence of glutamine on cytokine production by human gut in vitro. *Cytokine* 2001; 13:148–54.
136. De Beaux A, O’Riordain M, Ross J, Jodozi L, Carter D, Fearon K. Glutamine-supplemented total parenteral nutrition reduces blood mononuclear cell interleukin-8 release in severe acute pancreatitis. *Nutrition* 1998; 14:261–5.
137. Ockenga J, Borchert K, Rifai K, Manns M P, Bischoff S C. Effect of glutamine-enriched total parenteral nutrition in patients with acute pancreatitis. *Clinical Nutrition* 2002; 21: 409–16.
138. Liboni KC, Li N, Scumpia PO, Neu J. Glutamine modulates LPS-induced IL-8 production through I κ B/NF- κ B in human fetal and adult intestinal epithelium. *J Nutr* 2005; 135:245–51.
139. Fillmann H, Kretzmann NA, San-Miguel B, Llesuy S, Marroni N, González-Gallego J et al. Glutamine inhibits over-expression of pro-inflammatory genes and down-regulates the nuclear factor kappaB pathway in an experimental model of colitis in the rat. *Toxicology* 2007; 236:217-26.
140. Marjon PL, Bobrovnikova-Marjon EV, Abcouwer SF. Expression of the pro-angiogenic factors vascular endothelial growth factor and interleukin-8/CXCL8 by human breast carcinomas is responsive to nutrient deprivation and endoplasmic reticulum stress. *Mol Cancer* 2004; 3:4.

141. Houdijk APJ, Rijnsburger ER, Jansen J, Wesdorp RIC, Weiss JK, McCamish MA et al. Randomised trial of glutamine-enriched enteral nutrition on infectious morbidity in patients with multiple trauma. *Lancet*. 1998; 352:772-6.
142. Soeters P B. Glutamine Metabolism in Pathophysiologic States - Discussion Summary. *J Nutr* 2001;131(s): 2550S–51S.
143. Hammarqvist F, Wernerman J, Ali R, Von Der Decken A, Vinnars E. Addition of glutamine to total parenteral nutrition after elective abdominal surgery spares free glutamine in muscle, counteracts the fall in muscle protein synthesis, and improves nitrogen balance. *Ann Surg* 1989; 209:455-61.
144. Stehle P, Mertes N, Puchstein CH, Zander J, Albers S, Lawin et al. Effect of parenteral glutamine peptide supplements on muscle glutamine loss and nitrogen balance after major surgery. *Lancet* 1989; 333:231-3.
145. Morlion BJ, Stehle P, Wachtler P, Siedhoff HP, Koller M, Konig W et al. Total parenteral nutrition with glutamine dipeptide after major abdominal surgery. *Ann Surg* 1998; 227:302-8.
146. Wilmore DW. The effect of glutamine supplementation in patients following elective surgery and accidental injury. *J Nutr* 2001;131(s): 2543S–9S.
147. Bakalar B, Duska F, Pacht J, Fric M, Otahal M, Pazout J et al. Parenterally administered dipeptide alanyl-glutamine prevents worsening of insulin sensitivity in multiple-trauma patients. *Crit Care Med* 2006; 34:381–6.
148. Opara EC, Petro A, Tevrizian A, Feinglos MH, Surwit RS. L-Glutamine supplementation of a high fat diet reduces body weight and attenuates hyperglycemia and hyperinsulinemia in C57BL/6J mice. *J Nutr* 1996; 126:273-9.

149. Borel MJ, Williams PE, Jabbour K, Levenhagen D, Kaizer E, Flakoll PJ. Parenteral glutamine infusion alters insulin-mediated glucose metabolism. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 1998; 22:280-5.
150. Worthington HV, Clarkson JE, Eden OB. Interventions for preventing oral mucositis for patients with cancer receiving treatment (Cochrane Review). In: *The Cochrane Library*, Issue 4, 2007. Oxford: Update Software.
151. Stokman MA, Spijkervet FKL, Boezen HM, Schouten JP, Roodenburg JLN, de Vries EGE. Preventive intervention possibilities in radiotherapy and chemotherapy-induced oral mucositis: results of meta-analyses. *J Dent Res* 2006; 85:690-700.
152. Van Zaanen HCT, van der Lelie H, Timmer JG, Furst P, Sauerwein HP. Parenteral glutamine dipeptide supplementation does not ameliorate chemotherapy induced toxicity. *Cancer* 1994; 74:2879-84.
153. Jebb SA, Osborne RJ, Maughan TS, Mohideen N, Mack P, Mort D et al. 5-fluorouracil and folinic acid-induced mucositis: no effect of oral glutamine supplementation. *Br J Cancer* 1994; 70:732-5.
154. Bozzetti F, Biganzoli L, Gavazzi C, Cappuzzo F, Carnaghi C, Buzzoni R et al. Glutamine supplementation in cancer patients receiving chemotherapy: a double-blind randomized study. *Nutrition* 1997; 13:748-51.
155. Anderson PM, Schroeder G, Skubitz KM. Oral glutamine reduces the duration and severity of stomatitis after cytotoxic cancer chemotherapy. *Cancer* 1998; 83:1433-9.
156. Yoshida S, Matsui M, Shirouzu Y, Fujita H, Yamana H, Shirouzu K. Effects of glutamine supplements and radiochemotherapy on systemic immune and gut

- barrier function in patients with advanced esophageal cancer. *Ann Surg* 1998; 227:485-91.
157. Okuno SH, Woodhouse CO, Loprinzi CL, Sloan JA, LaVasseur BI, Clemens-Schutjer D et al. Phase III controlled evaluation of glutamine for decreasing stomatitis in patients receiving fluorouracil (5-FU)-based chemotherapy. *Am J Clin Oncol* 1999; 22:258-61.
158. Decker-Baumann C, Buhl K, Frohmüller S, von Herbay A, Dueck M, Schlag PM. Reduction of chemotherapy-induced side-effects by parenteral glutamine supplementation in patients with metastatic colorectal cancer. *Eur J Cancer* 1999; 35:202-7.
159. Huang EY, Leung SW, Wang CJ, Chen HC, Sun LM, Fang FM et al. Oral glutamine to alleviate radiation-induced oral mucositis: a pilot randomized trial. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2000; 46:535-9.
160. Daniele B, Perrone F, Gallo C, Pignata S, De Martino S, De Vivo R et al. Oral glutamine in the prevention of fluorouracil induced intestinal toxicity: a double blind, placebo controlled, randomised trial. *Gut*. 2001; 48:28-33.
161. Scheid C, Hermann K, Kremer G, Holsing A, Heck G, Fuchs M et al. Randomized, double-blind, controlled study of glycyl-glutamine-dipeptide in the parenteral nutrition of patients with acute leukemia undergoing intensive chemotherapy. *Nutrition* 2004; 20:249-54.
162. Cerchiatti LC, Navigante AH, Lutteral MA, Castro MA, Kirchuk R, Bonomi M et al. Double-blinded, placebo-controlled trial on intravenous L-alanyl-L-glutamine in the incidence of oral mucositis following chemoradiotherapy in

- patients with head-and-neck cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2006; 65:1330-7.
163. Li Y, Yu Z, Liu F, Tan L, Wu B, Li J. Oral glutamine ameliorates chemotherapy-induced changes of intestinal permeability and does not interfere with the antitumor effect of chemotherapy in patients with breast cancer: a prospective randomized trial. *Tumori*. 2006; 92:396-401
164. Peterson DE, Jones JB, Petit RG 2nd. Randomized, placebo-controlled trial of Saforis for prevention and treatment of oral mucositis in breast cancer patients receiving anthracycline-based chemotherapy. *Cancer* 2007; 109:322-31.
165. Choi K, Lee SS, Oh SJ, Lim SY, Lim SY, Jeon WK et al. The effect of oral glutamine on 5-fluorouracil/leucovorin-induced mucositis/stomatitis assessed by intestinal permeability test. *Clin Nutr* 2007; 26:57-62.
166. Ward E, Smith M, Henderson M, Reid U, Lewis I, Kinsey S et al. The effect of high-dose enteral glutamine on the incidence and severity of mucositis in paediatric oncology patients. *Eur J Clin Nutr* 2007 Aug 29 (disponível *on-line*).
167. Jebb SA, Marcus R, Elia M. A pilot study of oral glutamine supplementation in patients receiving bone marrow transplants. *Clin Nutr* 1995; 14:162-5.
168. Anderson PM, Ramsay NK, Shu XO, Rydholm N, Rogosheske J, Nicklow R et al. Effect of low-dose oral glutamine on painful stomatitis during bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 1998; 22:339-44.
169. Brown SA, Goringe A, Fegan C, Davies SV, Giddings J, Whittaker JA et al. Parenteral glutamine protects hepatic function during bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 1998; 22:281-4.

170. Schloerb PR, Skikne BS. Oral and parenteral glutamine in bone marrow transplantation: a randomized, double-blind study. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 1999; 23:117-22.
171. Coghlin Dickson TM, Wong RM, offrin RS, Shizuru JA, Johnston LJ, Hu WW et al. Effect of oral glutamine supplementation during bone marrow transplantation. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 2000; 24:61-6.
172. Pytlík R, Benes P, Patorková M, Chocenská E, Gregora E, Procházka B et al. Standardized parenteral alanyl-glutamine dipeptide supplementation is not beneficial in autologous transplant patients: a randomized, double-blind, placebo controlled study. *Bone Marrow Transplant* 2002 ; 30:953-61.
173. Piccirillo N, De Matteis S, Laurenti L, Chiusolo P, Sorà F, Pittiruti M et al. Glutamine-enriched parenteral nutrition after autologous peripheral blood stem cell transplantation: effects on immune reconstitution and mucositis. *Haematologica* 2003; 88:192-200.
174. Blijlevens NM, Donnelly JP, Naber AH, Schattenberg AV, DePauw BE. A randomised, double-blinded, placebo-controlled, pilot study of parenteral glutamine for allogeneic stem cell transplant patients. *Support Care Cancer* 2005 ; 13:790-6.
175. Aquino VM, Harvey AR, Garvin JH, Godder KT, Nieder ML, Adams RH et al. A double-blind randomized placebo-controlled study of oral glutamine in the prevention of mucositis in children undergoing hematopoietic stem cell transplantation: a pediatric blood and marrow transplant consortium study. *Bone Marrow Transplant* 2005 ;36:611-6.

176. Baker KS, Loberiza Jr FR, Yu H, Cairo MS, Bolwell BJ, Bujan-Boza WA et al. Outcome of ethnic minorities with acute or chronic leukemia treated with hematopoietic stem-cell transplantation in the United States. *J Clin Oncol* . 2005; 23:7032-42.
177. Parimon T, Au DH, Martin PJ, Chien JW. A risk score for mortality after allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Ann Intern Med* 2006; 144:407-14.
178. Travis S, Menzies I. Intestinal permeability: functional assesment and significance. *Clin Sci (Lond)* 1992; 82:471-88.
179. Bjarnason I, MacPherson A, Hollander D. Intestinal permeability: an overview. *Gastroenterology* 1995; 108:1566-81.
180. Toskes, P.P. Malabsorption. In Bennett JC, Plum F. *Cecil Textbook of Medicine*. 20^a ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 1996: p.695-707.
181. Bjarnason I, Maxton D, Reynolds AP Catt S, Peters TJ, Menzies IS. Comparison of four markers of intestinal permeability in control subjects and patients with coeliac disease. *Scand J Gastroenterol* 1994; 29:630-9 .
182. Peeters M, Hiele M, Ghooos Y Huysmans V, Geboes K, Vantrappen G et al. Test conditions greatly influence permeation of water soluble molecules through the intestinal mucosa: need for standardisation. *Gut* 1994; 35:1404-8.
183. Hollander D. The intestinal permeability barrier. A hypothesis as to its regulation and involvement in Crohn's disease. *Scand J Gastroenterol* 1992; 27:721-6.

184. Bjarnason I, Peters TJ. Intestinal permeability, non-steroidal anti-inflammatory drug enteropathy and inflammatory bowel disease: an overview. *Gut Festschrift* 1989; 30:22-8.
185. Matthews JB, Smith JA, Tally KJ, Menconi MJ, Nguyen H, Fink MP. Chemical hypoxia increases junctional permeability and activates electrogenic ion transport in human intestinal epithelial monolayers. *Surgery* 1994; 116:150-7.
186. Heyman M, Darmon N, Dupont C, Dugas B, Hirribaren A, Blaton MA et al. Mononuclear cells from infants allergic to cow's milk secrete tumor necrosis factor alpha altering intestinal function. *Gastroenterology* 1994; 106:1514-23.
187. Ryan CM, Atkins MB, Mier JW, Gelfand JA, Tompkins RG. Effects of malignancy and interleukin-2 infusion on gut macromolecular permeability. *Crit Care Med* 1995; 23:1801-6.
188. Helton WS. The pathophysiologic significance of alterations in intestinal permeability induced by total parenteral nutrition and glutamine. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 1994;18:289-90 .
189. Fasano A. Regulation of intercellular tight junctions by zonula occludens toxin and its eukaryotic analogue zonulin. *Ann N Y Acad Sci.* 2000; 915:214-22
190. DeMeo MT, Mutlu EA, Keshavarzian A, Tobin MC. Intestinal permeation in gastrointestinal disease. *J Clin Gastroenterol* 2002; 34:385-96.
191. Melichar B, Dvorák J, Hyspler R, Zadák Z. Intestinal permeability in the assessment of intestinal toxicity of cytotoxic agents. *Chemotherapy.* 2005; 51:336-8.

192. Parrilli G, Iaffaioli RV, Martorano M, Cuomo R, Tafuto S, Zampino MG et al. Effects of anthracycline therapy on intestinal absorption in patients with advanced breast cancer. *Cancer Res* 1989; 49:3689-91.
193. Fazeney-Dörner B, Veitl M, Wenzel C, Brodowicz T, Zielinski C, Muhm M. Alterations in intestinal permeability following the intensified polydrug-chemotherapy IFADIC (ifosfamide, Adriamycin, dacarbazine). *Cancer Chemother Pharmacol* 2002; 49:294-8.
194. Daniele B, Secondulfo M, De Vivo R, Pignata S, De Magistris L, Delrio P et al. Effect of chemotherapy with 5-fluorouracil on intestinal permeability and absorption in patients with advanced colorectal cancer. *J Clin Gastroenterol* 2001; 32:228-30.
195. Melichar B, Kohout P, Bratova M, Solichova D, Kralickova P, Zadak Z. Intestinal permeability in patients with chemotherapy-induced stomatitis. *J Cancer Res Clin Oncol* 2001;127: 314-8.
196. Sundström GM, Wahlin A, Nordin-Andersson I, Suhr OB. Intestinal permeability in patients with acute myeloid leukemia. *Eur J Haematol* 1998; 61:250-4.
197. Blijlevens NM, van't Land B, Donnelly JP, M'Rabet L, de Pauw BE. Measuring mucosal damage induced by cytotoxic therapy. *Support Care Cancer* 2004; 12:227-33.
198. Johansson JE, Brune M, Ekman T. The gut mucosa barrier is preserved during allogeneic, haemopoietic stem cell transplantation with reduced intensity conditioning. *Bone Marrow Transplant* 2001; 28:737-42.

199. Johansson JE, Ekman T. Gut toxicity during hemopoietic stem cell transplantation may predict acute graft-versus-host disease severity in patients. *Dig Dis Sci* 2007; 52:2340-5.
200. Dean, AG, Dean JA, Coulombier D, Brendel KA, Smith DC, Burton AH et al. *Epi Info, Version 6: A Word Processing Database, and Statistics Program for Epidemiology on Microcomputers*. Atlanta: Centers of Disease Control and Prevention; 1994.
201. Przepiorka D, Weisdorf D, Martin P et al. Consensus conference on acute GVHD grading. *Bone Marrow transplant* 1995; 15:825-8.
202. Campos-Filho N, Franco EL. Microcomputer-assisted univariate survival data analysis using Kaplan-Meier life table estimators. *Comput Methods Pros Biomed* 1988; 27:223-8.
203. Vilela EG, Ferrari MLA, Torres HOG, Martins FP, Goulart EM, Lima AS et al. Intestinal permeability and antigliadin antibody test for monitoring adult patients with celiac disease. *Dig Dis Sci* 2007; 52:1304-9.
204. Lachin JL. Statistical considerations in the intent-to-treat principle. *Control Clin Trials* 2000 ;21:526.
205. Arfons LM, Lazarus HM. Total parenteral nutrition and hematopoietic stem cell transplantation: an expensive placebo? *Bone Marrow Transplant*. 2005 Aug;36(4):281-8.
206. Menzies IS, Zuckerman MJ, Nukajam WS, Somasundaram SG, Murphy B, Jenkins AP et al. Geography of intestinal permeability and absorption. *Gut* 1999; 44:483-9.

ANEXO 1

Consentimento Informado

Antes de participar desta pesquisa clínica é importante que você leia e compreenda a explicação sobre todos os procedimentos propostos.

Esta declaração descreve os objetivos da realização desta pesquisa, como ela será realizada, seus benefícios, riscos e precauções. Nenhuma garantia ou promessa poderá ser feita sobre os resultados do estudo.

O objetivo deste estudo é avaliar se a utilização da substância glutamina tem efeito ou não sobre o sistema digestivo dos pacientes que realizam transplante de medula óssea e se este efeito ajuda ou não a diminuir as complicações e até mortes relacionadas ao transplante.

O tratamento de quimioterapia que é realizado no início de todos os tratamentos de transplante pode provocar uma lesão importante do sistema digestivo denominada mucosite. Esta mucosite provoca náuseas, vômitos e diarreia, além de lesões na boca. Acredita-se também que esta mucosite possa provocar um enfraquecimento da mucosa intestinal, permitindo a passagem de micróbios e toxinas através da parede intestinal até a corrente sanguínea, que poderão provocar infecções no paciente transplantado.

Em 1993 uma pesquisa sugeriu que o uso da glutamina intravenosa poderia reduzir a incidência de infecções, o tempo de hospitalização e melhorar o estado nutricional dos pacientes submetidos ao transplante. Entretanto, como estudo posterior não confirmou este primeiro estudo, o papel desta substância precisa ser melhor definido. Também é necessário saber se seu efeito benéfico acontece pela melhora do estado nutricional ou se por um conhecido efeito protetor da glutamina sobre a mucosa intestinal.

A maneira de se avaliar o efeito da glutamina sobre o sistema digestivo é através da medida da permeabilidade intestinal. Esta medida é realizada através de uma solução de açúcares (lactulose e manitol) ingerida pelo paciente e posteriormente medida na urina.

Antes de iniciar o tratamento o paciente receberá uma dose de lactulose e manitol após ficar em jejum durante 12 horas. Após a ingestão desta solução o paciente deverá permanecer em jejum por mais 2 horas. Depois disto poderá se alimentar normalmente. O paciente deverá também colher sua urina por 6 horas em frascos especiais que lhe serão fornecidos pela enfermagem. A medida de permeabilidade intestinal será repetida no sexto e no décimo quarto dia após a quimioterapia para comparação com o exame antes da mesma.

As nutrições parenterais dos pacientes serão fornecidas com ou sem glutamina, de acordo com sorteio realizado na farmácia do hospital. Os médicos, pesquisadores e os pacientes não saberão se sua nutrição parenteral contém ou não glutamina para não influenciar os resultados da pesquisa.

Mais tarde, a farmácia informará aos pesquisadores sobre a presença ou não da glutamina nas nutrições e os pesquisadores poderão comparar se o grupo que usou glutamina teve sua permeabilidade intestinal diferente do grupo que não usou. Será também avaliado se o uso da glutamina melhorou ou não a incidência de infecções e o estado nutricional.

O uso tanto da glutamina como da lactulose e do manitol não acarreta nenhum desconforto especial a não ser o jejum de 12 horas à noite e o de 2 durante a manhã. Alguns pacientes podem apresentar diarreia e desconforto abdominal.

A literatura médica não descreve efeitos colaterais significativos do uso da glutamina, sendo que esta substância já foi utilizada em mais de um estudo de pacientes com transplante de medula com total segurança. As possíveis contra-indicações ocorrem nos pacientes com insuficiência renal e hepática, nos quais a substância não será utilizada.

Você tem toda a liberdade de decidir ou não participar deste estudo. Caso concorde, poderá abandoná-lo em qualquer momento, sem necessidade de qualquer justificativa. Qualquer que seja sua decisão você continuará a ter direito ao tratamento, sem restrições. Em caso de dúvida durante a pesquisa você poderá entrar em contato com o Dr. Henrique Oswaldo da Gama Torres através dos telefones 32489379 ou 99848603 e com o Comitê de Ética em Pesquisa no número 32489364.

Li e entendi as informações sobre o estudo contidas neste documento. Tive a oportunidade de fazer perguntas e todas as minhas dúvidas foram respondidas a contento. Este formulário está sendo assinado voluntariamente por mim, indicando meu consentimento em participar deste estudo. Recebi uma cópia assinada deste consentimento.

assinatura do paciente

9106002

assinatura da testemunha

assinatura do pesquisador

ANEXO 2

UFMG

Universidade Federal de Minas Gerais
Comitê de ética em pesquisa da UFMG - COEP

Parecer nº : ETIC 152/99
Interessado: Prof. Henrique Oswaldo da Gama Torres

DECISÃO:

Após cumprida a diligência foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG, no dia 23.02.2000, o projeto intitulado: «*Avaliação do Papel da Glutamina na Prevenção da Lesão Gastrointestinal Relacionada ao Transplante de Medula Óssea Avaliada pelo ⁵¹ CR-EDTA*» e o Termo de Consentimento, do referido projeto, de interesse do Prof. Henrique Oswaldo da Gama Torres. Acrescentar no Termo de Consentimento o número do telefone do COEP. O relatório final ou parcial deverá ser encaminhado ao COEP um ano após o início do projeto.



Prof. Dr. Dirceu Bartolomeu Greco
Presidente do COEP

Av. Alfredo Balena, 110 - 1º andar
Bairro Santa Efigênia - Cep 30.130-100 - Belo Horizonte-MG
Telefone: (031) 248 9364
FAX: (031) 248-9380 - Telex: (031) 2544

ANEXO 3

Principais dados demográficos, clínicos e terapêuticos dos pacientes

Paciente	Idade	Sexo	Diagnóstico	Risco	QT recente	Profilaxia GVHD	Condicio namento	Fonte	Gluta mina
GSC	45	M	LMC – FC	BR	S	P	p	ctp	n
JFV	31	M	LMA – R	AR	N	P	p	ctp	n
LCAS	34	F	LMA – R	AR	N	P	np	ctp	n
MCPM	47	F	LMC – FC	BR	S	P	p	mo	n
AAL	26	F	LMC – FC	BR	.	P	p	mo	n
ORF	50	F	SMD	AR	N	P	p	ctp	n
RRL	21	F	LLA – R	AR	S	np	p	ctp	n
MLSM	39	M	LMC – FA	AR	S	P	p	ctp	s
NFO	51	F	LMC – FC	BR	S	P	p	ctp	n
HPP	32	M	LLA – R	AR	S	P	p	ctp	n
JGN	28	M	LMC – FC	BR	N	P	p	mo	n
REF	26	F	LMC – FC	BR	S	P	p	mo	n
FCC	23	F	LMA – R	AR	S	P	p	ctp	n
ACG	44	M	LLA – R	AR	N	P	p	ctp	n
JDPF	22	M	LMC – FC	BR	S	P	p	mo	s
CHF	25	M	LMC – FC	BR	S	P	p	ctp	s
JGB	50	F	LAS	AR	N	P	p	ctp	s
SLAS	36	M	LMC – FA	AR	S	P	p	ctp	n
AMO	19	M	LMC – FC	BR	S	P	p	mo	s
KSM	39	M	LMC – FC	BR	S	P	p	ctp	n
CG	35	M	LMC – FC	BR	S	P	p	mo	n
SFM	30	F	LMC – FC	AR	S	P	p	mo	s
MLAL	50	F	LMC – FC	BR	S	P	np	mo	s
PGS	31	F	LMA – rem	BR	S	P	p	ctp	n
VMM	53	F	LMC – FC	BR	S	P	p	mo	s
MCTC	51	F	LAS	AR	S	P	p	ctp	s
MAG	40	F	MM	AR	N	P	np	ctp	n
JMD	30	M	LMC – FC	BR	S	P	p	ctp	s
MGGM	42	F	LMA – R	AR	S	P	p	ctp	n
LL	26	M	LMA – R	AR	N	P	p	ctp	s
WR	31	M	LMC – FC	BR	S	P	p	ctp	n
MS	46	F	LMC – FC	BR	S	P	p	ctp	s
VAC	42	F	LMC – FC	BR	S	P	p	ctp	n
VCV	40	M	LMC – FC	BR	S	P	p	mo	n
DGM	32	M	LMC – FC	BR	S	P	p	ctp	s
VLG	26	F	LMC – FC	BR	S	P	p	ctp	s
RASL	40	M	LMC – FC	BR	S	P	p	mo	n
ECN	24	M	LLA – R	AR	N	P	np	ctp	s
JS	20	F	LMA – R	AR	N	.	.	.	n
NA	40	F	LMC – FC	BR	N	P	p	ctp	n
MRSA	37	F	LMC – FC	BR	N	P	p	ctp	n
RMB	44	F	LMA – rem	BR	S	P	p	ctp	s
JIA	50	M	LMC – FC	BR	S	P	np	ctp	n
AMBO	40	F	LMC – FC	BR	S	P	p	mo	s
JWV	49	M	LMC – FC	BR	S	P	p	ctp	n
OCF	35	M	LMA – R	AR	S	P	p	ctp	s
MDS	48	F	LMC – FA	AR	N	P	p	ctp	s
MLSR	40	F	LLA – rem	BR	N	P	np	ctp	n

ADS	25	F	LMA – R	AR	S	P	p	ctp	s
DLM	56	F	LMC – FC	BR	S	np	np	ctp	s
MOV	37	F	LMC – FC	BR	S	P	p	mo	n
EMLM	40	F	LMC – FC	BR	S	P	p	mo	s
LBL	35	M	LMA – rem	BR	S	P	p	ctp	s
EFLA	23	M	LMC – R	AR	S	np	np	ctp	n
JGS	51	M	LAS	BR	N	np	np	ctp	s
WC	48	M	LMC – FC	BR	S	P	p	mo	s
HQ	32	F	LLA – R	AR	S	np	p	ctp	s
LAS	39	F	LMA – rem	BR	S	P	p	ctp	n
ASS	26	M	LMC – FC	BR	S	P	p	mo	n
EC	33	M	LMC – FC	BR	S	P	p	mo	n
APDR	31	M	LMC – FA	AR	N	P	np	ctp	s

Diagnóstico: LLA = leucemia linfocítica aguda/ LMA = leucemia mielóide aguda

LAS = leucemia aguda secundária / SMD = síndrome mielodisplásica/ LMC = leucemia mielóide crônica/ MM = mieloma múltiplo/ R = recidivada/ rem = remissão / FC = fase crônica/ FA = fase acelerada

Risco: BR = baixo risco/ AR = alto risco

Profilaxia GVHD/Condicionamento: p = padrão; np = não padrão

Fonte: ctp = célula tronco periférica / mo = medula óssea

As linhas com preenchimento cinza correspondem aos casos que não entraram no sorteio

ANEXO 4

Dados relativos às infecções

	infec	hem +	Cateter	atb	t atb	anf	t anf
grupo 1	21 (78%)	10 (37%)	7 (26%)	21 (78%)	13,92	11 (41%)	7,61
grupo 2	24 (92%)	12 (46%)	4 (15%)	22 (85%)	15,92	13 (50%)	6,83
valor de <i>p</i>	0,250	0,505	0,349	0,529	0,553	0,502	0,802

Infec: infecções clínicas; hem +: hemoculturas positivas; cateter: culturas de cateter positivas; atb: antibioticoterapia (terapêutica); t atb: tempo de antibioticoterapia; anf: antifúngicos em caráter terapêutico; t anf: tempo de antifúngicos

ANEXO 5

Comparação não pareada das médias das medidas de permeabilidade intestinal conforme desfechos clínicos

medida	Tempo	n	Desfechos											
			óbito aos 180 dias			óbito aos 100 dias			DECH grave (graus 3 e 4)			infecção		
			sim	não	p	Sim	Não	p	Sim	não	p	sim	não	p
lactulose	D-6	44	0,168±0,109	0,127±0,083	0,163	0,175±0,128	0,134±0,081	0,205	0,190 ± 0.108	0,122 ± 0.082	0,025*	0,143±0,097	0,157±0,097	0,753
	D+6	45	0,171±0,080	0,181±110	0,735	0,152±0,80	0,187±0,103	0,263	0,169 ± 0.080	0,179 ± 0.104	0,761	0,168±0,089	0,233±0,137	0,132
	D+14	36	0,210±0,103	0,167±0,081	0,172	0,250±0,109	0,164±0,076	0,014*	0,204 ± 0.104	0,174 ± 0.085	0,380	0,186±0,095	0,163±0,061	0,580
manitol	D-6	44	0,198±0,086	0,177±0,084	0,414	0,176±0,091	0,190±0,083	0,617	0,202 ± 0.088	0,178 ± 0.083	0,382	0,186±0,090	0,191±0,030	0,945 [#]
	D+6	45	0,127±0,062	0,145±0,062	0,338	0,114±0,062	0,147±0,061	0,104	0,128 ± 0.070	0,140 ± 0.060	0,552	0,135±0,065	0,152±0,041	0,536
	D+14	36	0,098±0,04	0,083±0,042	0,327	0,100±0,040	0,085±0,042	0,384	0,083 ± 0.030	0,091 ± 0.046	0,628	0,085±0,041	0,107±0,043	0,248
Rel.lac- tulose/ manitol	D-6	45	0,101±0,79	0,654±0,435	0,154 [#]	1,207±0,917	0,655±0,411	0,061 [#]	1,159 ± 0.811	0,623 ± 0.426	0,013 [#]	0,801±0,653	0,808±0,480	0,981
	D+6	47	1,552±0,822	1,331±0,614	0,296	1,546±0,899	1,375±0,623	0,459	1,513 ± 0.766	1,396 ± 0.699	0,628	1,411±0,725	1,509±0,667	0,741
	D+14	38	2,205±0,847	1,993±1,063	0,537	2,558±0,897	1,934±0,967	0,114	2,527 ± 1.069	1,901 ± 0.922	0,085	2,174±0,998	1,585±0,840	0,157

D-6 = dia -6

D+6 = dia +6

D+14 = dia +14

Rel.lactulose/manitol = relação entre as frações de excreção da lactulose e do manitol

* = p < 0,05

[#] = diferença das médias avaliadas pelo método de Kruskal Wallis

Rel.lac-tulose/manitol

Trabalhos Publicados

Torres HOG, Vilela EG, da Cunha AS, Goulart EM, Souza MH, Aguirre AC, Azevedo WM, Lodi FM, Bittencourt HN. Glutamine Dipeptide Enriched Parenteral Nutrition Significantly Increase Short-Term Survival after HLA-Identical Allogeneic Stem Cell Transplantation. Blood 2006 108: Abstract 598

da Gama Torres HO, Vilela EG, da Cunha AS, Goulart EM, Souza MH, Aguirre AC, Azevedo WM, Lodi FM, Silva AA, Bittencourt HN Efficacy of glutamine-supplemented parenteral nutrition on short-term survival following allo-SCT: a randomized study. Bone Marrow Transplant. 2008;41:1021-7.

Blood (ASH Annual Meeting Abstracts) 2006 108: Abstract 598
 © 2006 American Society of Hematology

Oral Sessions

Glutamine Dipeptide Enriched Parenteral Nutrition Significantly Increase Short-Term Survival after HLA-Identical Allogeneic Stem Cell Transplantation.

Henrique O.G. Torres^{1,*}, Eduardo G. Vilela^{1,*}, Aloisio S. Cunha^{1,*}, Eugenio M.A. Goulart^{1,*}, Marcelo H.C. Souza^{1,*}, Ana Carolina C. Aguirre^{1,*}, Wellington M. Azevedo^{1,*}, Fernanda M. Lodi^{1,*} and Henrique N.S. Bittencourt¹

¹ Hospital das Clínicas/Faculdade de Medicina, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil.

Abstract

Sixty-one consecutive patients with hematologic malignancies submitted to HLA-identical sibling allogeneic stem cell transplantation (allo-SCT) were followed in order to evaluate the relationship between the use of glutamine as part of parenteral nutrition (PN) and death/complications related to the procedure. Patients were randomly and blindly assigned to receive either glutamine enriched PN (group 1) or regular PN (group 2). The glutamine dipeptide (Dipeptiven® - Fresenius Kabi) was associated with parenteral nutrition in the first week following transplantation (D0–D+6). Infectious complications, acute GVHD, length of stay (LOS), deaths on D+100 and D+180 and, when possible, intestinal permeability as measured by urinary excretion of lactulosis and mannitol (on admission, D+6 and D+14) were the end-points. Eight patients were excluded from randomization because they refused to take glutamine or glutamine was not available on D0, but were followed and analyzed as controls, so that group 1 comprised 27 patients and group 2 thirty-four (26+8). Demographics did not differ between groups (age - 37 ± 11 versus 36 ± 8.7 , and gender - 14 versus 18 females). Diseases (CML n=37; AML n=12; ALL n=7; MDS n=4; MM n=1) were equally distributed between groups. Patients on group 1 received an average of 23.4g of glutamine/day, corresponding to 49% of the average protein delivery through PN (total 47.9g, against 50 g/day on group2, NS). They were allowed to eat *ad libitum*. Infection and acute GVHD incidences, and LOS median (36 versus 36.5) were similar on both groups. Intestinal permeability, which showed to be already affected on admission, was

not affected by the use of glutamine, but consistently worsened throughout the study, from admission to D+14. Transplant-related mortality (TRM) rate was 29.5% on D+100 (18 deaths, 4 on group 1 and 14 on group 2) and 40.1% on D+180 (25 deaths, 7 on group 1 and 18 on group 2). Survival analysis showed statistical difference on univariate analysis, with a better survival for Group 1 both on D+100 ($p=0.02$, log-rank) and D+180 ($p=0.02$). A Cox regression model was applied using variables that showed a p value of less than 0.2 (diagnosis-related risk, graft source - peripheral blood or bone marrow, conditioning regimen and use of glutamine). Use of glutamine, both on D+100 (HR 6.4; CI95% 1.81–22.44 - $p=0.004$) and D+180 (HR 4.9; CI95% 1.76–13.61 - $p=0.002$) was associated with a significantly higher chance of survival. Statistical significance is maintained if the cases excluded from randomization are also excluded from analysis. The results showed that glutamine dipeptide enriched PN plays a role on increasing short-term survival after allo-SCT. Benefits of glutamine dipeptide seems to be independent of mucosal damage/recovery, at least on short term, as intestinal permeability between admission and D +14 was not affected by its use



ORIGINAL ARTICLE

Efficacy of glutamine-supplemented parenteral nutrition on short-term survival following allo-SCT: a randomized study

HO da Gama Torres^{1,2}, EG Vilela³, AS da Cunha^{2,3}, EMA Goulart², MHC Souza², ACC Aguirre², WM Azevedo², FM Lodi⁴, AA Silva⁵ and HNS Bittencourt^{2,4}

¹Nutritional Support Committee, Hospital das Clínicas, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil; ²School of Medicine, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil; ³Department of Gastroenterology, Instituto Alfa de Gastroenterologia, Hospital das Clínicas, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil; ⁴Department of Hematology/Bone Marrow Transplantation, Hospital das Clínicas, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil and ⁵Pharmacy, Hospital das Clínicas, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil

Fifty-three patients with hematological malignancies who underwent Allo-SCT from HLA-identical siblings were randomly assigned to receive glutamine-enriched parenteral nutrition—PN (GIPN, $n = 27$) or standard PN (PN, $n = 26$), in isonitrogenous solutions. Deaths (D + 100 and D + 180), infections, acute GVHD, length of stay, time of neutropenia and intestinal permeability (IP) were studied. Ages, gender, diagnosis, disease status and treatment variables were equally distributed between groups. Survival on D + 180 was increased in GIPN (74%) vs PN (46%), $P = 0.03$ (log-rank), as on D + 100 ($P = 0.05$). Most deaths occurred before D + 100, especially in PN (10/26, 39%) vs GIPN (4/27, 15%). GVHD was the most frequent cause of death (8/21, 38%), especially in PN ($n = 6$, five before D + 100). Other outcomes were not affected. IP was affected on admission, was not affected by glutamine enrichment, but consistently worsened throughout the study. Results showed that GIPN was efficacious in increasing short-term survival after Allo-SCT. Benefits of glutamine seem to be independent of mucosal protection, as IP was not affected by its use. A trend to a lower incidence of GVHD deaths may suggest an immunomodulatory role of glutamine.

Bone Marrow Transplantation (2008) 41, 1021–1027; doi:10.1038/bmt.2008.27; published online 3 March 2008

Keywords: survival; stem cell transplantation; glutamine; parenteral nutrition

Introduction

Conditioning regimens for Allo-SCT are associated with complications that cause significant morbidity and may

affect prognosis.¹ Within 1 week of myeloablative regimens patients develop mucositis, which causes significant discomfort, morbidity and precludes adequate oral intake.¹

Disruption of the gastrointestinal (GI) mucosal barrier facilitates translocation of microorganisms and/or endotoxins into the blood stream.^{1,2} It has been hypothesized that these substances stimulate the production of cytokines by endothelial cells and macrophages, which, in turn, upregulates adhesion molecules and MHC antigens, leading to an increased recognition of host MHC or mHA by mature donor T cells. This is recognized as a major mechanism underlying GVHD.³ In addition, there are nutritional and metabolic consequences with an overall decrease in body cell mass and negative nitrogen balance.⁴ Energy expenditure may also be increased and carbohydrate metabolism impaired.^{5,6}

Glutamine, the most abundant free amino acid in the organism, is a nonessential amino acid that has been considered 'conditionally' essential due to its critical role in conditions such as sepsis, trauma and burns, and to the fact that low levels have been correlated with prognosis.⁷ The rationale for its use lies in its putative properties on enterocytes and immune cell metabolism regulation.^{8–14}

Studies comparing nutritional support with and without glutamine supplementation in SCT have been conducted with the assumption stated above for critical conditions, that is, glutamine exerts a protective effect on gut mucosal barrier and stimulates immune cell proliferation. Indeed, end points such as infection rate, hospital stay and nitrogen balance have been shown to improve in some studies, but others have failed to demonstrate positive outcomes.^{15–20} Inclusion of non-homogeneous populations (with a variety of diagnoses, prognoses and types of SCT) might have contributed to the different results observed.²¹

To evaluate the role of glutamine on clinical outcomes after myeloablative Allo-SCT, we conducted a double-blind randomized study comparing patients who received glutamine-enriched parenteral nutrition (GIPN) with patients who received standard parenteral nutrition (PN). Intestinal permeability (IP) tests were also performed to evaluate a possible protective effect of glutamine on GI mucosal barrier.

Correspondence: Dr HO da Gama Torres, Departamento de Clínica Médica, Faculdade de Medicina da UFMG, Av. Professor Alfredo Balena 190, Belo Horizonte, Minas Gerais 30130-100, Brazil.

E-mail: torresh@medicina.ufmg.br

Received 2 October 2007; revised 31 December 2007; accepted 20 January 2008; published online 3 March 2008

Patients and methods

Patients

Fifty-three consecutive leukemia patients aged 18–64 who underwent HLA-identical sibling Allo-SCT after myeloablative conditioning regimen were included. After providing informed consent, patients were randomly assigned either to receive GIPN or standard PN. Random numbers were generated by the statistical program EPIINFO 6.04 and were drawn to assign patients to one of the groups. The randomization was performed by the pharmacist in charge of preparing the PN. Patients and the clinical transplantation team were blinded for the assigned arm. PN solutions were not identified for glutamine supplementation.

Patients were classified as having either low- or high-risk disease. Low-risk patients were those with CML in first chronic phase, acute leukemia in first remission and myelodysplasia with refractory anemia with or without ringed sideroblasts, whereas high-risk patients were CML in accelerated phase, acute leukemias beyond first remission and myelodysplasia beyond refractory anemia.

Patients undergoing Allo-SCT for benign diseases and those who presented solid tumors or lymphomas were excluded. Patients with renal failure, cirrhosis, congestive heart failure, nephrotic syndrome or other diseases that interfered with the absorption and flux of water and solutes were also excluded to avoid interference with IP tests.

Conditioning regimen and GVHD prophylaxis

Conditioning and GVHD prophylaxis were classified dichotomically as standard or non-standard. Standard conditioning included the combination of BU 16 mg/kg and CY 120 mg/kg. Non-standard conditioning involved the use of fludarabine or etoposide, substituting for or in association with the standard regimen drugs. As for GVHD prophylaxis, the standard regimen was the one that involved the use of CYA and MTX, and non-standard regimen the one in which MTX was replaced by corticosteroids. First-line treatment for acute GVHD was i.v. methylprednisolone 2 mg/kg for all patients.

Parenteral nutrition

Parenteral nutrition was prepared at the hospital pharmacy and delivered in bottles containing a mixture of 500 ml of 10% crystalline amino-acid solution with 500 ml of 50% dextrose and water, yielding a 25% concentration of glucose and a non-protein calorie/nitrogen relation of approximately 110 cal/g. Daily needs of electrolytes, vitamins and microelements were supplied.

A dose of 0.3–0.4 g/kg/day of L-alanyl-L-glutamine dipeptide (Dipeptiven, Fresenius-Kabi, Campinas, São Paulo, Brazil), corresponding to 0.2–0.27 g/kg/day of glutamine, was added to PN of GIPN patients during the first week of transplantation, that is, from the day of stem cell infusion (D0) to the sixth day after infusion (D+6). The corresponding amount of standard amino acids was removed from the solution to prepare isonitrogenous solutions for both groups. Patients were allowed to eat *ad libitum*. Patients who needed to continue on PN after D+6 were kept on standard solutions.

Intestinal permeability study

Intestinal permeability tests with lactulose and mannitol were performed in an attempt to measure conditioning-related intestinal mucosal damage. When allowed by patients' clinical condition, IP tests were performed on admission, D+6 and D+14. IP was measured in a 6 h urine sample that was collected after ingestion of a 120 ml isomolar solution that contained 6.0 g of lactulose (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) and 3.0 g of mannitol (Sigma-Aldrich), offered after a 9 h night fast. Before the 6 h collection, patients were instructed to void urine. The 6 h urine volume was registered and 50 ml of the urine was stored in vials containing 12 mg of timerosal (Labsynth, São Paulo, Brazil) to prevent bacterial growth and was stored at -20°C . On the day of analysis, samples were thawed in a warm bath and urine was filtered (Millipore filters, 0.2 mm, São Paulo, Brazil) and passed over an ion exchange resin (Mixed Bed Resin TMD-8, Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA). Urinary measurements of lactulose and mannitol were performed by means of high performance liquid chromatography (HPLC, Shimadzu, Kyoto, Japan). Specific column and pre-column (Supelco C-610H, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) were used for separating the sugars and a mobile phase was applied. Curves were obtained using a refraction index detector. The area under the curve was calculated and plotted against a line graph previously drawn using known concentrations of the sugar, which yielded the concentration of the sample tested. Values of permeability were expressed as lactulose excretion fraction, mannitol excretion fraction and lactulose/mannitol ratio.

Statistical analysis

Primary end points were survival on D+100 and D+180. Secondary end points included length of stay, clinical infection rate, incidence of grades III–IV acute GVHD, time of neutrophil counts $<0.5 \times 10^9/l$ and IP as measured by lactulose and mannitol urinary excretion fraction and lactulose/mannitol excretion ratio. As all patients were on prophylactic antimicrobials, clinical infection was defined as a need to add or change antimicrobials as judged by medical staff based on the finding of fever with or without clinical (skin, lung, sinus and so on) and/or microbiological (blood culture, urine culture and so on) signs of infection. Acute GVHD was diagnosed and graded according to the established criteria.²²

The following prognostic variables were analyzed: diagnosis-related risk, conditioning regimen, GVHD prophylaxis regimen, graft source (BM or peripheral blood), gender, donor–receptor gender match and age (below and equal or above 40 years). Survival on 100 and 180 days was analyzed using Kaplan–Meier curves, comparing the variable glutamine use in GIPN and PN with the log-rank test. The above dichotomic variables corresponding to prognostic factors were also subjected to Kaplan–Meier univariate survival analysis. Yates corrected χ^2 test and, when needed, Fisher's exact test were used to compare prognostic factors and outcomes expressed in categorical variables. A comparison of continuous variables and values of IP between GIPN and PN was carried out by the *t* test

for non-paired samples. Whenever a non-gaussian distribution was observed, a comparison between medians by Kruskal–Wallis test was carried out. As for the comparison between means within the same group, on admission, D + 6 and D + 14, paired Student's *t* test was used. A cutoff point for normal IP established from a previous study of our group²³ was used to describe the distribution of values within the sample before conditioning. Mean plus 2 standard deviations for lactulose/mannitol ratio (0.26) and lactulose excretion fraction (0.062) and mean minus 2 standard deviations for mannitol excretion fraction (0.16) were used.

This study was approved by the Federal University of Minas Gerais Ethics Committee and informed consent was obtained from all patients, according to the Helsinki protocol.

Results

Patients and glutamine supplementation

Fifty-three patients who underwent HLA-identical sibling Allo-SCT, between October 2001 and September 2004, were eligible for the study and were randomized. Another five patients refused to take part and, for three patients, glutamine was not available at the time of randomization. Patients, disease characteristics and treatment were similar between the two groups as summarized in Table 1.

Patients on GIPN received an average of 23.4 g of glutamine/day, corresponding to 49% of the average protein delivery through PN (47.9 g against 50 g/day on PN group, NS). Oral intake was not recorded.

Clinical outcomes

Overall survival was 74% on D + 100 and 60% on D + 180 for the whole population. Survival improved significantly in GIPN group on D + 100 (85 vs 62%, *P* = 0.05, log-rank) and on D + 180 (74 vs 46%, *P* = 0.03, log-rank; Figure 1). As survival analysis for the other variables with prognostic implications on D + 100 and D + 180—diagnosis-related risk, conditioning regimen, GVHD prophylaxis regimen, graft source, gender, donor–recipient gender match and age showed *P*-values above 0.2, Cox regression analysis was not performed.

Timing and causes of death are shown in Table 2. A higher death rate before D + 100 and a higher frequency of GVHD as a cause of death occurred in PN, although without statistical significance. Three cases of graft failure occurred in PN. Incidence of acute GVHD was equally distributed between GIPN and PN groups (63 vs 54%, respectively, *P* = 0.69). There was no difference between GIPN and PN groups for grade III–IV acute GVHD (26 vs 31%, *P* = 0.93). GI GVHD was present, alone or in combination, in 20 patients, 11 in GIPN and 9 in PN. Grade III–IV GVHD GI involvement occurred in six patients in GIPN and seven patients in PN. Ten patients who died before D + 100 had GI GVHD. Even though all these deaths may not have been attributed to GVHD, seven (six before D + 100) out of nine patients who developed GI GVHD in PN group died, whereas only 3 out of 11 patients (all before D + 100) with gut GVHD died in GIPN. There were 30 cases of chronic GVHD, 16 in GIPN and 14 in PN (59 × 54%, *P* NS).

Other secondary end points showed no differences between groups. There was a trend to a lower clinical infection rate (78 vs 92%, *P* = 0.25) and to a shorter period

Table 1 Demographics, diagnosis and treatment characteristics

Characteristics	GIPN (n = 27)		PN (n = 26)		P
	Low risk	High risk	Low risk	High risk	
Age (years)	37.33 ± 11.06		35.96 ± 8.71		0.7
Gender (female)	14 (52%)		14 (54%)		0.9
<i>Dx/disease status</i>					
CML	13 (48%)	4 (15%)	13 (50%)	3 (12%)	
AML	2 (7%)	3 (11%)	2 (8%)	4 (15%)	
ALL	0	2 (7%)	0	3 (12%)	
Myelodysplasia	0	3 (11%)	0	1 (4%)	
Total	15	12	15	11	0.9
<i>Conditioning</i>					
BU/CY	22 (81.5%)		24 (9%)		0.42
Other	5 (18.5%)		2 (8%)		
<i>GVHD prophylaxis</i>					
CsA/MTX	24 (90%)		24 (92%)		1
Other	3 (11%)		2 (8%)		
<i>Graft source</i>					
Peripheral blood	19 (70%)		19 (73%)		0.93
BM	8 (30%)		7 (27%)		
Gender mismatch	16 (60%)		11 (42%)		0.34
Female donor for male recipient	4 (15%)		6 (23%)		0.5

Abbreviations: Dx = diagnosis; GIPN = glutamine-enriched parenteral nutrition; PN = parenteral nutrition.

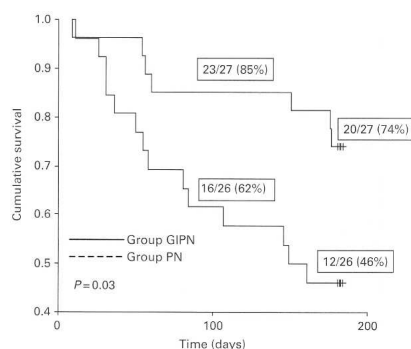


Figure 1 Cumulative survival on D+180.

Table 2 Timing and causes of death

Causes of death	Timing			
	GIPN (n = 27)		PN (n = 26)	
	D+100	D+180	D+100	D+180
GVHD	1	2	5	6
Infection	2	3	3	4
Graft failure	0	0	2	3
Relapse	0	1	0	1
ARDS	1	1	0	0
Cumulative incidence of death	15%	26%	38%	54%

Abbreviations: ARDS = acute respiratory distress syndrome; GIPN = glutamine-enriched parenteral nutrition; PN = parenteral nutrition.

of neutropenia (8.6 vs 10.9 days, $P=0.18$) in the GIPN group. There was no difference regarding length of stay (39.4 vs 38.4 days, $P=0.74$) for GIPN and PN group, respectively.

Intestinal permeability testing

Urine samples for IP studies were obtained in 45 patients (84.9%) on admission, 47 (88.7%) on D+6 and 38 (71.7%) on D+14. Some patients with oral mucositis, diarrhea and infection were unable to perform the test. IP tests showed no differences between groups.

All IP measurements worsened importantly throughout the study—there were significant rises in lactulose excretion fraction and lactulose/mannitol relationship from admission to D+14 and a significant fall in mannitol excretion fraction throughout the study period (Table 3).

With regard to normal controls, alterations in measurements above the average plus 2 standard deviations were found in most measurements of lactulose/mannitol relationship (39/45, 86.7%) and lactulose excretion fraction (36/44, 81.8%) before conditioning, on admission. In contrast, alterations below average minus 2 standards

Table 3 comparison of permeability tests throughout the study (all patients)

Measure	N	Means	P
Lactulose admission	38	0.141 ± 0.099	0.09
Lactulose D+6	38	0.178 ± 0.091	
Lactulose D+6	31	0.179 ± 0.097	0.95
Lactulose D+14	31	0.180 ± 0.093	
Lactulose admission	31	0.141 ± 0.074	0.04
Lactulose D+14	31	0.180 ± 0.091	
Mannitol admission	38	0.182 ± 0.087	0.004
Mannitol D+6	38	0.135 ± 0.060	
Mannitol D+6	31	0.143 ± 0.060	<0.001
Mannitol D+14	31	0.094 ± 0.038	
Lactulose/mannitol admission	41	0.812 ± 0.650	<0.001
Lactulose/mannitol D+6	41	1.460 ± 0.655	
Lactulose/mannitol D+6	34	1.366 ± 0.668	0.001
Lactulose/mannitol D+14	34	1.974 ± 0.878	

Abbreviation: Lactulose/mannitol = lactulose/mannitol relationship.

deviations were found in only 5 out of 44 (11.4%) measurements of mannitol excretion fraction on admission.

Discussion

We observed improved survival, both on D+100 and D+180, for patients who received glutamine dipeptide-enriched PN after a myeloablative allo-SCT. We were able to enroll a homogeneous population with respect to age, diagnosis, conditioning, GVHD prophylaxis and graft source. The predominance of CML, which was in part responsible for this homogeneity, occurred because imatinib was not available for the Brazilian public health-care system as first-line treatment at the time the study was carried out.

As shown in Table 2, most deaths occurred before D+100, predominantly in PN—a 15% death rate in GIPN against 38% in PN, $P=0.10$. In contrast, death rate after D+100 was similar in number in both groups—11% in GIPN against 15% in PN, $P=0.70$. If we consider one relapse in each group, which should not be affected by glutamine, these results are more striking. Even though numbers are too small to show statistical significance, they may suggest that a putative glutamine effect should have occurred before D+100. Because of the small sample size, there is, however, a possibility that the observed effects of glutamine on the study population may have occurred by chance.

An analysis of causes of death showed that the main causes in this period were GVHD and infection. Even though severe, grade III–IV, acute GVHD rate did not show statistical differences between groups, 75% of GVHD associated deaths (6/8) occurred in PN group, five of them before D+100, which might lead us to consider the possibility of a protective effect of glutamine supplementation in this situation. A lower, albeit nonsignificant, incidence of grade ≥ 2 GVHD for glutamine-supplemented SCT patients has been found by others.²⁰

Outcome comparisons in glutamine supplementation studies in SCT have been hampered by the lack of

comparability among populations, which have included a mixture of different types of diagnosis and transplants (autologous and/or allogeneic).²¹ In addition, these studies have not stated possible differences in disease status, that is, the type and the stage of transplantation. Even though disease stage should impact on late death rates due to relapses, it may also impact on early transplant-related death or treatment failures and should be taken into account when comparing interventions in SCT.^{24,25} A Cochrane collaboration review addressed the issue of glutamine supplementation in SCT, with a favorable conclusion.²⁶ Among the three articles selected to evaluate PN glutamine supplementation, only one seems to show a more homogeneous population and distribution of patients between groups.¹⁵ It includes only allogeneic transplantation and there are minor differences in diagnoses between groups. The other two present both allogeneic and autologous SCT, including some solid tumors and showing differences in diagnosis between groups.^{16,27} As sample sizes are small ($n=42$, 29 and 34), differences between groups that do not appear as statistically significant may have an influence on final results. These three studies have many subgroups of diagnosis with very small numbers in some of them. With regard to other variables that might have an influence on prognosis, only few prognostic factors were specifically addressed: donors' kinship in one study and conditioning regimen (the frequency of distribution was not always stated). Two studies comprised a mixture of allogeneic and autologous SCT.^{16,27} As there has been a suggestion that autologous transplant patients who receive glutamine fare worse than those on standard PN, a fact that has not been observed in allogeneic transplant patients, one may speculate that results of glutamine supplementation in allogeneic transplantation may be underestimated due to negative results with autologous transplantation.¹⁹ Anyway, in accordance with previous statement, it seems difficult to draw any conclusion on the efficacy of glutamine based on previous studies.²¹

Contrary to our initial hypothesis, glutamine seemed to exert no effect on gut integrity as evaluated by IP tests, as already shown by others.^{20,28,29} A protective role on GI tract mucosa that is specific to glutamine is still under scrutiny by the literature^{30,31} and if such an effect indeed exists, one possible explanation for its absence is that the damage to the mucosa is so intense in the first few weeks after conditioning that a protective effect could not overcome it.

Analysis of IP measurements shows, as has been demonstrated before,^{26,32} that these measurements were already abnormal before conditioning in most patients. Functional (as measured by lactulose excretion) in addition to anatomical (measured by mannitol) integrity of GI mucosa could be the cause of IP alterations on admission,^{33,34} as disease itself may be responsible for it, and not only previous chemotherapy. Considering the possible effect of initial endotoxin and cytokine liberation on GVHD pathogenesis, a role of this preconditioning SCT 'leaky' gut should be evaluated.

Intestinal permeability measurements worsened importantly throughout the study and remained impaired on the latest evaluation, when symptoms of mucositis might have

abated, a type of behavior that has been demonstrated before.²⁹

Our IP values show differences from literature specifically lactulose excretion rate, and, as a consequence, lactulose/mannitol relationship, a fact that could be attributed to different test conditions and methodology, and geographical differences.^{35,36} Even though differences from reported IP values must be pointed out, the qualitative behavior of the probes is similar to what has been found by others.^{20,28,29}

If the effects of glutamine on GI mucosal barrier could not be shown to account for mortality reduction, immune and metabolic effects should be evoked. Previous studies have shown a reduction in mortality and complication rates 6 months after GIPN in intensive care unit populations. Even though GI mucosal barrier evaluations were not carried out, immune enhancement was brought up as a possible explanation for better outcomes. There is a great deal of *in vivo* and *in vitro* experimental evidence relating increased glutamine availability to animals or to cultivated human or animal lymphocytes, macrophages or neutrophils with increased cell proliferation, phagocytic activity, cytokine production, antigen presentation, superoxide production and diminished neutrophil apoptosis.³⁷⁻⁴⁷

T-cell and CD4 count and T-cell DNA synthesis as surrogate end points have been affected by glutamine provision to postoperative patients.^{48,49} Flow cytometry lymphocyte count performed 1-2 weeks after discharge from SCT have shown increased CD4 and CD8 counts in response to glutamine.⁵⁰

Another possible role of glutamine in the immune system would be an immunomodulatory action on intestinal immune cells; especially in gut-associated lymphoid tissue. PN with glutamine has been associated with preservation of intestinal IgA and anti-inflammatory cytokines IL-4 and IL-10 levels in animals in contrast to low levels of these substances found in animals fed with PN without glutamine.⁵¹ Also, lipopolysaccharide-stimulated lymphoid tissue from intestinal lamina propria was able to preserve IL-4 and IL-10 mRNA expression in response to GIPN, in contrast to standard PN.⁵² Expression of vascular adhesion molecules that promote neutrophil adhesion to vascular wall and tissue injury has been shown to be reduced in animals that received glutamine, and this effect seems to be associated with higher levels of anti-inflammatory cytokines. A reduction of levels of proinflammatory IL-8 and IL-6 have been found in glutamine-treated specimens of intestinal biopsies from volunteers fed with glutamine.⁵³ Mononuclear cells from pancreatitis patients treated with glutamine also showed reduced production of IL-8.⁵⁴ Others have shown reduced levels of C-reactive protein and increased lymphocyte counts in pancreatitis in response to glutamine supplementation.⁵⁵ These effects suggest that glutamine may induce a Th2 type response in gut-associated lymphoid tissue lymphocytes in response to some noxious stimuli. If this is true and if the paradigm of the Th1 type of polarization of donor lymphocytes still holds as an important explanation for acute GVHD induction, one might speculate on a possible contribution of glutamine toward the stimulation of a Th2 type of response by activated donor lymphocytes.



This immunomodulatory action might be a possible explanation for the increased early survival in glutamine-supplemented patients, especially as it relates to effects on cytokine storm following conditioning and its role on pathogenesis of GVHD.

Metabolic effects, especially better nitrogen balance and lower plasma glucose levels have also been evoked as important glutamine actions in intensive care population and should be evaluated as a possible explanation for a better outcome. Better nitrogen balance has already been shown in SCT glutamine-supplemented patients.¹⁶ Worst glycemic control has been found in PN-treated SCT patients and it has been related to increased morbidity.⁵⁶

In conclusion, glutamine-supplemented PN was efficacious in reducing short-term mortality in a relatively homogeneous Allo-SCT population. This effect could not be attributed to a preservation of gut mucosal integrity, as IP measurements did not show differences between groups. In contrast, the bulk of experimental data relating glutamine to immune function would suggest a possible mechanism of action for the amino acid. Of special interest, a reduction on the incidence of death-related GVHD as shown here, albeit lacking statistical significance, may suggest an immunomodulatory role of glutamine in SCT that might deserve further research.

Acknowledgements

HOGT designed the study, took part in the collection of clinical and outcome information and in the performance of intestinal permeability tests; EGV and ASC were responsible for intestinal permeability tests; EMAG took part in the study design and statistical/epidemiological analysis; MHCS and ACCA took part in data collection and performance of intestinal permeability tests; WMA and FML took part in study design and in the collection of clinical and outcome information; AAS was responsible for randomization and technical aspects concerning PN and glutamine supplementation; HNSB took part in the collection of clinical and outcome information and statistical/epidemiological analysis.

Funding: Glutamine was supplied without charge by Fresenius Kabi, Campinas, Brazil.

Disclosure

There are no conflicts of interests to disclose.

References

- Blijlevens NMA. Implications of treatment-induced mucosal barrier injury. *Curr Opin Oncol* 2005; **17**: 603–611.
- Johanson JE, Ekman T. Gastrointestinal toxicity related to bone marrow transplantation: disruption of the intestinal barrier precedes clinical findings. *Bone Marrow Transplant* 1997; **19**: 921–925.
- Couriel D, Caldera H, Champlin R, Komanduri K. Acute graft-versus-host-disease: pathophysiology, clinical manifestations and management. *Cancer* 2004; **101**: 1936–1946.
- Cheney CL, Abson KG, Aker SN, Lenssen P, Cunningham BA, Buerger NS et al. Body composition changes in marrow transplant recipients receiving total parenteral nutrition. *Cancer* 1987; **59**: 1515–1519.
- Szeluga DJ, Stuart RK, Brookmeyer R, Utermohlen V, Santos GW. Energy requirements of parenterally fed bone marrow transplant recipients. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 1985; **9**: 139–143.
- Smedmyr B, Wibell L, Simonsson B, Oberg G. Impaired glucose tolerance after autologous bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant* 1990; **6**: 89–92.
- Oudemans-van Straaten HM, Bosman RJ, Treskes M, van der Spoel HJJ, Zandstra DF. Plasma glutamine depletion and patient outcome in acute ICU admissions. *Intensive Care Med* 2001; **27**: 84–90.
- Griffiths RD, Jones C, Palmer TEA. Six-month outcome of critically ill patients given glutamine-supplemented parenteral nutrition. *Nutrition* 1997; **13**: 295–302.
- Goeters C, Wenn A, Mertes N, Wempe C, Van Aken H, Stehle P et al. Parenteral L-alanyl glutamine improves 6-month outcome in critically ill patients. *Crit Care Med* 2002; **30**: 2032–2037.
- Boelens PG, Nijveldt RJ, Houdijk APJ, Meijer S, van Leeuwen PAM. Glutamine alimentation in catabolic state. *J Nutr* 2001; **131**: 2569S–2577S.
- Andrew FJ, Griffiths RD. Glutamine: essential for immune nutrition in the critically ill. *Br J Nutr* 2002; **87**: S3–S8.
- Déchlottes P, Hasselmann M, Cynober L, Allaouchiche B, Coëffier M, Hecketsweiler B et al. L-alanyl-glutamine dipeptide-supplemented total parenteral nutrition reduces infectious complications and glucose intolerance in critically ill patients: the French controlled, randomized, double-blind multicenter study. *Crit Care Med* 2006; **34**: 598–604.
- Labow BI, Souba WW. Glutamine. *World J Surg* 2000; **24**: 1503–1513.
- Kudsk KA. Effect of route and type of nutrition on intestine-derived inflammatory responses. *Am J Surg* 2003; **185**: 16–21.
- Ziegler TR, Young LS, Benfell K, Scheltinga M, Hortos K, Bye R et al. Clinical and metabolic efficacy of glutamine-supplemented parenteral nutrition after bone marrow transplantation. *Ann Intern Med* 1992; **116**: 821–828.
- Schloerb PR, Amare M. Total parenteral nutrition with glutamine in bone marrow transplantation and other clinical applications (a randomized double blind study). *JPEN J Parenter Enteral Nutr*. 1993; **17**: 407–413.
- Zaenen HCT, van der Lelie H, Timmer JG, Furst P, Sauerwein HP. Parenteral glutamine dipeptide supplementation does not ameliorate chemotherapy-induced toxicity. *Cancer* 1994; **74**: 2879–2884.
- Schloerb PR, Skikne BS. Oral and parenteral glutamine in bone marrow transplantation: a randomized, double-blind study. *JPEN J Parenter Enteral Nutr*. 1999; **23**: 117–122.
- Pytlík R, Benes P, Patorková M, Chocenská E, Gregora E, Procházková B et al. Standardized parenteral alanyl-glutamine dipeptide supplementation is not beneficial in autologous transplant patients: a randomized, double blind, placebo controlled study. *Bone Marrow Transplant* 2002; **30**: 953–961.
- Blijlevens NMA, Donnelly JP, Naber AHJ, Schattenberg AVMB, de Pauw BE. A randomized, double-blind, placebo controlled, pilot study of parenteral glutamine for allogeneic stem cell transplant patients. *Support Care Cancer* 2005; **13**: 790–796.
- Muscaritoli M, Grieco G, Capria S, Iori AP, Fanelli FP. Nutritional and metabolic support in patients undergoing bone marrow transplantation. *Am J Clin Nutr* 2002; **75**: 183–190.
- Przepiorka D, Weisdorf D, Martin P, Klingemann HG, Beatty P, Hows J et al. 1994 Consensus conference on acute GVHD grading. *Bone Marrow Transplant* 1995; **15**: 825–828.
- Vilela EG, Ferrari MLA, Torres HOG, Martins FP, Goulart EM, Lima AS et al. Intestinal permeability and antigliadin

- antibody test for monitoring adult patients with celiac disease. *Dig Dis Sci* 2007; **52**: 1304–1309.
- 24 Baker KS, Loberiza Jr FR, Yu H, Cairo MS, Bolwell BJ, Bujan-Boza WA et al. Outcome of ethnic minorities with acute or chronic leukemia treated with hematopoietic stem-cell transplantation in the United States. *J Clin Oncol* 2005; **23**: 7032–7042.
- 25 Bittencourt H, Rocha V, Chevret S, Socié G, Espérou H, Devergie A et al. Association of CD34 cell dose with hematopoietic recovery, infections, and other outcomes after HLA-identical sibling bone marrow transplantation. *Blood* 2002; **99**: 2726–2733.
- 26 Murray SM, Pindoria S. Nutrition support for bone marrow transplant patients (Cochrane Review). In: *The Cochrane Library*, Issue 4, Update Software: Oxford, 2007.
- 27 Brown SA, Goringe A, Fegan C, Davies SV, Giddings J, Whittaker JA. Parenteral glutamine protects hepatic function during bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant* 1998; **22**: 281–284.
- 28 Blijlevens NMA, van't Land B, Donnelly JP, M'Rabet L, de Pauw BE. Measuring mucosal damage induced by cytotoxic therapy. *Support Care Cancer* 2004; **12**: 227–233.
- 29 Blijlevens NMA, Donnelly JP, M'Rabet L, de Pauw BE. Prospective evaluation of gut mucosal barrier injury following various myeloablative regimens for haematopoietic stem cell transplant. *Bone Marrow Transplant* 2005; **35**: 707–711.
- 30 Buchman AL. Glutamine: commercially essential or conditionally essential? A critical appraisal of the human data. *Am J Clin Nutr* 2001; **74**: 25–32.
- 31 Alpers DH. Glutamine: do the data support the cause for glutamine supplementation in humans? *Gastroenterology* 2006; **130**: S106–S116.
- 32 Sundstrom GM, Wahlin A, Nordin-Anderson I, Suhr OB. Intestinal permeability in patients with acute myeloid leukemia. *Eur J Haematol* 1998; **61**: 250–254.
- 33 DeMeo MT, Mutlu EA, Keshavarzian A, Tobin MC. Intestinal permeation in gastrointestinal disease. *J Clin Gastroenterol* 2002; **34**: 385–396.
- 34 De-Souza Daurea A, Greene LJ. Intestinal permeability and systemic infections in critically ill patients: effect of glutamine. *Crit Care Med* 2005; **33**: 1125–1135.
- 35 Peeters M, Hiele M, Ghooys Y, Huysmans V, Geboes K, Vantrappen G et al. Test conditions greatly influence permeation of water soluble molecules through the intestinal mucosa: need for standardisation. *Gut* 1994; **35**: 1404–1408.
- 36 Menzies IS, Zuckerman MJ, Nukajam WS, Somasundaram SG, Murphy B, Jenkins AP et al. Geography of intestinal permeability and absorption. *Gut* 1999; **44**: 483–489.
- 37 Wilmore DW, Shabert JK. Role of glutamine in immunologic responses. *Nutrition* 1998; **14**: 618–626.
- 38 Crawford J, Cohen HJ. The essential role of glutamine in lymphocyte differentiation *in vitro*. *J Cell Physiol* 1985; **124**: 275–282.
- 39 Juretic A, Spagnoli GC, Horig H, Babst R, von Bremen K, Harder F et al. Glutamine requirements in the generation of lymphokine-activated killer cells. *Clin Nutr* 1994; **13**: 42–49.
- 40 Spittler A, Winkler S, Gotzinger P, Oehler R, Willheim M, Tempfer C et al. Influence of glutamine on the phenotype and function of human monocytes. *Blood* 1995; **86**: 1564–1569.
- 41 Parry-Billings M, Evans J, Calder PC, Newsholme EA. Does glutamine contribute to immunosuppression after major burns? *Lancet* 1990; **336**: 523–525.
- 42 Wallace C, Keast D. Glutamine and macrophage function. *Metabolism* 1992; **41**: 1016–1020.
- 43 Yassad A, Lavoigne A, Bion A, Daveau M, Husson A. Glutamine accelerates IL-6 production by rat peritoneal macrophages in culture. *FEBS Lett* 1997; **413**: 81–84.
- 44 Murphy C, Newsholme P. Macrophage-mediated lysis of a B-cell line, TNF- α release from BCG-activated murine macrophages and IL-8 release from human monocytes are dependent on extracellular glutamine concentration and glutamine metabolism. *Clin Sci* 1999; **96**: 89–97.
- 45 Furukawa S, Saito H, Inoue T, Matsuda T, Fukatsu K, Han I et al. Supplemental glutamine augments phagocytosis and reactive oxygen intermediate production by neutrophils and monocytes from postoperative patients *in vitro*. *Nutrition* 2000; **16**: 323–329.
- 46 Pithon-Curi TC, Schumacher RI, Freitas JJ, Lagranha C, Newsholme P, Palanch AC et al. Glutamine delays spontaneous apoptosis in neutrophils. *Am J Physiol Cell Physiol* 2003; **284**: C1355–C1361.
- 47 Yoo SS, Field CJ, McBurney MI. Glutamine supplementation maintains intramuscular glutamine concentrations and normalizes lymphocyte function in infected early weaned pigs. *J Nutr* 1997; **127**: 2253–2259.
- 48 O'Riordain MG, Fearon KC, Ross JA, Rogers P, Falconer JS, Bartolo DC et al. Glutamine supplemental parenteral nutrition enhances T-lymphocyte response in surgical patients undergoing colorectal resection. *Ann Surg* 1994; **220**: 212–221.
- 49 Lin MT, Kung SP, Yeh SL, Lin C, Lin TH, Chen KH et al. The effect of glutamine-supplemented total parenteral nutrition on nitrogen economy depends on severity of diseases in surgical patients. *Clin Nutr* 2002; **21**: 213–218.
- 50 Ziegler TR, Bye RL, Persinger RL, Young LS, Antin JH, Wilmore DW. Effects of glutamine supplementation on circulating lymphocytes after bone marrow transplantation: a pilot study. *Am J Med Sci* 1998; **315**: 4–10.
- 51 Kudsk KA, Wu Y, Fukatsu K, Zarzaur BL, Johnson CD, Wang R et al. Glutamine-enriched total parenteral nutrition maintains intestinal interleukin-4 and mucosal immunoglobulin A levels. *JPEN Parenter Enteral Nutr*. 2000; **24**: 270–274.
- 52 Fukatsu K, Kudsk KA, Zarzaur BL, Wu Y, Hanna MK, DeWitt RC. TPN decreases IL-4 and IL-10 mRNA expression in lipopolysaccharide stimulated intestinal lamina propria cells but glutamine supplementation preserves the expression. *Shock* 2001; **15**: 318–322.
- 53 Coeffier M, Miralles-Barrachina O, Le Pessot F, Lalaude O, Daveau M, Lavoigne A et al. Influence of glutamine on cytokine production by human gut *in vitro*. *Cytokine* 2001; **13**: 148–154.
- 54 De Beaux AC, O'Riordain MG, Ross JA, Jodozi L, Carter DC, Fearon KC. Glutamine-supplemented total parenteral nutrition reduces blood mononuclear cell interleukin-8 release in severe acute pancreatitis. *Nutrition* 1998; **14**: 261–265.
- 55 Ockenga J, Borchert K, Rifai K, Manns MP, Bischoff SC. Effect of glutamine-enriched total parenteral nutrition in patients with acute pancreatitis. *Clin Nutr* 2002; **21**: 409–416.
- 56 Sheean PM, Freels SA, Helton WS, Braunschweig CA. Adverse clinical consequences of hyperglycemia from total parenteral nutrition exposure during hematopoietic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 2006; **12**: 656–664.