UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA
TESE DE DOUTORADO EM FARMACOLOGIA

SUPLEMENTAÇÃO DE ALANIL-GLUTAMINA EM CRIANÇAS DE UMA COMUNIDADE CARENTE DE FORTALEZA-CE: IMPACTO SOBRE A BARREIRA INTESTINAL E ESTADO NUTRICIONAL INFANTIL

NOÉLIA LEAL LIMA

FORTALEZA-CEARÁ

2006

Livros Grátis

http://www.livrosgratis.com.br

Milhares de livros grátis para download.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA
TESE DE DOUTORADO EM FARMACOLOGIA

SUPLEMENTAÇÃO DE ALANIL-GLUTAMINA EM CRIANÇAS DE UMA COMUNIDADE CARENTE DE FORTALEZA-CE: IMPACTO SOBRE A BARREIRA INTESTINAL E ESTADO NUTRICIONAL INFANTIL

NOÉLIA LEAL LIMA

Tese apresentada para obtenção do Título de Doutor em Farmacologia do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará.

Orientadora: Profa. Dra. Helena Serra Azul Monteiro
Co-orientador: Prof. Dr. Aldo Ângelo Moreira Lima

FORTALEZA-CEARÁ

2006

L699s Lima, Noélia Leal

Suplementação de alanil-glutamina em crianças de uma comunidade carente de Fortaleza – CE: impacto sobre a barreira intestinal e estado nutricional infantil / Noélia Leal Lima. – Fortaleza, 2006.
161f. il.

Orientador: Profa. Dra. Helena Serra Azul Monteiro
Tese (Doutorado). Universidade Federal do Ceará. Faculdade de Medicina, 2006.

1 Permeabilidade 2 Desnutrição 3 Glutamina 4 Nanismo Nutricional 5 Síndrome de Emaciação I Monteiro, Helena Serra Azul (orient.) II Título

CDD 616.396

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA
TESE DE DOUTORADO EM FARMACOLOGIA

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Farmacologia, outorgado pelo Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará, e encontra-se à disposição dos interessados na Biblioteca da Faculdade de Medicina da referida instituição.

_____

Noélia Leal Lima

Banca Examinadora:

_____

Profa. Dra. Helena Serra Azul Monteiro (orientador)
Universidade Federal do Ceará

_____

Prof. Dr. Álvaro Jorge Madeiro Leite
Universidade Federal do Ceará

_____

Profa. Sandra Maria Nunes Monteiro
Universidade Federal do Rio Grande do Norte

_____

Profa. Dra. Maria Elisabete Amaral de Moraes
Universidade Federal do Ceará

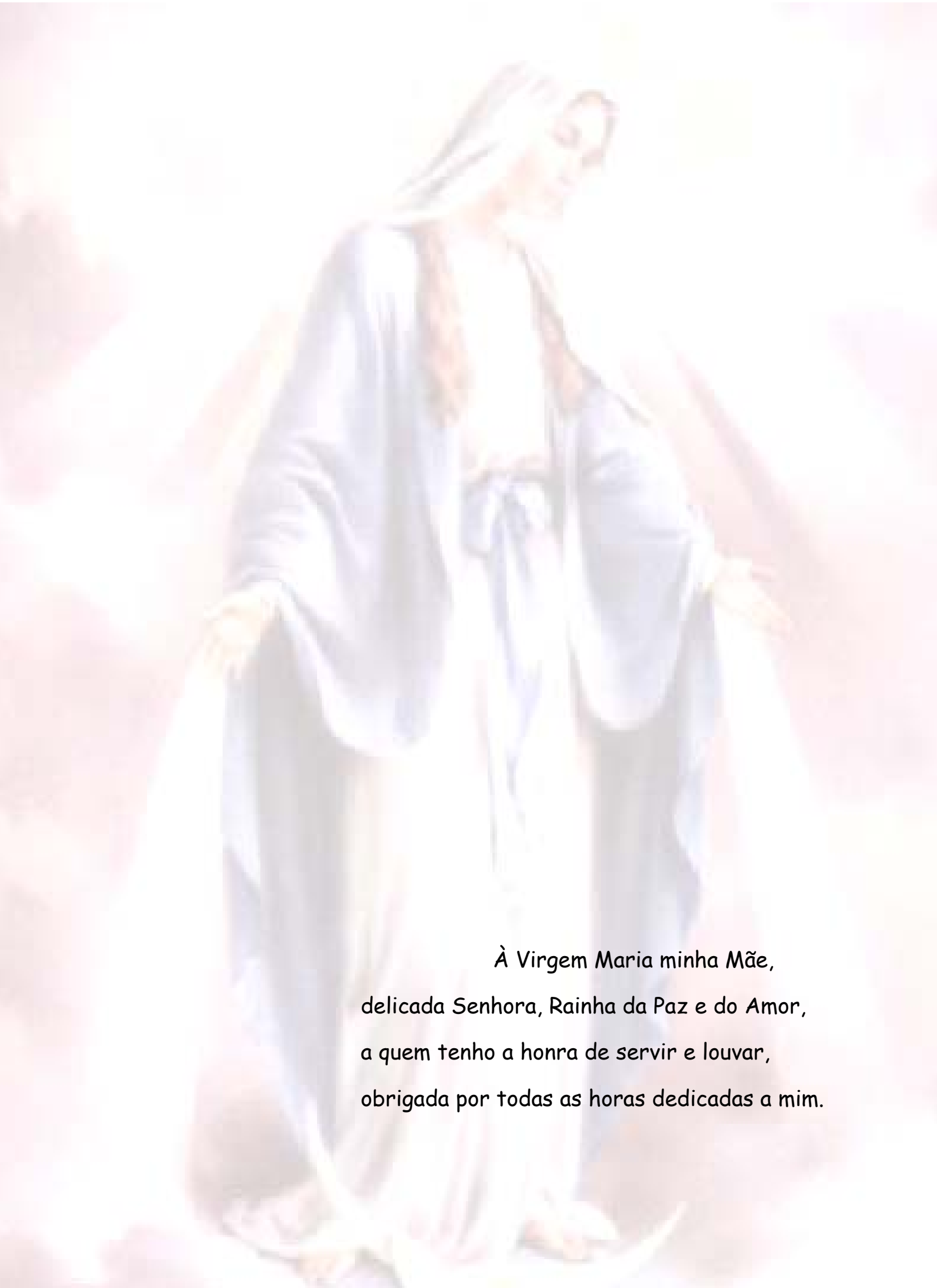
_____

Profa. Dra. Helena Alves de Carvalho Sampaio
Universidade Estadual do Ceará

Data : 18/12/06

A Deus, meu Pai e Criador,

por Sua Presença em todos os momentos de minha vida. Sem Êle, eu não existiria.



À Virgem Maria minha Mãe,

delicada Senhora, Rainha da Paz e do Amor,

a quem tenho a honra de servir e louvar,

obrigada por todas as horas dedicadas a mim.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, José e Enóe Leal, pela dedicação e carinho dedicados em todos os momentos de minha vida.

Ao meu marido, Aldo Lima, pela paz transmitida ao longo dos anos de uma convivência acolhedora e pelo estímulo contínuo na caminhada científica.

Aos meus filhos, Bruna Lima, Breno Lima e Adam Lima, que continuamente me ensinam a analisar as diferentes situações da vida com o entusiasmo do mais jovem.

À minha orientadora, Helena Serra Azul, pela amizade, confiança e estímulo oferecidos nessa árdua caminhada.

Às agentes de saúde, Luzia Melo, Fátima Alves e Rosânia Silva, e enfermeira, Sayonara Alencar, pelo carinho e dedicação às mães e crianças da comunidade do Parque Universitário do Pici.

Ao amigo, Manoel Barboza Júnior, pelo carinho e atenção na realização e análise dos testes de permeabilidade intestinal nas crianças envolvidas no estudo.

À minha amiga, Ivolete Linhares, pela força e fé transmitidas no olhar, no sorriso e na palavra amiga no momento certo.

Ao meu amigo, Padre Ivan Dias, pelo carinho e sabedoria manifestos em gestos e palavras simples, ensinando-me o valor da amizade cristã.

Ao amigo de todas as horas, José Amadeu.

À minha amiga e cunhada, Socorro Leal, pelo carinho e atenção na revisão final do texto.

Aos colegas dos Departamentos de Pediatria, Fisiologia e Farmacologia que, direta ou indiretamente contribuíram, nessa etapa peculiar de crescimento acadêmico.

À bibliotecária da Faculdade de Medicina, Norma Linhares, pela gentileza e prontidão profissional nas orientações fornecidas.

À secretaria do Programa de Pós Graduação em Farmacologia da Universidade Federal do Ceará, Aura Rhanes, pela paciência e gentileza que precedem o seu atendimento pessoal.

Ao funcionário do Instituto de Biomedicina (IBIMED), Charles Melo, pela gentileza da digitação dos dados coletados.

Aos professores, pesquisadores e funcionários da Unidade de Pesquisas Clínicas & Instituto de Biomedicina, Universidade Federal do Ceará, pela valiosa contribuição administrativa, estrutural e pessoal na realização desse trabalho.

Às mães e crianças envolvidas no estudo.

SUMÁRIO

Página

LISTA DE FIGURAS .....
LISTA DE TABELAS .....
RESUMO .....
ABSTRACT .....

1. INTRODUÇÃO
1.1 Desnutrição Infantil: Um Problema Global de Saúde Pública 2
1.1.1 Magnitude do Problema 3
1.1.2 Conseqüências da Desnutrição Infantil 5
1.1.3 Antropometria e Indicadores Antropométricos 6
1.1.4 Classificações do Estado Nutricional Infantil 8
a) Classificação de Gómez 8
b) Classificação de Waterlow 9
c) Classificação da desnutrição recomendada pela Organização Mundial de Saúde 10
1.2 Epitélio Intestinal e suas Características Funcionais 11 .....
1.2.1 Crescimento do Epitélio Intestinal 12
1.2.2 Alterações Intestinais na Desnutrição 13
1.2.3 Integridade e Permeabilidade do Epitélio Intestinal 15
1.2.4 Teste de Permeabilidade Intestinal..... 17
1.3 A Glutamina 19
1.3.1 Considerações Preliminares 20
1.3.2 Estrutura Molecular, Síntese e Metabolismo 22
1.3.3 Efeitos Tróficos na Mucosa Intestinal 25
1.3.4 Utilização em Humanos 28
1.3.5 Derivados Peptídicos e sua Utilização em Humanos 30
1.3.6 Efeitos Adversos e Toxicidade da Glutamina e seus Derivados 31

2. JUSTIFICATIVA 34

2. 1. Justificativa..... 35
3.2 OBJETIVOS 39
3.2.1 Objetivo geral 40
3.2.2 Objetivos específicos 40

4. MATERIAIS E MÉTODOS 41
4.1 Desenho e Duração do Estudo 42
4.2 Descrição da População..... 42
4.2.1 População do Parque Universitário do Pici 42
4.2.2 População do Estudo 45
4.2.3 Critérios de Inclusão/ Exclusão/ Abandono/ Desistência 45
4.2.4 Procedimentos de Envolvimento-Aleatoriedade..... 46
4.3 Avaliações Clínicas 46
4.3.1 Avaliação na Entrada 46
4.3.2 Avaliação Durante Estudo - Fases do Protocolo..... 47
4.3.3 Medidas Antropométricas e Avaliação Antropométrica 50
4.4 Coleta e Monitoramento de Dados 49
4.4.1 Vigilância Epidemiológica e Coleta de Dados..... 49
4.4.2 Monitoramento e Duração da Coleta de Dados 51
4.4.3 Monitoramento dos Eventos Adversos 52
4.5 Avaliações Laboratoriais 52
4.5.1 Cromatografia Líquida de Alta Performance Para Determinação de Monossacarídeos e Dissacarídeos 52
4.5.2 Teste de Permeabilidade Intestinal 53
4.5.3 Cromatografia Líquida de Alta Performance Para Determinação de Glutamina 55
4.5.4 Parasitológico de Fezes 55
4.6 Considerações Éticas 56
4.6.1 Formulário de Informação e Termo de Consentimento 56
4.6.2 Registro e Notificação dos Eventos Adversos 56
4.6.3 Confidenciabilidade dos Dados 57
4.7 Considerações Estatísticas..... 57

4.7.1 Cálculo do Tamanho da Amostra 57
4.7.2 Análise Estatística 59

5. RESULTADOS 61

6. DISCUSSÃO 73

7. CONCLUSÕES 84

8. REFERÊNCIAS 86

9. ANEXOS 102
Anexo 1 - Formulário de Coleta de Dados .....
Anexo 2 - Formulário de Registro de Evento Adverso .....
Anexo 3 - Formulário de Registro de Sério Evento Adverso.....
Anexo 4 - Formulário de Notificação de Sério Evento Adverso ao COMEPE .....
Anexo 5 - Carta de Aprovação no COMEPE .....
Anexo 6 - Formulário de Termo de Consentimento.....

10. PUBLICAÇÕES 111
10.1 Artigos Publicados..... 112
10.1.1 **Lima, N.L.;** Soares, A.M.; Mota, R.M.S.; Monteiro, H.S.A; Guerrant, R.L.; Lima, A.A.M. Alanyl-glutamine supplement in undernourished children from an urban community in the northeast of Brazil:improved intestinal absorptive barrier function and wasting. J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr. 2007 (In Press)…....
10.1.2 Lima, A.A.; Brito, L.F.; Ribeiro, H.B.; Martins, M.C.; Lustosa, A.P.; Rocha, E.M.; **Lima NL**, Monte, C.M.; Guerrant, R.L. Intestinal barrier function and weight gain in malnourished children taking glutamine supplemented enteral formula. J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr., v. 40, p. 28-35, 2005 .....
10.1.3 Sondheimer JM .Glutamine for childhood malnutrition: probably

not needed. J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr., v. 40,n.1, p.24-5, 2005. Editorial ……..

10.1.4 Lima, A.A.M.; Guerrant, R.L. Glutamine for childhood malnutrition: is it needed? J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr., v., 40, n.4, p. 526-7, 2005.Comment .....

10.2 Resumos..... 142

10.2.1 Lima, A.A.M.; Soares, A.M.; **Lima, N.L.**; Pinkerton, R.; Oriá, R.B.; Pinkerton, R.; Guerrant, R.L. Effects of glutamine alone and in combination with zinc and retinol on intestinal barrier function, diarrheal diseases morbidity and growth in undernourished children in northeast of Brazil. Am. J. Trop. Med. Hyg., v.75,n.5, p.225-26,2006.....

10.2.2 **Lima, N.L.;** Mota, R.M.S.; Lima, B.L.; Monteiro, H.S.A.; Guerrant, R.L.; Lima, A.A.M. Alanyl-glutamine improves intestinal barrier function and weight gain in malnourished children with a high risk for diarrheal disease. Cholera & Other Bacterial Enteric infections.Symposium on Vaccine Development - 40th Annual Panel Meeting p.196, 2005 ……..

10.2.3 Lima, A.A.M.; Soares, A.M.; Vieira, M.M.; **Lima**, **N.L.;** Oriá, R.B.; Gamble, M.V.; Blaner, W.S.; Guerrant ,R.L. Acute phase evaluation of vitamin A, zinc and glutamine supplementation on intestinal epithelial integrity, linear growth and diarrhea diseases in children from northeast of Brazil. International Centers for Tropical Diseases Research Network. 14th Annual Meeting p.55, 2005……..

10.2.4 Lima, A.A.M.; Brito, L.F.B.; Leite, R.D.; **Lima, N.L.;** Kushiba, A.; Bushen, O.Y.; Dillingham, R.D.; Guerrant, R.L. Glutamine and alanyl-glutamine enhance absorptive function in malnourished children and HIV^+ patients. International Centers for Tropical Diseases Research Network. 13th Annual Meeting 2004 ……..

10.2.5 Lima, A.A.M.; Soares, A.M.; Brito, G.A.C.; Silva, E.A.T.; **Lima, N.L.;** Monte C.M.G.; Brito, L.F.R.; Martins, M.C.V.; Guerrant, R.L.

Small bowel repair of intestinal barrier functions and weight gain in persistent diarrhea and child nutrition: role of glutamine and alanyl-glutamine.International Centers for Tropical Diseases Research Network. 7th Annual Meeting Fortaleza, Ce p.18-19, 2003 .....

10.2.6 Leite, R.D.; Luis, R.S.S.; Leite, C.A.C.; **Lima NL**, Viana, J.R.; Barbosa Jr, M.V.; Guerra, E.J.; Guerrant, R.L.; Lima, A.A.M. Função intestinal, permeabilidade, histopatologia jejunal e efeito da alanil- glutamina em pacientes infectados pelo vírus HIV em Fortaleza. B .J. Infect. Dis. n.71, 2003 .....

10.2.7 Lima, A.A.M.; Soares, A.M.; Moore, S.R.; **Lima, N.L.;** Williams-Blangero, Guerrant, R.L. Environmental effects, familial predisposition and pathophysiology of diarrhea and malnutrition. International Centers for Tropical diseases Research Network. 11th Annual Meeting, 2002.....

11. PROJETOS / BOLSAS DE PESQUISA……..……..... 160

11.1 **Título do projeto:** Long-term impact and intervention for diarrhea In Brazil. **Fonte financiadora:** ICIDR Program, National Institute of Health, Bethesda, MA – 2U01 AI-98-009. **Período:** 1999-2005. **Função:** Pesquisadora .....

11.2 **Título do projeto:** Long-term impact and intervention for diarrhea in Brazil. **Fonte financiadora:** ICIDR Program, National Institute of Health, Bethesda, MA – 2U01 AI0265512-17. **Período:** 2006- 2011 **Função:** Pesquisadora .....

11.3 **Título do projeto:** Use of glutamine and its stable derivatives in intestinal function and mucosal barrier repair. **Fonte financiadora:** Howard Hughes Medical Institute, Bethesda, MA– Grant Number 55000645. **Período:** 2000 – 2005. **Função:** Pesquisadora. .....

11.4 **Título do projeto:** Função intestinal, permeabilidade, histopatologia jejunal e efeito de alanil-glutamina em pacientes

infectados com o vírus de imunodeficiência humana em Fortaleza. **Fonte financiadora** Ministério da Saúde, Secretaria de Políticas de Saúde, Coordenação Nacional de DST e AIDS. **Período:** 2002– 2003. **Função:** Pesquisadora.....

11.5 **Título do projeto:** Educação em Ações Básicas de Saúde Infantil em uma Creche Municipal de Fortaleza. **Fonte financiadora:** Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico. **Período:** 2002-2003. **Função:** Pesquisadora.....

11.6 Bolsa de Doutorado**. Fonte Financiadora :** Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico-FUNCAP **Período:** 2003-2004.....

RESUMO

Título: Suplementação de Alanil-glutamina em Crianças de uma Comunidade Carente de Fortaleza-CE: Impacto Sobre a Barreira Intestinal e o Estado Nutricional Infantil. NOÉLIA LEAL LIMA. Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará. Dezembro de 2006. Orientadora: Profa. Dra. Helena Serra Azul Monteiro

Introdução: Apesar do reconhecimento das alterações intestinais associadas à desnutrição e dos efeitos tróficos da alanil-glutamina (**AG**) na função de barreira intestinal, medida pela taxa de excreção urinária de Lactulose: Manitol, ainda são escassos os estudos para determinar o efeito de suplementação oral da **AG** em crianças desnutridas. **Objetivos**: Examinar o efeito de suplementação oral de **AG** ou placebo glicina (**G**) na função de barreira intestinal e crescimento em crianças sob risco nutricional residentes na comunidade do Parque Universitário do Pici. **Métodos:** Ensaio clínico randomizado controlado em crianças maiores de 6 meses e menores de 8 anos de idade, com pelo menos um dos escores *z* para os indicadores antropométricos (**IAs**) (peso-para-idade, estatura-para-idade e peso-para-estatura) < -1. Cento e sete crianças foram randomizadas, entre julho de 2003 a novembro de 2004, para receberem **AG** (24g/dia) ou **G** (25g/dia) em quantidades isonitrogênicas por 10 dias. A excreção urinária de Lactulose:Manitol foi utilizada como medida da permeabilidade intestinal e realizada nos 1° e 10° dias do protocolo de estudo. O peso e estatura das crianças foram coletados nos 1°, 10°, 30° e 120° dias do protocolo de estudo para cálculo dos **IAs**. **Resultados**: O percentual da excreção urinária de lactulose diminuiu significantemente no grupo que recebeu **AG**, mas não no grupo que recebeu **G** ($p < 0,05$ teste *t* de Student). A melhora cumulativa nos indicadores antropométricos, peso-para-estatura e peso-para-idade, no 120° dia do protocolo de estudo foi significante quando realizado a análise de covariância no grupo que recebeu **AG** versus o grupo que recebeu glicina (respectivamente, p <0,04 e <0,029). Durante o período de estudo foram observados um total de vinte (19%) Eventos Adversos (**EAs**) na seguinte ordem de freqüência: vômitos (8,4%), diarréia (2,8%), náuseas (1,9%), infecção respiratória (1,9%), escabiose (1,9%), asma (0,9%), epistaxe (0,9%). Os **EAs** não foram diferentes na análise estatística entre os grupos estudados e somente três dos **EAs** foram considerados como Sérios Eventos Adversos (**SEAs**), dois no grupo da alanil-glutamina (1 asma e 1 diarréia) e um no grupo da glicina (1 diarréia). **Conclusões**: A suplementação oral de **AG** por 10 dias melhorou a permeabilidade intestinal e o estado nutricional em crianças sob risco nutricional residentes em uma comunidade de Fortaleza.

Palavras-chave: Permeabilidade intestinal, Desnutrição, Alanil-Glutamina, emagrecimento e nanismo.

ABSTRACT

Title: Oral Supplementation of Alanyl-glutamine in Children on a Poor Community at Fortaleza-Ce : Impact on Intestinal Barrier Function and Nutritional Status NOÉLIA LEAL LIMA. Thesis presented to the Post-Graduate Program in Pharmacology in the Department of Physiology and Pharmacology, School of Medicine, Federal University of Ceará. January 2007. Adviser: Prof[a]. Dr[a]. Helena Serra Azul Monteiro.

Introduction: In spite of the recognition of alterations in intestinal barrier function associated with malnutrition and the trophic effects of alanyl-glutamine (**AG**) on intestinal barrier function, measured by the rate of urinary excretion of Lactulose:Manitol, there are still few studies determining the effect of oral supplementation of **AG** in malnourished children. **Objectives:** Examine the effect of oral **AG** supplementation or the placebo Glycine (**G**) on intestinal barrier function and growth in children who are at risk for malnutrition and are residents of the University Park of Pici community. **Methods:** Double blind randomized study in children between 6 months and 8 years of age, with at least one of the z scores for the anthropometrical indicators (**AIs**) (weight-for-age, height-for-age, and weight-for-height) less than minus one. One hundred and seven children were randomized between July 2003 and November 2004, to receive **AG** (24 g/day) or **G** (25 g/day) in iso-nitrogenic quantities for 10 days. The urinary excretion of Lactulose:Mannitol was used as a measure of intestinal permeability, and was performed on the first and tenth days of the study protocol. The weight and height of the children were collected on the 1, 10, 30, and 120 days of the study protocol to calculate the **AIs**. **Results:** The percentage of urinary excretion of Lactulose decreased significantly in the group that received **AG** ($p < 0.05$ Student T test), but not in the group that received **G**. The cumulative improvement in the Anthropometrical Indicators, weight-for-height and weight-for-age on the 120 day of the study protocol were significant when covariant analysis was performed in the group which received **AG** versus the control group **G** ($p < 0.04$ and < 0.029, respectively). During the study period a total of 20 (19%) Adverse Events (**AEs**) were observed in the following order of frequency: vomiting (8.4%), diarrhea (2.8%), nausea (1.9%), respiratory infection (1.9%), scabies (1.9%), asthma (0.9%), epistaxis (0.9%). The **AEs** were not statistical different between the study groups, and only three of the **AEs** were considered Serious Adverse Events (**SEAs**), two in the **AG** group (1 asthma and 1 diarrhea) and one in the **G** group (1 diarrhea). **Conclusions:** The oral supplementation of **AG** for 10 days improved intestinal permeability and nutritional status in children at risk for malnutrition in a Fortaleza community.

Key words: Intestinal Barrier Function, Malnutrition, Alanyl-Glutamine, Wasting and Stunting.

LISTA DE FIGURAS

		Página
Figura 1	Estrutura molecular da glutamina e glutamato	23
Figura 2	Síntese e degradação da glutamina	24
Figura 3	Metabolismo da glutamina no enterócito	26
Figura 4	Fotografia satélite do Parque Universitário do Pici.....	43
Figura 5	Localização geográfica do Parque Universitário do Pici e distribuição das crianças incluídas no estudo	44
Figura 6	Diagrama fluxonal do protocolo de estudo	49
Figura 7	Teste de permeabilidade intestinal	54
Figura 8	Diagrama do número de crianças selecionadas e incluídas no ensaio clínico segundo os dias de estudo	62
Figura 9	Dispersão do percentual de excreção de lactulose urinária antes e após suplementação com glicina e alanil-glutamina.....	66
Figura 10	Efeito cumulativo (1-120 dias) da alanil-glutamina nos indicadores antropométricos peso-para-estatura e peso-para-idade (escore *z*) estudado.	70

LISTA DE TABELAS

		Página
Tabela 1	Classificação do estado nutricional infantil segundo Gómez	8
Tabela 2	Classificação do estado nutricional infantil segundo Waterlow....	10
Tabela 3	Classificação da desnutrição infantil recomendada pela Organização Mundial da Saúde.....	10
Tabela 4	Grupos aleatórios para a suplementação de alanil-glutamina em crianças da Comunidade do Parque Universitário do Pici	59
Tabela 5	Características das crianças por grupo de estudo segundo a idade, sexo, medidas antropométricas, taxa de Lacutulose Manitol, níveis plasmáticos de glutamina. Julho de 2003 a novembro de 2004.	64
Tabela 6	Medida da permeabilidade intestinal por grupo estudado antes e 10 dias após a intervenção clínica. Julho de 2003 a novembro de 2004.	65
Tabela 7	Indicadores antropométricos das 107 crianças por grupo de estudo para cada fase de estudo. Julho de 2003 a novembro de 2004. ...	68
Tabela 8	Valores cumulativos no escore z ajustados por idade e sazonalidade durante os 120 dias de acompanhamento das crianças incluídas no estudo. Julho de 2003 a novembro, 2004.	69
Tabela 9	Eventos Adversos (EAs) e Sérios Eventos Adversos (SEAs) observados nas 107 crianças por grupo estudado. Julho de 2003 a novembro de 2004	71
Tabela 10	Parasitas encontrados nas amostras de fezes de 92 crianças incluídas no estudo. Julho de 2003 a novembro de 2004.	72

INTRODUÇÃO

DESNUTRIÇÃO INFANTIL
UM PROBLEMA GLOBAL
DE SAÚDE PÚBLICA

"Há poucas coisas que têm mais impacto na capacidade da criança de sobreviver, aprender e escapar de uma vida de pobreza do que a nutrição."

Ann Veneman, 2006

1. INTRODUÇÃO

1.1 A Desnutrição Como Problema de Saúde Pública

1.1.1 Magnitude do Problema

A desnutrição infantil com seus dois constituintes, deficiência energético-proteíca e deficiência de micronutrientes, continua sendo um importante problema de saúde em países em desenvolvimento, particularmente no sul da Ásia e na região da África ao sul do Saara, onde a prevalência em menores de 5 anos de idade é de 32,8% e 27,9%, respectivamente (WHO, 2002; UNICEF, 2006a, 2006b). A causa mais importante da desnutrição infantil é uma alimentação deficiente em macronutrientes (proteínas, carboidratos e gordura) e micronutirentes (eletrólitos, minerais e vitaminas) que gera uma deficiência energético-proteíca ou de micronutrientes, ou de ambos nessas populações (ALLEN, 1993, 2003; LUTTER e RIVERA, 2003; MÜLLER e KRAWINKEL, 2005).

A desnutrição em crianças é definida como um decréscimo no peso para a idade (baixo peso), ou na estatura-para-idade (deficiência estatural ou "*stunting"*), ou no peso-para-altura (emagrecimento ou *"wasting")* (WHO, 1995). A prevalência mundial de desnutrição é, portanto, estimada pela proporção de crianças menores de 5 anos de idade com baixo peso, emagrecidas ou com *deficit* estatural. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), uma em cada quatro crianças menores de 5 anos de idade é desnutrida, ou seja, globalmente, 150 milhões de crianças (27%) estão com baixo peso, e 180 milhões (33%) tem *deficit* estatural (WHO, 2002). Relatório recente do Fundo das Nações Unidas para a Infância (UNICEF) aponta a desnutrição como epidemia global responsável por cerca de 5,6 milhões mortes por ano, ou seja, por mais da metade de todas as mortes na infância (UNICEF, 2006a).

Vários fatores, além de dietas deficientes em macro ou micronutrientes, estão associados à desnutrição infantil, entre os mais apontados figuram ambiente adverso como pobreza, inadequado saneamento, água não potável (ISSLER e GIUGLIANI, 1997; MONTEIRO, 2003; BLACK, MORRIS e BRYCE, 2003), prevalência elevada de doenças bacterianas e parasitárias (SHRIMPTON et al.,

2001; MOORE et al, 2001; BLACK, MORRIS e BRYCE, 2003; CAULFIELD et al, 2004; BRYCE et al., 2005).

Em estudo epidemiológico realizado por Pelletier et al. (1995), ao revisarem as causas de óbitos em menores de 5 anos em 53 países subdesenvolvidos, documentaram que mais da metade (56%) dos 10 milhões de óbitos anualmente, em crianças menores de 5 anos de idade, ocorreram em desnutridos e que, em 83% desses óbitos, a desnutrição era leve ou moderada, comprovando o risco maior de mortalidade infantil em crianças desnutridas, independente do grau de gravidade da mesma (PELLETIER et al., 1995).

Quase uma década após esses estudos, Caulfield et al. (2004), com o objetivo de determinar o peso de desnutrição nos óbitos ocorridos em crianças menores de 5 anos e a proporção por causa de óbitos associados à desnutrição infantil, analisaram os dados compilados da OMS sobre crescimento e desnutrição infantil (De ONIS e BLÖSSNER, 2003) e chegaram a conclusões bastante similares as de Pelletier (1995). Nessa análise, 52% das mortes foram atribuídas à desnutrição infantil e as crianças leve ou moderadamente desnutridas apresentavam risco de mortalidade duas vezes maior que crianças eutróficas. As principais causas de óbito associadas à desnutrição foram diarréia (61%), pneumonia (52%), sarampo (45%), malária (58%) (CAULFIELD et al., 2004). Para esses e outros autores (De ONIS, FRONGILLO e BLÖSSNER, 2000), o lento declínio observado na taxa de mortalidade infantil (1% por ano) é inaceitável, e para o UNICEF “o mundo está falhando em relação às crianças” (UNICEF 2006a).

O fato é que, para cada criança visivelmente desnutrida, há outras tantas que lutam contra uma crise nutricional oculta, com carências múltiplas de vitaminas e de minerais essenciais, como Vitamina A, Zinco e Ferro, expondo-as a um maior risco para doenças, principalmente infecciosas, gerando *deficits* no crescimento, desenvolvimento, alterações comportamentais e cognitivas (GRANTHAM-MCGREGOR, WALKER e CHANG, 2000; WALKER, GRANTHAM-MCGREGOR e POWELL, 2000; MÜLLER e KRAWINKEL, 2005; UNICEF, 2006).

1.1.2 Conseqüências da Desnutrição Infantil

Há quase quatro décadas, Scrismshaw et al. (1968) descreveram o sinergismo existente entre desnutrição e infecção, resultando no excesso de mortalidade infantil (SCRIMSHAW,TAYLOR e GORDON ,1968). O modelo do "ciclo vicioso" descrito por TOMKINS e WATSON confirma o sinergismo fisiológico existente entre infecção e desnutrição (TOMKINS e WATSON, 1989), e vários autores concordam que ambas ocorrem freqüentemente juntas, uma exarcebando a presença da outra com efeitos cumulativos (STEPHENSEN, 1999; VICTORA et al., 1999; MOORE et al., 2001; CAULFIELD, 2004). Atualmente a desnutrição é reconhecida como fator agravante da infecção, principalmente, quando se trata de episódios agudos de diarréia, em que a presença de desnutrição aumenta o risco de diarréia persistente ou crônica, deteriorando ainda mais o estado nutricional da criança (SCHORLING et al., 1990; LIMA et al., 1992, 2000; GUERRANT et al., 1992; MOORE et al. 2001).

Infelizmente, os efeitos da desnutrição não ficam limitados à elevação na morbidade e mortalidade infantil. A maior parte das crianças desnutridas sobrevive à desnutrição e cresce com *deficit* estatural sem sinais clínicos evidentes (WATERLOW et al, 1994). Em países em desenvolvimento, a desnutrição tem um papel importante no desenvolvimento do *deficit* estatural, e vários autores sugerem como fatores causais deficiências energética, protéica e de micronutrientes isoladamente ou em conjunto. A deficiência de micronutrientes, como Zinco, Ferro, Vitamina B_{12}, Riboflavina, Retinol e Vitamina E tem sido associada a fatores preditivos da alteração funcional em crianças, tanto no crescimento como na função cognitiva (ALLEN, 1994; 2003; LUTTER e RIVERA, 2003).

A deficiência de nutrientes no início da vida é acompanhada não só por déficit estatural, mas também no desenvolvimento motor, cognitivo e por alterações comportamentais que são detectadas nos primeiros anos de vida, podendo persistir na criança em idade escolar, no adolescente e no adulto (GRANTHAM-MCGREGOR, WALKER, CHANG, 2000; WALKER et al., 2000). O mecanismo preciso pelo qual a deficiência estatural está associada ao *deficit* no desenvolvimento mental ainda é controverso, mas vários autores reconhecem que a

criança desnutrida tem desenvolvimento motor retardado com conseqüente atividade física diminuída, apatia e falta de interesse pelo ambiente, diminuição da capacidade exploratória, levando mais tempo no aprendizado por experiência que outras crianças (POLLIT, 1995; GARDNER et al.,1999). Essas alterações têm sido descritas em crianças com deficiências energética, de Zinco e de Ferro (SAZAWAL et al, 1996; BENTLEY et al., 1997), sendo possível que os mecanismos variem de acordo com a deficiência nutritiva em questão, e que os vários fatores ajam em conjunto (GRANTHAM-MCGREGOR, WALKER e CHANG, 2000).

Embora a magnitude dos efeitos da desnutrição em humanos não esteja bem esclarecida, existem evidências de que o efeito depende não só da intensidade e da duração da desnutrição, mas também do estágio do desenvolvimento em que a criança se encontra quando a desnutrição se instala. Para alguns autores, o déficit de crescimento mais do que o marasmo *stricto sensu* ou a presença de edema - consideradas como desnutrição grave - é o fator preditivo mais importante no desenvolvimento cognitivo e comportamental de uma criança e, posteriormente, do adolescente e do adulto (GRANTHAM-MCGREGOR, POWELL, FLETCHER et al, 1989).

Alguns autores documentaram que crianças desnutridas, ao chegarem na idade adulta, apresentavam alterações, como diminuição da capacidade de trabalho (HASS et al. 1995) e maior risco de complicações obstétricas devido ao pequeno tamanho da pélvis (MARTORELL, 2001).

1.1.3 Antropometria e Indicadores Antropométricos

A avaliação do estado nutricional da criança tem por objetivo verificar o crescimento e as proporções corporais em um indivíduo ou em uma comunidade, e visa estabelecer atividades interventivas. Desde a década de 60, a antropometria, que consiste na avaliação das dimensões e da composição global do corpo humano, tem sido sistematizada como método de avaliação do estado nutricional em nível populacional, pela facilidade de execução, baixo custo e inocuidade (SIGULEM, DEVINCENZI, LESSA, 2000). As medidas corporais mais utilizadas têm por objetivo determinar a massa corporal, expressa pelo peso; as dimensões lineares, expressas

pela altura ou comprimento (crianças menores de 2 anos de idade); a composição corporal e as reservas de energia e proteínas, estimadas pelo principais tecidos moles superficiais, gordura subcutânea e massa muscular. Diante das evidências de que o crescimento em altura e peso de crianças saudáveis de diferentes origens étnicas, submetidas a condições adequadas de vida, são similares até os 5 anos de idade, a OMS, adotou, desde 1978, os dados do National Center for Health and Statistics (NCHS) como padrão de referência internacional (National Center for Health Statistic, 1977). Em 1995, foi reconhecida a necessidade de novas curvas de crescimento que levassem em consideração outros aspectos, como aleitamento materno (as crianças das curvas de crescimento do NCHS eram alimentadas com fórmulas), inclusão de outros indicadores antropométricos, utilização de dados de outros países e não só dos EUA (WHO,1995).

Os parâmetros antropométricos freqüentemente utilizados para avaliar o estado nutricional de crianças são o peso e a estatura (comprimento ou altura). Pela aferição do peso e estatura, podem ser calculados os três indicadores antropométricos mais utilizados para a classificação do estado nutricional em crianças preconizados pela OMS, que são peso-para-idade (P/I), estatura–para-idade (E/I) e peso-para-estatura (P/E). Quando o indicador estatura-para-idade encontra-se baixo, indica que a criança tem o crescimento comprometido há longo tempo (do inglês, *stunting,* que significa nanismo). Um *deficit* no indicador peso-para-estatura indica um comprometimento recente que se reflete no peso (em inglês, *wasting,* que significa emagrecimento). Quando o indicador peso/idade baixo, é uma manifestação de ambos acima, e pode ser usado para diagnosticar a criança com baixo peso, o que é mais comum que o nanismo ou o emagrecimento.

Os valores dos dados antropométricos são analisados em função da idade e do sexo da criança e, para se estabelecer uma comparação de um conjunto de medidas antropométricas com um padrão de referência, várias escalas podem ser utilizadas, sendo a mais comum o **percentil** ou **escore *z***.

Os **percentis** são derivados da distribuição em ordem crescente dos valores de um parâmetro observado para uma determinada idade ou sexo; a classificação de uma criança em um determinado percentil permite estimar quantas

crianças, da mesma idade e sexo, são maiores ou menores em relação ao parâmetro avaliado.

O **escore *z*** significa em termos práticos, o número de desvio-padrão que o dado obtido está afastado de sua mediana de referência e varia de -6 a +6.

1.1.4 Classificações do estado nutricional da criança

Com os dados da antropometria, a classificação do estado nutricional da criança pode ser então realizada. Das várias classificações propostas, as mais conhecidas e mais utilizadas são as de Gómez, Waterlow e da OMS.

a) Classificação de Gómez. A classificação proposta por Gómez (GÓMEZ-SANTOS,1946) é a mais antiga e baseia-se no indicador de peso-para-idade (P/I), observado em relação ao peso do percentil 50 (P50) do padrão de referência do NCHS .

$$\textbf{P/I} = \frac{\text{Peso observado}}{\text{Peso esperado para idade e sexo (p50)}} \textbf{ x 100}$$

Nessa classificação, a criança é considerada como normal ou eutrófica, quando o P/I é superior a 91% do padrão adotado, e como *desnutrida leve ou de primeiro grau*, *moderada ou de segundo grau*, *grave ou de terceiro grau* quando o déficit de P/I encontrado for, respectivamente, de 76-90%; 61-75% e menor que 60% do P50 da curva padrão (**Tabela 1**).

Tabela 1. Classificação do estado nutricional infantil segundo Gómez.

% Adequação Peso-para-idade*	**Estado de Nutrição**
Superior a 90% *	Eutrofia
76-90%	Desnutrido Grau I
61-75%	Desnutrido Grau II
Menor que 60%	Desnutrido Grau III

FONTE: Gómez-Santos,1946

* Porcentagem relativa ao P50 da curva padrão.

Atualmente, essa classificação encontra-se em desuso por duas grandes desvantagens: 1ª) não leva em consideração a estatura da criança, não podendo, portanto, diferenciar a desnutrição aguda da desnutrição crônica; 2ª) as crianças entre os P3 e P10, embora possam ser consideradas eutróficas, são classificadas como portadoras de desnutrição leve ou de primeiro grau.

b) Classificação de Waterlow. Na década de 70, Waterlow propôs uma classificação funcional para desnutrição infantil que permitia identificar a desnutrição aguda e a crônica, sendo, portanto, extremamente útil para indicações de intervenções curativas (WATERLOW, 1972). Os indicadores utilizados nessa classificação são peso-para-estatura (P/E) e estatura-para-idade (E/I) e a criança é classificada de acordo com a porcentagem relativa à mediana do padrão de referência do NCHS (WHO,1995).

$$\textbf{E/I} = \frac{\text{Estatura observada}}{\text{Estatura esperada para idade e sexo (p50)}} \textbf{ x 100}$$

$$\textbf{P/E} = \frac{\text{Peso observado}}{\text{Peso esperado para a estatura observada}} \textbf{ x 100}$$

A criança é considerada *eutrófica* quando o indicador P/E está superior a 90% e o indicador E/I superior a 95% do p50 população de referência do NCHS. Se apenas o P/E estiver comprometido, ou seja, inferior a 90%, a criança está emagrecida (*wasting*) ou com *desnutrição atual ou aguda*. Quando o indicador E/I está inferior a 95% da mediana da população de referência do NCHS, a criança é considerada como desnutrida pregressa (*stunting*). No caso de ambos indicadores estarem abaixo do ponto de corte (E/I menor que 95% e P/E menor que 90%) da mediana da população de referência, a criança é classificada como *desnutrida crônica (wasting and stunting)* (**Tabela 2***).*

Tabela 2. Classificação do estado nutricional infantil segundo Waterlow.

Estatura-para-Idade	**Peso-para-Estatura**	
	> 90%	< 90%
> 95%	Eutrófica	Desnutrição aguda
< 95%	Desnutrição pregressa	Desnutrição crônica

FONTE: Waterlow, 1972.

c) Classificação da desnutrição infantil recomendada pela Organização Mundial de Saúde. Atualmente essa classificação é a mais utilizada universalmente e a Organização Mundial de Saúde recomenda a adoção do escore *z* para exprimir o peso-para-idade e a estatura-para-idade, relativos aos valores na população de referência do NCHS. Nessa classificação, o ponte de corte utilizado é o escore $z < -2$, ou seja, 2 DP abaixo da média da população de referência (Tabela 3). Assim a desnutrição aguda (*wasting* ou emagrecimento) inclui peso-para-estatura ou peso-para-idade abaixo do percentil 5 ou pelo menos -2 DP. Do mesmo modo, estatura-para-idade abaixo do percentil 5 ou pelo menos 2 DP abaixo da média é freqüentemente considerado como presença de desnutrição grave. Peso-para-estatura ou estatura-para-idade entre percentil 5 e percentil 10 ou entre -1 e -2 DP são considerados como indicadores de risco para desnutrição aguda ou crônica respectivamente e requerem uma avaliação mais profunda (WHO,1995).

Tabela 3. Classificação da desnutrição infantil recomendada pela Organização Mundial de Saúde.

	Desnutrição moderada	**Desnutrição grave** **Desnutrição edematosa**
Edema simétrico	Não	Sim
Peso-para-Estatura	- 3 ≤ escore *z* < - 2 (70 - 79%)	Escore *z* < - 3 (< 70%)
Estatura-para-Idade	- 3 ≤ escore *z* > -2 (85 - 89%)	Escore *z* < - 3 Nanismo grave

FONTE: OMS,1995.

O EPITÉLIO INTESTINAL
E SUAS
CARACTERÍSTICAS FUNCIONAIS

1.2 Epitélio Intestinal e suas Características Funcionais

1.2.1 Crescimento do Epitélio Intestinal

Além de desempenhar suas funções de digestão e absorção, o trato gastrintestinal desempenha função de defesa ao impedir a entrada de patógenos no organismo. Os componentes de defesa do trato gastrintestinal incluem uma mucosa intestinal íntegra, mucina, microflora intestinal, secreção de anticorpos específicos, como por exemplo, imunoglobulina A secretória (IgAs), macrófagos e outras células imunes presentes na lâmina própria do intestino como linfonodos mesentéricos.

A superfície do trato gastrintestinal é revestida por um epitélio colunar simples que se dobra, formando invaginações e criptas, aderida a uma lâmina própria de tecido conjuntivo frouxo. Essa camada constitui uma superfície limitante entre o organismo e o meio externo, agindo como uma barreira que impede a entrada de diversos antígenos alimentares e microrganismos. Cada cripta contem aproximadamente 250 células que, dependendo da espécie e da localização anatômica, tem tamanho e organização semelhantes de acordo com a região do trato gastrintestinal em que se encontram.

São quatro os principais tipos de células intestinais: 1) enterócitos, 2) células caliciformes, 3) células de Paneth, 4) enteroendócrinas. A célula predominante do epitélio intestinal é o enterócito que constitui 80% da mucosa intestinal (CHENG e LEBLOND, 1974) e se caracteriza por ser uma célula de proliferação rápida com ciclo celular aproximadamente de onze horas em ratos (AL-DEWACHI et al., 1974). As células epiteliais são responsáveis pela absorção do alimento e produção de enzimas digestivas, de muco e de hormônios.

Todas as células do epitélio, com exceção das células de Paneth, têm origem nas células pluripotentes, localizadas na lâmina própria, e movem-se para cima em direção à luz intestinal. No processo de diferenciação, as células funcionais se encontram principalmente nos vilos (do intestino delgado) ou no topo das criptas (intestino grosso).

Durante o processo de maturação, essas células tornam-se envelhecidas e são descamadas intactas para a luz intestinal. Essas células descamadas precisam ser repostas por um suprimento contínuo de células que partem de baixo para o meio das criptas. A renovação da célula do epitélio intestinal é completa a cada 2-3 dias e vários fatores, como a presença de nutrientes na luz intestinal e de hormônios gastrintestinais (ROEDIGER, 1994; RAMPAL, 2000; ROBERFROID et al., 2000), a liberação de peptídeos gastrintestinais, as secreções pancreática e biliar, o fluxo sangüíneo e a inervação intestinal, a mobilização intracelular de poliaminas (JACKSON e GRAND, 1991), contribuem para essa adequada renovação. Tanto a quantidade como a qualidade de alimentos ingeridos e nutrientes específicos regulam os hormônios gastrintestinais na mucosa intestinal que são importantes para o crescimento e reparação de células intestinais (ZIEGLER et al.,1995,1999).

1.2.2 Alterações Intestinais na Desnutrição

O intestino é sensível às alterações no suprimento de nutrientes e a presença de nutrientes, na luz intestinal, tem sido reconhecida como o estímulo mais importante para o crescimento e função da célula intestinal (LARA e JACOBS, 1998; ZIEGLER et al.,1999, 2003). Substratos como glutamina, glicose e cetonas parecem ser a principal fonte de energia para as células intestinais (SOUBA, 1993) e vários autores concordam que a via de alimentação e a complexidade da dieta também influenciam a proliferação celular, a função de barreira intestinal e a composição da flora fecal (RAMPAL, 2000; ROBERFROID et al., 2000). Estudos demonstram que, quando a ingestão de alimentos for diminuída ou não acontecer, pode não só ocorrer alterações na estrutura e função intestinal, como também a atividade específica de expressão de algumas enzimas digestivas na mucosa do intestino delgado diminui significativamente (JOHNSON, 1998).

Vários estudos realizados em estados de desnutrição generalizada, depleção protéica ou deficiência de micronutrientes específicos (ácidos graxos, folato, Zinco, Vitaminas A e B_{12}) comprovam a inibição do crescimento e renovação da mucosa intestinal (ZIEGLER et al.,1999; JESCHKE et al., 2000; FERRARIS e CAREY, 2000).

O efeito da diminuição, ou não ingestão, de alimentos na estrutura e função intestinal foi avaliado por Ferraris e Carey (2000) que utilizando vários modelos animais, observaram que a alteração mais importante, quando há diminuição da ingestão no intestino delgado, é a diminuição da área de absorção. Essa alteração parece estar associada à diminuição da altura das vilosidades e diminuição do número de células no eixo cripta - ápice, provavelmente devido à redução da proliferação e migração celular, e aumento da apoptose celular. Os mesmos autores comprovaram também um aumento na secreção intestinal de íons e fluidos, assim como na permeabilidade intestinal, sugerindo que o aumento secretório seja uma resposta adaptativa para aumentar a absorção de nutrientes e, com isso, garantir que, mesmo com a redução da concentração de nutrientes na luz intestinal e diminuição da área de absorção, ocorra a absorção de nutrientes através de gradiente de concentração (FERRARIS e CAREY, 2000).

Várias alterações intestinais têm sido observadas, por diferentes autores, na desnutrição energético-proteíca, entre elas, alteração ou diminuição da capacidade de digestão/absorção das células intestinais (THOMPSON et al., 2001), ruptura da função de barreira intestinal e aumento da permeabilidade à macromoléculas, aumento na translocação bacteriana (BARBOZA JÚNIOR et al.,1999; LUNN, NORTHROP-CLEWES e DOWNES,1991a, 1991b; CAMPBELL, ELIA e LUNN, 2003; LUNN, 2000) e estímulo à apoptose celular (JESCHKE et al., 2000; ZIEGLER et al., 2003). Todos esses achados podem contribuir direta ou indiretamente para as deficiências de nutrientes observadas na desnutrição energético-protéica.

SULLIVAN et al. (1992), ao estudarem a mucosa intestinal de crianças desnutridas graves (mais de 100 crianças gambienses) admitidas para tratamento hospitalar, mostraram graus variáveis de atrofia das vilosidades e, em casos mais graves, uma mucosa intestinal plana, hiperplasia moderada ou severa das criptas e infiltração maciça de linfócitos ao nível de epitélio. A alteração nas vilosidades pode causar a perda de enzimas na mucosa, necessárias para a digestão e absorção de macro e micronutrientes, podendo resultar no comprometimento da função intestinal de barreira com o efeito da absorção de macromoléculas de antígenos, que podem

comprometer o sistema imune e levar ao aparecimento de processo inflamatório (LUNN, 2000).

Existe uma associação entre desnutrição e presença de ruptura da função de barreira intestinal e isso pode contribuir para as deficiências de nutrientes observadas em crianças desnutridas (LUNN, NORTHROP-CLEWES, DOWNES, 1991a, 1991b; CAMPBELL, ELIA e LUNN et al., 2003, LUNN, 2000). Lunn et al. (1991a), em estudo longitudinal para determinar a relação existente entre alteração da permeabilidade intestinal e deficiência no crescimento infantil em crianças gambienses, de 0-15 meses de idade, observaram uma correlação negativa entre as alterações na permeabilidade intestinal e o crescimento. Nesse estudo, 43% da alteração de crescimento observada nos primeiros 15 meses de vida estava associada à alteração na função de barreira intestinal determinada pela alta excreção de Lactulose:Manitol na urina (LUNN, NORTHROP-CLEWES, DOWNES, 1991a). Esse mesmo grupo mostrou que o *deficit* no crescimento observado nessas crianças é devido à presença de enteropatia no intestino delgado, caracterizada por atrofia das vilosidades intestinais, redução na absorção e digestão de lactose e aumento na translocação de macromoléculas na mucosa e corrente sanguínea, desencadeando uma reação inflamatória local e sistêmica (LUNN , 2000).

1.2. 3 Integridade e Permeabilidade do Epitélio Intestinal

Vários investigadores utilizam a permeação de marcadores para medir a permeabilidade intestinal que se refere à integridade da barreira funcional do intestino (FORD et al., 1985; FLEMING et al., 1990; LUNN, NORTHROP-CLEWES, DOWNES,1991; BAO Y et al., 1996; BARBOZA JÚNIOR et al.,1999; LIMA et al., 2005). Na realidade, a permeabilidade intestinal é a mensuração da facilidade com que a superfície de mucosa intestinal é penetrada por substâncias e marcadores por difusão, sem intermediadores de constituintes específicos, ou seja, passagem de moléculas dependendo de gradiente de concentração. Em contexto clínico, a permeabilidade intestinal é aplicada para permeação de moléculas de massa maior do que 150 Daltons, e essa permeabilidade pode ser afetada por doenças, drogas, citocinas, hormônios ou o próprio ambiente, e não parece ser influenciada pela idade, raça ou fatores hereditários (TRAVIS e MENZIES ,1992).

O conceito de uso de marcadores para avaliar a passagem de substâncias através da parede intestinal data de 1673, quando Lister introduziu no intestino de cachorro um corante azul com massa de 262 Daltons, tentando mostrar a sua passagem na parede intestinal (LISTER, 1673). Somente em 1892, com os trabalhos de Reid, é que foi reconhecida a importância da manutenção de idênticos gradientes osmóticos e de pressões hidrostáticas para investigar *in vitro* as alterações de permeabilidade e transporte intestinais (REID,1892).

A década de 1960 é importante para definição, por fisiologistas e microscopistas eletrônicos, das propriedades da barreira do epitélio intestinal. Fordtran et al. (1965) são os pioneiros nos estudos de permeabilidade do trato gastrintestinal humano e os trabalhos de Farquhar e Palade (1963) são decisivos para a descoberta das zonas de adesão observadas nas conexões entre as células dos vários epitélios. Essas zonas de adesão são hoje conhecidas como zônulas de oclusão ou “tight junctions”, que são estruturas formadas por fibras protéicas que circundam as células epiteliais na porção distal, e estão conectadas com o citoesqueleto de células adjacentes .

A permeação no epitélio intestinal pode ocorrer por duas vias: a) através da membrana celular (transcelular), utilizada por monossacarídeos, manitol e moléculas de polietilenoglicóis (PEGs) de baixo peso molecular ; b) entre as células (paracelular) que constitui as zonas de oclusão, o espaço intercelular, as zonas de extrusão resultantes da morte de células e áreas de ulceração. Essa via é utilizada por moléculas de pesos maiores que 180 Daltons como a lactulose, celulobiose, rafinose ou dextran. Além desses poros, existem ainda pelo menos três mecanismos pelos quais as moléculas podem passar através das membranas: a) difusão de membrana, exigindo solubilidade lipídica dos solutos; b) passagem através de uma lesão mecânica ou abrasão no epitélio; c) transcitose (SCHAERER, NEUTRA e KRAEHENBUHL, 1991).

A absorção, através da mucosa intestinal saudável, é altamente seletiva e demonstra uma forte discriminação em relação à dimensão molecular das moléculas inertes, a qual se torna deteriorada em estados de enfermidades associados aos danos na mucosa (MENZIES, 1974; MENZIES et al., 1979). A permeabilidade da

mucosa intestinal é mais alta nas crianças desnutridas e acredita-se que estas alterações podem persistir por um período prolongado, devido ao comprometimento observado na resposta de reparação à atrofia da vilosidade (SULLIVAN et al.,1992). Em condições associadas à atrofia da vilosidade, há uma redução da área da superfície da mucosa intestinal e uma redução do número de células, o que resulta em uma redução no transporte transcelular das pequenas moléculas e um aumento no transporte paracelular das moléculas maiores.

A permeabilidade intestinal também encontra-se alterada em condições como AIDS (BAO et al.,1996; LIMA et al., 1997), doença de Crohn (PEARSON et al., 1982), enteropatia perdedora de proteína associada à *Clostridium difficile* (RYBOLT et al., 1989), diarréia crônica, desnutrição (BEHRENS et al.,1987; LUNN, NORTHROP-CLEWES, DOWNES, 1991a, 1991b; LIMA et al., 2005) e essa alteração se manifesta por diarréia e perda de peso. A permeabilidade intestinal é notadamente aumentada durante diarréias agudas em crianças ditas saudáveis, mas retorna ao normal dentro de poucas semanas (FORD et al., 1985; BARBOZA JÚNIOR et al., 1999).

1.2. 4 Teste de Permeabilidade Intestinal

A determinação de mono e poli açúcares excretados na urina progrediu na década de 90, quando passou a se utilizar a metodologia de cromatografia líquida de alta pressão com detecção de pulso amperométrica (High Performance Liquid Chromatography with Pulsed Amperometric Detection, HPLC-PAD). Esta metodologia permite a análise direta de várias moléculas de açúcares com alta sensibilidade e tem sido utilizada por vários investigadores (BARBOZA JÚNIOR et al., 1999; LUNN, NORTHROP-CLEWES, DOWNES, 1991a,1991b; LIMA et al., 2005).

O teste diferencial de absorção de açúcar é um teste não invasivo que foi validado por estudos com biópsias, cuja especificidade e sensitividade para atrofias severas da vilosidade são, respectivamente, 98% e 95% (NATHAVITHARANA et al.,1988). Esse teste é utilizado como um indicador da lesão da mucosa intestinal em crianças com diarréia (BEHRENS et al., 1987; BARBOZA JÚNIOR et al., 1999),

sendo aceito como uma técnica indireta para o monitoramento das mudanças da mucosa intestinal (FORD et al*.,* 1985). O teste utiliza lactulose e manitol, que são ingeridos pelo paciente e absorvidos, respectivamente, de formas para-celular e trans-celular, e a razão destes açúcares na urina (taxa de Lactulose:Manitol) é calculada após 5 horas da ingestão dos mesmos. A teoria do teste é que o manitol é absorvido passivamente através da mucosa e dá uma indicação da área de superfície do intestino delgado. Lactulose não é absorvida pelo enterócito, e no intestino delgado sadio, somente uma pequena porção é absorvida via para-celular. Quando existe, porém, lesão de mucosa, uma quantidade maior de lactulose cruza a barreira funcional intestinal (FORD et al., 1985). No organismo, esses açúcares se mantêm no líquido extracelular e são rapidamente excretados, inalterados nos rins (ELIA et al., 1987), conseqüentemente a quantidade excretada na urina reflete a quantidade que passa pelo epitélio intestinal.

GLUTAMINA

"Eu não sabia por onde começar, em outras palavras, eu não tinha hipótese sobre a função da glutamina".

Hans Krebs, 1980

1.3 A Glutamina

1.3.1. Considerações Preliminares

A glutamina é um aminoácido não essencial, ou seja, pode ser sintetizado em quantidades necessárias para o consumo diário, tendo como precursores outros aminoácidos. De peso molecular de 147,1 Dalton, a glutamina está presente em muitas proteínas e, em humanos, representa cerca de 20% do total dos aminoácidos livres do plasma em concentrações que variam de 0,5 - 0,9 mM (SMITH e WILMORE ,1990).

A existência da glutamina como aminoácido foi considerada pela primeira vez por Hlasiwetz e Habermann (1873), quando sugeriram que a amônia encontrada em hidrolisados protéicos era o resultado da sua liberação a partir de glutamina e asparagina (HLASIWETZ e HABERMANN, 1873). Dez anos mais tarde, a glutamina foi isolada do suco de beterraba (SCHULZE e BOSSHARD, 1883) e, em 1932, esse aminoácido foi obtido de um hidrolisado de proteína da gliadina (DAMODARAN, 1932). Deve-se a *sir* Hans Krebs, utilizando rins de cobaia e de ratos, a identificação nos tecidos de enzimas que catalizam a síntese e a hidrólise de glutamina (KREBS,1935).

Em 1938, a glutamina foi reconhecida como um nutriente requerido na dieta animal e humana, e classificada como aminoácido não essencial, já que é sintetizado *de novo* no organismo (ROSE, 1938).

Os conhecimentos dos aspectos relativos às vias de síntese e degradação da glutamina aumentaram significativamente nos anos seguintes, porém, durante as décadas de 40 e 50, houve progresso moderado no entendimento das funções catabólicas desse aminoácido. Os trabalhos desenvolvidos por Eagle, na década de 50, evidenciaram a importância da glutamina para o crescimento e manutenção de células em cultura (EAGLE, 1955; EAGLE et al.,1956). Desde então, a necessidade de glutamina em várias linhas de células, incluindo fibroblastos, linfócitos, macrófagos, enterócitos, células de carcinoma uterino (células HeLa), tem sido

reconhecida por vários autores (REITZER, WICE e KENNELL, 1979; MCKEEHAN,1982; SEBOLT e WEBER ,1984).

A concentração sérica da glutamina, apesar de ser alta, é bastante lábil, diminuindo rapidamente em situações de estados catabólicos, doenças graves, pós-operatório, infecções sistêmicas, transplante de medula óssea (RENNIE, 1985; ZIEGLER et al., 1992; JIANG et al., 1999; BOELENS et al., 2001) e tem sido observado um decréscimo de até 50% nos níveis séricos de glutamina em pacientes HIV positivos, queimados graves e em pós-operatório (LACEY e WILMORE, 1990; SMITH e WILMORE, 1990; GARREL et al., 2003). A diminuição na concentração sérica em estados catabólicos é maior para glutamina do que para qualquer outro aminoácido e, quando a utilização excede a produção endógena, os seus níveis diminuem em função da gravidade da doença (ASKANAZI et al., 1980; LABOW e SOUBA, 2000). Os estudos em modelos animais sobre o metabolismo de glutamina em estados catabólicos permitiram determinar a reversibilidade do seu decréscimo plasmático e tissular em estados catabólicos, com a administração de grandes quantidades de glutamina em soluções de nutrição parenteral, resultando em um aumento no peso corporal, melhora no balanço nitrogenado e aumento nas células do epitélio gastrintestinal (SMITH 1990; SMITH e WILMORE, 1990).

Alguns autores defendem que a classificação da glutamina como um aminoácido não essencial seja talvez incorreta, já que em várias condições patológicas a mesma é um nutriente essencial requerido na dieta, possuindo suas vias metabólicas e funções essenciais, e sugerem a sua reclassificação como aminoácido essencial condicional (SMITH 1990; SMITH e WILMORE, 1990; LACEY e WILMORE, 1990; BOELENS et al., 2001).

A glutamina em todas as células funciona como doador de átomos de nitrogênio, durante a síntese de purinas, pirimidinas e amino-açúcares (SZONDY e SOUBA et al., 1990 a; BOZA et al., 2000), além de ser importante mediador em várias vias metabólicas em diferentes tipos de células (MEISTER, 1956; ROSS 1967; KATZ, GOLDEN WALS,1976). No músculo esquelético existem evidências que a glutamina provavelmente tem função regulatória que inclui síntese protéica e inibição da degradação de proteínas (RENNIE et al., 1986; SOUBA et al., 1990a). A

glutamina é o substrato mais importante para a aminogênese renal (PITTS, 1964); no fígado, serve como substrato para gliconeogênese (ROSS, HENS e KREBS, 1967; KATZ, GOLDEN e WALS,1976) e para retenção de amônia (HAUSSINGER, 1989).

A glutamina é utilizada como principal substrato por células de crescimento rápido, como enterócito, fibroblastos e linfócitos (NEWSHOLME, CRABTREE e ARDAWI, 1985a e 1985b; SCHEPPACH et al, 1994; LABOW e SOUBA, 2000; ZIEGLER et al., 2000).

A seguir é apresentada uma descrição sobre a importância da glutamina em diversas células e tecidos, enfocando especificamente, sua estrutura molecular, sua síntese e metabolismo ao nível do intestino, sua atuação na recuperação da mucosa intestinal e por fim aplicações clínicas da glutamina e seus derivados dipeptídeos em humanos.

1.3.2. Estrutura Molecular, Síntese e Metabolismo

Estrutura molecular. A glutamina possui em sua estrutura química dois átomos de nitrogênio: um no grupo α-amino; e um no grupo amido, o que a classifica como amino-amido-ácido (**Figura 1**) e lhe permite desempenhar suas diversas funções, como transportadora de nitrogênio entre os tecidos, substrato para aminogênese renal (PITTS, 1964) e precursora de nucleotídeos e outras macromoléculas (SOUBA 1993; SOUBA et al.,1990).

Síntese. As duas principais enzimas intracelulares que regulam a síntese e a hidrólise da glutamina são a glutaminase que hidrolisa o grupo amido terminal da glutamina, produzindo glutamato e amônia, e a glutamina sintetase (dependente de ATP), que cataliza a biosíntese *de novo* da glutamina a partir do glutamato e amônia (SOUBA, SMITH e WILMORE, 1985). A hidrólise da glutamina é o primeiro passo para sua utilização e o glutamato gerado por essa reação pode tomar parte em outras reações, principalmente na via que permite que a glutamina seja consumida no ciclo do ácido tricarboxilíco. A reação de hidrólise da glutamina é crítica para a

liberação de amônia para o rim e é uma etapa importante, tanto por contribuir para a homeostase ácido-base como para a formação de purinas e pirimidinas (**Figura 2)**.

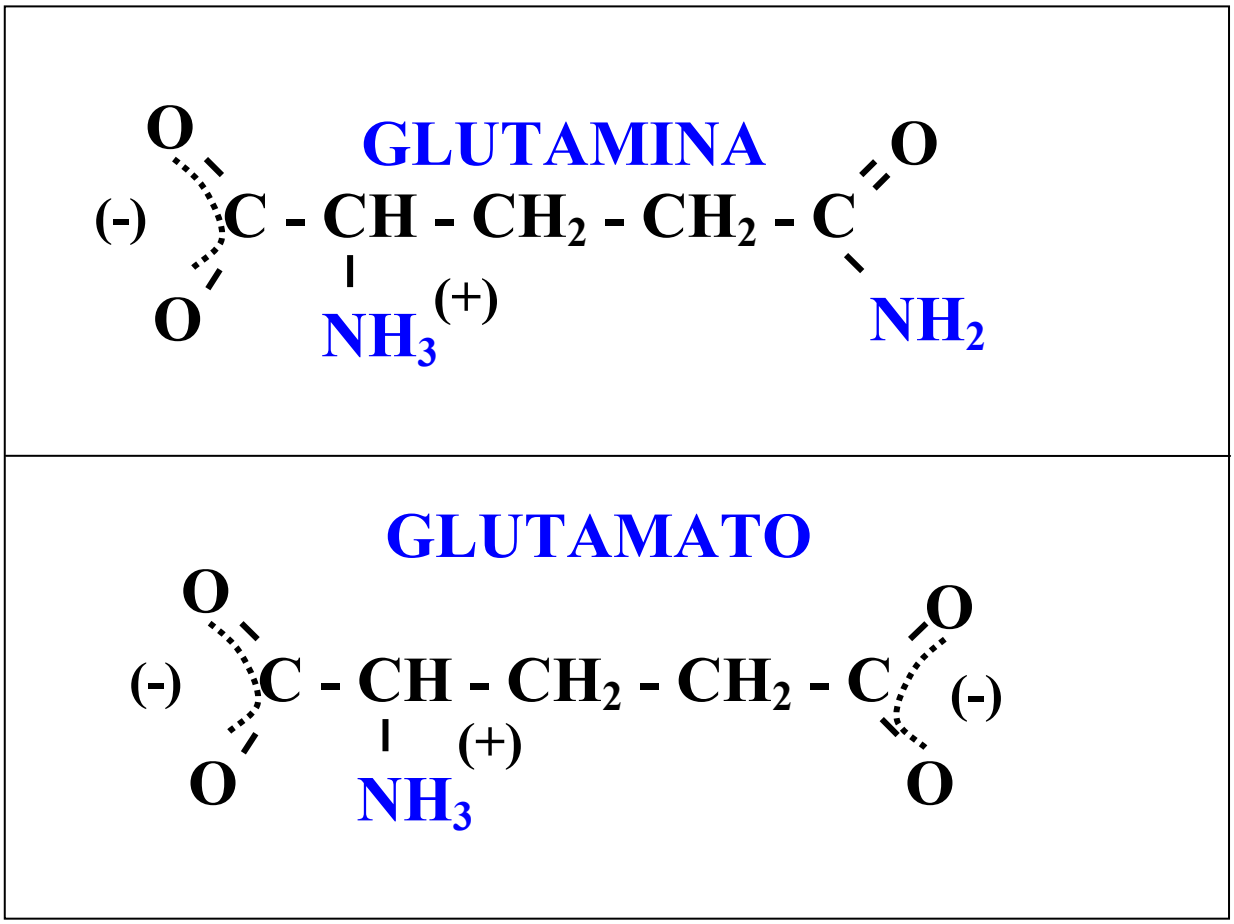


Figura 1. Estrutura molecular da glutamina e glutamato. A substituição no glutamato do amido nitrogênio por um grupo hidroxila é responsável pela incapacidade do glutamato substituir a glutamina em meios de cultura e também pelas vias diferentes de transporte, através da membrana celular, utilizadas por esses dois aminoácidos.

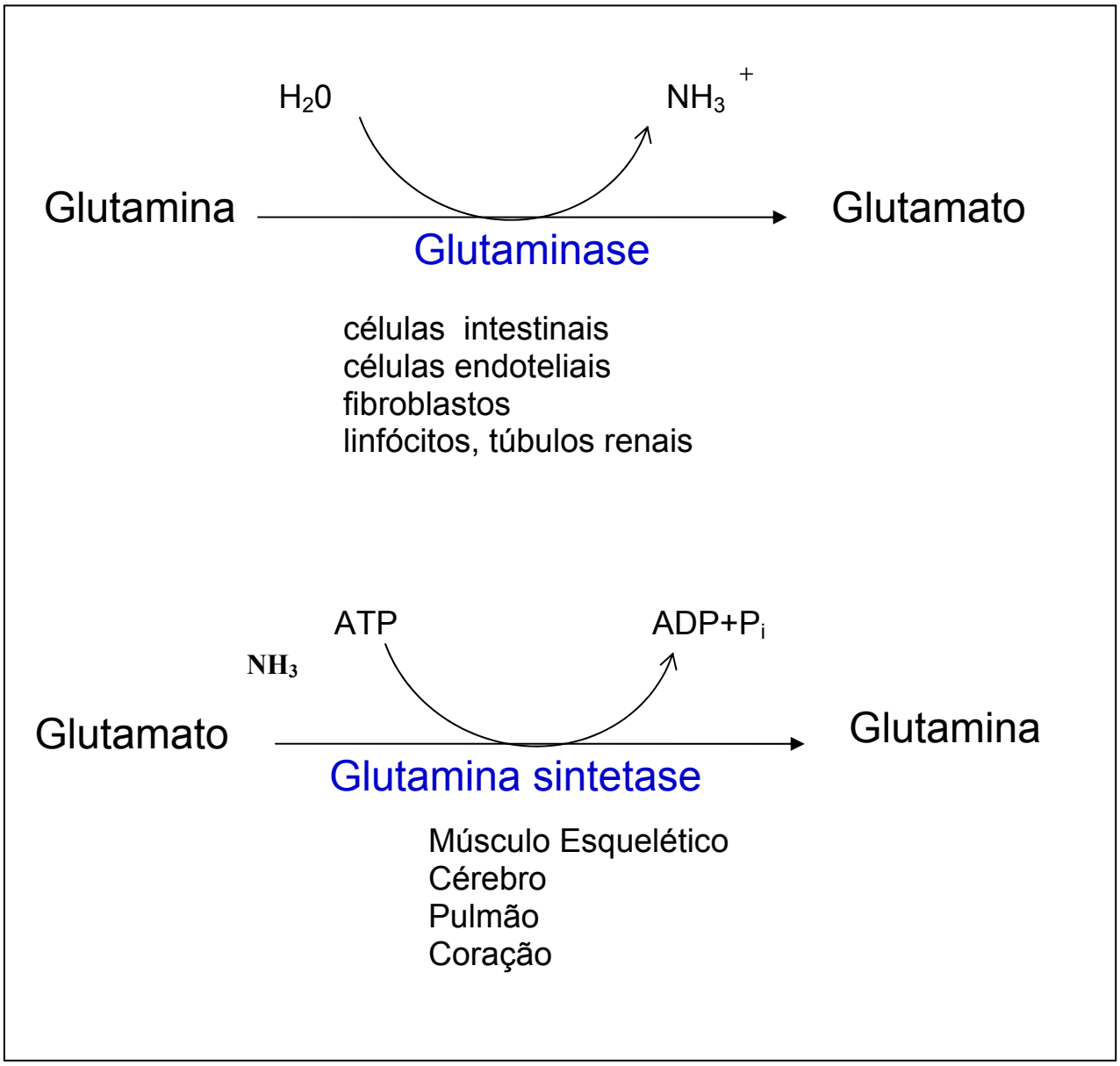


Figura 2 . **Síntese e degradação da glutamina**. A glutaminase catalisa a hidrólise de glutamina em glutamato e íon amônio. A glutamina sintetase catalisa a síntese de glutamina a partir do glutamato e amônia com gasto de ácido tricloro acético (ATP).

A maioria dos tecidos ou são predominantemente consumidores de glutamina contendo altos níveis de glutaminase (células intestinais, linfócitos, células tubulares renais), ou são produtores devido a alta atividade de glutamina sintetase (células do músculo esquelético, neurônios e pulmões). Sua síntese também pode correr no fígado e tecido adiposo (ROWBOTTOM, 1996). O fígado é o único órgão que tanto a consome como a produz. Sob algumas condições, como uma reduzida oferta de carboidratos, o fígado pode se tornar um consumidor de glutamina (WALSH, 1998 e ROWBOTTOM, 1996).

Metabolismo. A glutamina proveniente da circulação sangüínea ou da dieta é captada pelo enterócito, podendo então ser metabolizada por duas vias principais, uma formando D-pirrolina-carboxilato e a outra formando α-cetoglutarato, como intermediário do ciclo de Krebs. A primeira via leva à formação de prolina, ornitina e citrulina, que são liberadas do intestino delgado na quantidade de 10% da glutamina utilizada. Outros 10-15% são incorporados na proteína tecidual, enquanto que a maior parte (75%) é metabolizada via ciclo de Krebs **(Figura 3)**. Mais da metade (55%) dos carbonos da glutamina é oxidada para CO_2. O restante é recolhido como citrato, lactato, outros ácidos orgânicos e glicose (WINDMULLER e SPAETH, 1975; 1974; 1978).

Quando totalmente oxidada, os cinco carbonos do esqueleto da glutamina podem gerar aproximadamente 30mols de ATPs pelo ciclo de Krebs e fosforilação oxidativa (SOUBA et al., 1990). A oxidação da glutamina pela célula epitelial é a fonte de energia da mucosa intestinal e processa nitrogênio e carbono da luz intestinal e corrente sangüínea para ureogênese e gliconeogênese hepática (CURI et al., 2005).

1.3.3 Efeitos Tróficos na Mucosa Intestinal

Quase 80% do total de glutamina corporal é armazenado no músculo esquelético onde seu nível atinge cerca de 30 vezes os níveis séricos (BERGSTROM et al., 1974). Estudos realizados em cães, para examinar o fluxo de glutamina, demonstram que, ao ser liberada do músculo esquelético, o sítio principal

de captação de glutamina é a célula intestinal, mas quantidades variáveis são captadas pelos rins para manter o equilíbrio ácido-base (SOUBA e WILMORE,1983).

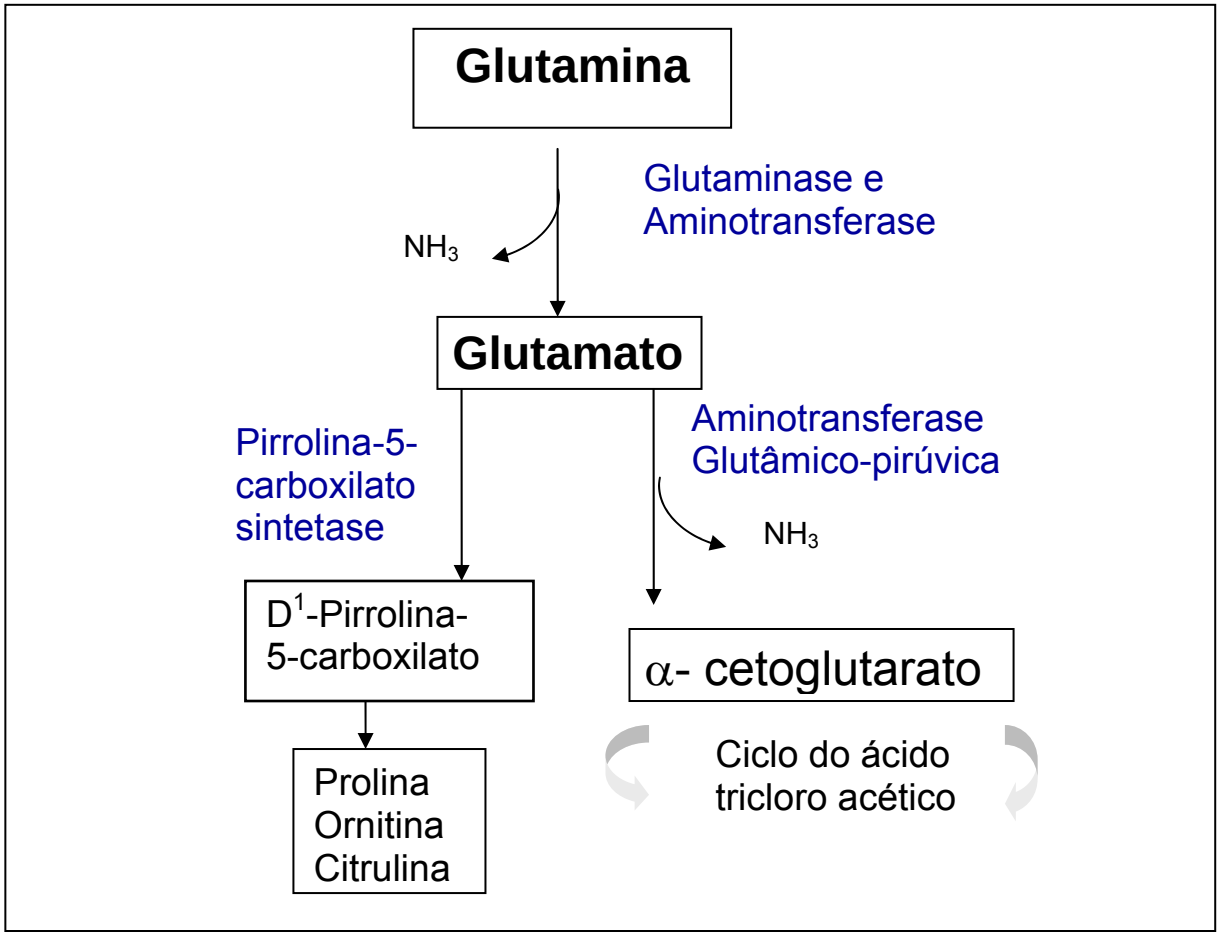


Figura 3. Metabolismo da glutamina no enterócito.

Na maioria das espécies animais, a captação de glutamina pelas células do intestino delgado é muito maior que a de qualquer outro aminoácido (WEBER, MADDREY e WALSER et al.,1977), sendo uma das principais funções a habilidade da mucosa intestinal em metabolizar a glutamina circulante e luminar. A captação da glutamina ocorre fundamentalmente nas células epiteliais dos vilos do intestino delgado que adquirem glutamina por duas fontes: 1) sangue arterial, através da membrana basolateral do enterócito; 2) da dieta através da membrana apical (HORVATH et al.,1996).

Os trabalhos iniciais realizados em vários animais (rato, cão, gato, hamster e macaco), por Herbert Windmueller e Albert Spaeth, na década de 70 e 80, são os

pioneiros na determinação do papel dos aminoácidos, especialmente os não essenciais no metabolismo intestinal. Esses autores fizeram a observação inicial que o intestino remove até 25% da glutamina no fluxo sangüíneo, sendo então o intestino delgado considerado como o sítio mais importante da metabolização da glutamina. Suas observações identificaram a glutamina como fonte primária de energia para o enterócito e precursora de importantes vias metabólicas, especialmente as que levam à síntese de ornitina, citrulina, prolina e arginina (WINDMUELLER e SPAETH, 1974,1975,1978,1980; WINDMUELLER,1982). Posteriormente, a glutamina foi considerada um substrato respiratório para o enterócito, quantitativamente mais importante do que a própria glicose, mesmo em animais recém-nascidos (WINDMUELLER e SPAETH, 1980; NEWHOLSOME, CABTREE e ARDAWI, 1985 a, WU et al.,1995).

A importância dos níveis de glutamina para a manutenção da função e fisiologia das células intestinais foi comprovada por Baskervillle et al., (1980), ao infundirem glutaminase em várias espécies animais e observarem decréscimos significantes dos níveis de glutamina sérico associados ao aparecimento de diarréia, atrofia de vilosidades, edema e ulceração da mucosa com áreas de necrose da mucosa intestinal (BASKERVILLE, HAMBLETON e BENGOUGH, 1980).

Vários estudos em modelos animais comprovaram o efeito trófico da suplementação parenteral ou enteral de glutamina ou dipeptídeos da glutamina (glicil-glutamina e alanil-glutamina) na mucosa gastrintestinal como atenuação da atrofia intestinal, maior celularidade do intestino delgado e grosso (O´DWYER et al., 1989; SCHEPPACH et al., 1994), diminuição da atrofia pancreática (HELTON, 1990), prevenção de esteatose hepática em ratos (GRANT e SNYDER,1988), aumento na espessura da mucosa intestinal e no conteúdo de proteínas e de DNA ao nível intestinal (FOX et al.,1988; JACOBS et al., 1988), diminuição de culturas positivas para bactérias nos linfonodos mesentéricos, diminuição de bacteremia e endotoxemia, e diminuição de mortalidade (FOX et al.,1988).

A glutamina, quando utilizada em modelos animais, acelerou a recuperação da lesão intestinal causada por quimioterapia (FOX et al., 1988) ou radioterapia (KLIMBERG et al., 1990a, 1990b). A adição de glutamina na dieta

enteral de ratos não somente diminue a enterocolite induzida pelo Metrotexate, medida pelos parâmetros morfométricos, no jejuno e colon, como também reduz a transmigração de toxinas da luz intestinal (FOX et al, 1988). Em ratos que receberam radiação abdominal, o uso de glutamina oral prévio à radiação abdominal induziu ao aumento das vilosidades e quase que triplicou o número de mitoses por cripta intestinal, além da diminuição da morbidade e mortalidade observada quando comparada com animais que não receberam glutamina (KLIMBERG et al., 1990b).

1.3.4. Utilização em Humanos

No início da década de 90, Scheppach et al., ao realizarem biópsias de porções do intestino humano (íleo, jejuno, colon proximal, reto e sigmóide) incubadas com glutamina, alanil-glutamina ou salina, observaram um estímulo na proliferação de células das criptas do intestino delgado e no intestino grosso, efeito confinado especificamente em células do compartimento basal das criptas - local onde se processa o maturamento da célula epitelial do intestino a partir de células pluripotentes (SCHEPPACH et al., 1994). Esses achados deram início a uma série de trabalhos científicos, utilizando L-glutamina em soluções de alimentação parenteral em humanos, com o objetivo de diminuírem ou evitarem a atrofia de mucosa observada com soluções de nutrição enteral ou parenteral que não continham glutamina (CALDER e YAQOOB, 1999; WENERMAN e HAMMARQVIST, 1999). A glutamina tornou-se um dos nutrientes mais intensamente estudados em pesquisa gastrintestinal (LABOW e SOUBA, 2000; DUGGAN, GANNON e WALKER, 2002).

Os benefícios do enriquecimento de soluções de nutrição parenteral ou enteral utilizadas em diferentes grupos, como pacientes traumáticos (HOUDIJK, NIJIVELT e VAN LEEUWEN, 1999; HOUDIJK e VAN LEEUWEN, 2000; BOELENS et al., 2001), cirúrgicos (JIANG et al, 1999), transplantados de medula óssea (ZIEGLER et.al.,1992; ZIEGLER, 2002), oncológicos sob quimioterapia (DECKER-BAUMANN et al., 1999), comprovam o potencial do uso de glutamina em pacientes de risco.

Ziegler et al. (1993), em uma revisão sobre a utilização de glutamina em adultos, sugeriu grupos de pacientes (estados catabólicos, disfunção intestinal, síndromes de imunodeficiência ou doença maligna avançada) que se beneficiariam com o uso de glutamina em soluções de nutrição parenteral (ZIEGLER et al., 1993). Fürst et al. (1997) sugerem que a omissão de glutamina em soluções de nutrição parenteral deve ser considerada como uma reposição deficiente em vez de uma suplementação (FÜRST et al., 1997).

Uma das áreas promissoras para uso de glutamina são recém-nascidos prematuros de baixo peso. A inadequada nutrição nessa fase de vida tem um risco maior de desenvolvimento neuromotor atrasado que pode ser uma seqüela limitante na vida. A maior morbidade a curto prazo desse grupo de recém nascidos pode também ser significante, requerendo cuidados intensivos e altos custos hospitalares. Neu et al. (1997), adicionando L-glutamina (0,3mg/kg/dia) em soluções de nutrição enteral em 68 recém-nascidos prematuros de peso muito baixo, observaram não só melhor tolerância para utilização de nutrição enteral mais precoce, mas também uma redução significante em septicemia e bacteremia (11% *versus* 30%), resultando em uma diminuição dos custos hospitalares no grupo de recém nascidos que recebeu L-glutamina (NEU et al., 1997). Dallas et al (1998), utilizando suplementação enteral de glutamina em bebês prematuros e de baixo peso, também comprovaram a diminuição de custos hospitalares em bebês prematuros que receberam glutamina (DALLAS et al., 1998).

A glutamina pode ser útil em pacientes com diarréia (BARBOZA JÚNIOR. et al., 1999; RIBEIRO JÚNIOR et al., 1994; LIMA et al., 2002; CARNEIRO-FILHO et al., 2003; YALÇIN et al., 2004). Estudos realizados na Indonésia, nos quais a glutamina foi adicionada à solução de re-hidratação oral, recomendada pela OMS (WHO,1990), e oferecida a pacientes com cólera mostraram uma redução de 25% no volume de fezes nas primeiras 24 horas e 30% de redução total de perda fecal quando comparados com pacientes que utilizaram solução de re-hidratação oral isenta de glutamina (PUNJABI et al.,1991). Ribeiro Júnior. et al. (1994) observaram que a solução de re-hidratação oral com 90 mmol/l L-glutamina + 90 mmol/l L-glicose foi bem tolerada e comparável aos efeitos da solução de rehidratação oral recomendada pela OMS para tratamento de desidratação em crianças com diarréia

não colérica (RIBEIRO JÚNIOR et al., 1994). O uso de glutamina (0,3g/kg/dia) em lactentes entre 6-12 meses de idade mostrou sua eficiência em diminuir a duração dos episódios de diarréia (YALÇIN et al., 2004).

1.3.5 Derivados Peptídicos e sua Utilização em Humanos

Algumas propriedades químicas da glutamina, como: 1) instabilidade, principalmente ao calor da esterilização e ao armazenamento prolongado; 2) solubilidade limitada (≈ 3g/100mL a 20ºC); 3) velocidade de sua hidrólise depende da temperatura, pH, e concentração iônica (MEISTER, 1956); 4) decomposição gerando ácido piroglutâmico e amônia, impedem seu uso rotineiro em situações clínicas.

Soluções comerciais utilizadas em suporte nutricional contendo aminoácidos podem ser enriquecidas com glutamina na forma cristalizada antes de sua administração ao paciente. A preparação adequada de tal solução, porém, exige um procedimento diário, em temperatura ambiente de 4ºC, sob condições assépticas, em farmácia local com subseqüente esterilização por filtração de membrana (KHAN et al., 1991). Para diminuir o risco de precipitação da glutamina, sua concentração não pode exceder 1,0 -1,5%. Conseqüentemente o fornecimento de glutamina em soluções de suporte nutricional é extremamente dispendioso.

Essas limitações ao uso clínico da glutamina favoreceram o desenvolvimento de dipeptídeos com resíduos de glutamina, nas posições N- ou C-terminal (L-alanil-glutamina, glicil-L-glutamina), por serem altamente solúveis em água, estáveis durante o processo de esterilização e armazenamento por até 2 anos permitindo o seu uso em soluções de nutrição parenteral ou enteral (FÜRST, POGAN e STHELE, 1997). O dipeptídeo alanil-glutamina é mais estável, mais solúvel, mais bem tolerado e tem pelo menos o mesmo efeito que a glutamina na reparação de mucosa intestinal *in vitro* (CARNEIRO et al. 2003, 2006; BRITO et al., 2005a, 2005b), em animais (LIMA et al., 2002) e em humanos (BUSHEN et al., 2004).

O primeiro ensaio clínico utilizando-se um dipeptídeo sintético em humanos, foi realizado por Stehle et al. (1989), que adicionaram alanil-glutamina na solução de nutrição parenteral de seis pacientes oncológicos que haviam se submetido à ressecção de colon ou reto e compararam seus efeitos com um grupo controle (n = 6) que recebeu uma solução iso-calórica e iso-nitrogênica contendo glicina por um período de 5 dias pós-operatórios. No grupo que recebeu alanil-glutamina, foi observado um aumento no balanço nitrogenado em cada dia do pós-operatório, quando comparado com o grupo controle no qual o nível de glutamina foi mais baixo que o observado no período pré-operatório. Os autores associaram o aumento no balanço nitrogenado com a manutenção do *"pool"* intracelular de glutamina. A infusão da solução não causou efeitos adversos (STEHLE et al., 1989).

Ultimamente, a preparação de dipeptídeos, contendo glutamina, utiliza métodos biotecnológicos, nos quais a L-glutamina é obtida por fermentação e síntese de peptídeos catalisada por complexo enzimático de origem bacteriana ou fúngica (VESELKOVA A et al.,1996).

Em 1996, o grupo de pesquisa da Unidade de Pesquisas Clínicas da Universidade Federal do Ceará (UPC/UFC), em colaboração com a Universidade de Virginia, EUA, sintetizou, através de um método químico patenteado (US # patente 5.561.111), um composto rico em glutamina, denominado alanil-glutaminil-glutamina. O mesmo grupo desenvolveu, utilizando tecnologia de DNA recombinante, um peptídeo de cadeia longa, rico em glutamina e com adição de arginina (LIMA, 1998).

1.3.6. Efeitos Adversos e Toxicidade da Glutamina e seus Derivados

Apesar dos vários trabalhos mostrando benefícios da glutamina em humanos, os efeitos adversos e a toxicidade da glutamina não tem sido investigados sistematicamente. A informação mais detalhada sobre toxicidade e efeitos adversos da glutamina provém de um estudo realizado por Ziegler et al. (1990), no qual se utilizou glutamina em quatro protocolos por diferentes vias de administração, tempo e dose variados em pacientes e voluntários sadios. Os autores não detectaram eventos adversos ou toxicidade clinica ou laboratorial e concluíram que a glutamina

é bem tolerada quando administrada por via oral ou intravenosa por periodos curtos ou em soluções de nutição parenteral (ZIEGLER et al. 1990).

Como o metabolismo de glutamina gera amônia e glutamato, ambos com efeitos neurológicos, sua utilização em pacientes com doença hepática é limitada, e alguns autores advogam a realização de testes psicológicos e de comportamento quando da sua utilização em humanos (GARLIK, 2001).

Sacks (1999), para avaliar a segurança clínica de glutamina quando utilizada em pacientes em estados catabólicos, revisou dezoito ensaios clínicos e revisões publicadas, entre 1970 e 1997, e concluiu que a glutamina, mesmo em estado de *stress*, é bem tolerada e não se observam efeitos adversos, porém, alerta para seu uso em pacientes portadores de doenças hepáticas ou renais e neonatos prematuros (SACKS, 1999).

Oppong et al. (1997) analisaram testes psicométricos, eletroencefalografia e níveis de amônia sangüineos em dezessete pacientes cirróticos que fizeram uso de 20g de glutamina antes da realização do transplante hepático. Foi detectado uma elevação dos níveis de amônia, juntamente com uma diminuição das reações psicomotoras e um aumento da amplitude no eletroencefalograma, e todas essas alterações foram revertidas após o transplante hepático (OPPONG et al., 1997).

Em um estudo duplo cego realizado em cento e vinte pacientes pós-cirúrgicos, utilizou-se glutamina em solução de alimentação parenteral e, para determinação de segurança clínica, foram monitorados hemoglobina, contagem total de leucócitos, plaquetas, glutamina, sodium, potássio, funções hepáticas, glicose, colesterol, bilirrubina, triglicerideos e balanço nitrogenado. A análise comparativa entre os grupos estudados não revelou eventos adversos relacionados com o uso de glutamina (JIANG et al., 1999).

A segurança clínica em neonatos prematuros foi averiguada por Lacey et al. (1996), utlizando solução de alimentação parenteral enriquecida com glutamina em quarenta e quatro prematuros na dose equivalente a 0,4g/kg/d por 15 dias. Os níveis de glutamina sérica se elevaram em média de 50%, mas, como não houve

alteração dos níveis de glutamato e amônia sangüíneos nem foram detectados sinais clínicos de neurotoxicidade nesses bebês, os autores concluíram que a glutamina é clinicamente segura para utilização em prematuros nessa dose.

Para identificar riscos potenciais com o uso de glutamina, Garlick (2001) revisou os trabalhos pubicados sobre os possíveis efeitos adversos relacionados com o uso de glutamina em soluções de nutrição parenteral ou enteral e identificou oito trabalhos (quatro em adultos e quatro em crianças), em que não havia sido observado toxicidade e o autor chegou à conclusão da segurança do uso de glutamina nos grupos estudados (GARLICK, 2001).

JUSTIFICATIVA

Nós somos culpados por muitos erros e faltas, mas nosso pior crime é o abandono das crianças, negligenciando o início da vida. Muitas das coisas que precisamos podem esperar. A criança não pode. Agora mesmo, é o tempo em que seus ossos estão sendo formados, seu sangue está sendo feito e seus sentidos estão sendo desenvolvidos. Para ela não podemos responder "Amanhã". Seu nome é "Hoje".

Gabriela Mistral, 1948

2. JUSTIFICATIVA

A taxa de mortalidade infantil é considerada um indicador das condições de saúde da população. A taxa de mortalidade infantil no Brasil, em 2004, segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), foi de 26,6 por mil nascidos vivos. Apesar da OMS considerar essa taxa de mortalidade como média (entre 20 e 49 mil), esse número corresponde a quase 100 mil crianças brasileiras falecidas antes de completar um ano de vida (UNICEF, 2006c).

Segundo relatório do UNICEF, a Região Nordeste é mais vulnerável à mortalidade infantil, sua taxa equivalendo a mais que o dobro das taxas verificadas nas outras regiões brasileiras. Na região do Semi-Árido, que ocupa 86% do território do Nordeste e o norte dos estados de Minas Gerais e do Espírito Santo, encontram-se os municípios brasileiros com as taxas de mortalidade mais elevadas e, segundo os dados do Ministério da Saúde, registrados no triênio 2001-2003, alguns municípios ultrapassam a taxa de mortalidade infantil do Sudão, que é de 63 por mil (UNICEF, 2006c).

Estudos epidemiológicos demonstram que a desnutrição infantil está associada a mais da metade dos óbitos em menores de 5 anos de idade e que 83% desses óbitos acontecem em crianças leve ou moderadamente desnutridas, implicando que a desnutrição, independente da intensidade, é um fator de risco importante para mortalidade infantil (PELLETIER et al. 1995).

No Brasil, a prevalência de desnutrição em crianças menores de 2 anos de idade ainda é preocupante, principalmente para as crianças residentes no Nordeste quando comparadas com as crianças residentes no Sul. Na região do Semi-Árido brasileiro, a prevalência de baixo peso é bem maior (8,3%) quando comparadas com as crianças do Sul (2,5%). Em 484 dos 1444 municípios dessa região (34,3%), mais de 10% das crianças menores de 2 anos apresentam baixo peso-para-idade, situação considerada de alta vulnerabilidade (UNICEF, 2006b).

Evidências sugerem que a desnutrição não só afeta direta ou indiretamente a morbidade, a sobrevivência, o crescimento físico e a mortalidade

infantil (SCHORLING et al., 1990; GUERRANT et al., 1992; LIMA et al., 1992, 2000; PELLETIER et al., 1995; YOON et. Al., 1997; VICTORA, 1999; PELLETIER e FRONGILLO 2003; CAULFIELD et al., 2004), como também afeta o desenvolvimento cognitivo e o comportamental da criança e do adulto (GRANTHAM-MCGREGOR, WALKER e CHANG, 2000; WALKER et al., 2000; MARTORELL, 2001) e aumenta o risco de problemas obstétricos (MARTORELL et al., 2001). Atualmente existe uma nova área de pesquisa, ainda controversa, atribuindo nutrição nos primórdios da vida com maior risco do aparecimento de doenças crônicas na idade adulta, como hipertensão arterial, obesidade, doenças coronarianas (BARKER e FALL, 1993; JOSEPH e KRAMER, 1996;GASKIN et al., 2000; PRENTICE e MOORE, 2005).

Talvez a principal causa das conseqüências de desnutrição infantil, a curto, médio e longo prazo, sejam as alterações intestinais observadas com conseqüente diminuição da absorção de nutrientes e deterioração do estado nutricional. Dentre as alterações causadas por desnutrição, a alteração na permeabilidade intestinal, comprovada pela elevação da taxa de Lactulose:Manitol na urina, tem sido comprovada por diferentes autores (BEHRENS et al., 1987; SULLIVAN et al., 1992; GOTO et al., 1999; BARBOZA JÚNIOR, 1999; LIMA et al., 2005). O teste de absorção intestinal de monoaçúcares é um teste não invasivo que foi validado por biópsia intestinal e tem sido usado como um teste indicador de dano na mucosa intestinal em crianças (BEHRENS et al., 1987; LUNN, NORTHROP-CLEWES e DOWNES 1991a ; BARBOZA JÚNIOR et al., 1999; LIMA et al, 2005), sendo aceito como um método indireto para determinar função de absorção e de barreira funcional intestinal (FORD et al., 1985; LIMA et al., 2005).

O dano na mucosa intestinal resulta em deficiência de crescimento e redução calórica e má absorção, o que compromete ainda mais o estado nutricional da criança (TOMKINS e WATSON, 1989; LUNN, NORTHROP-CLEWES e DOWNES, 1991a , 1991b; CAMPBELL, ELIA e LUNN, 2003). Segundo Sullivan et al. (1992), essa alteração pode ser crônica e a atrofia das vilosidades pode persistir por um período prolongado devido à resposta deficiente na reparação dessa vilosidade intestinal (SULLIVAN et al., 1992).

Apesar do conhecimento das alterações histológicas e fisiológicas, decorrentes da desnutrição infantil no intestino e do reconhecimento do papel da glutamina como aminoácido essencial para a vitalidade do enterócito (SOUBA, 1993), além da comprovação dos efeitos fisiológicos da glutamina na manutenção da função da mucosa gastrintestinal (SOUBA, SMITH e WILMORE,1985; SOUBA et al., 1990; ZIEGLER et al., 2000; 2003; DUGGAN , GANNON e WALKER, 2002), a glutamina ou seus derivados têm sido pouco estudados em ensaios clínicos em crianças desnutridas ou sob risco nutricional (LIMA et al. 2005).

Segundo Duggan et al. (2002), embora vários estudos *in vitro* e *in vivo* apontem para a importância da glutamina ou seus derivados dipeptídicos, na manutenção e reparo da mucosa intestinal, os efeitos benéficos observados, quando utilizados em soluções de nutrição parenteral ou enteral, não permitem a sua utilização generalizada por diversos problemas metodológicos, como diferentes populações estudadas, tamanho da amostra inadequado, descrição incompleta da randomização, obscurecimento dos critérios de inclusão ou exclusão, ausência de grupo de controle isonitrogênico, deficiências na análise estatística. Para esses autores, é necessário a realização de ensaios clínicos, randomizados em que os erros apontados anteriormente sejam eliminados e que medidas de desfecho, como permeabilidade intestinal, translocação bacteriana e a histologia do intestino delgado sejam inseridas (DUGGAN, GANNON e WALKER , 2002).

O grupo de pesquisadores da UPC/UFC vem utilizando a glutamina e seus derivados em diferentes ensaios clínicos, comprovando seu efeito ao nível da permeabilidade intestinal, determinada pela taxa de excreção urinária de lactulose e manitol (BUSHEN et al., 2004; LIMA et al., 2005). Em ensaio clínico duplo-cego, oitenta crianças desnutridas foram randomizadas para receberem, na dieta recomendada pela OMS para a recuperação da criança com desnutrição grave, a suplementação de glutamina (16,2g/dia) ou glicina (isomolar, 8,3g/dia) por um período de 10 dias. O grupo suplementado com glutamina mostrou uma melhora significativa na barreira funcional intestinal, comprovada por teste de permeabilidade intestinal, sem conseqüente aumento de peso dentro dos 10 dias de avaliação do estudo. Para os autores, a curta duração da intervenção e o tamanho da amostra poderiam explicar a ausência no ganho ponderal (LIMA et al., 2005).

Para determinar o efeito da suplementação oral da alanil-glutamina em crianças sob risco de desnutrição infantil, escolheu-se a população de crianças abaixo de 8 anos de idade residentes em uma comunidade carente de Fortaleza.

Nesse estudo postulou-se que a suplementação de alanil-glutamina por via oral possa recuperar a lesão da barreira funcional intestinal observada em crianças mal nutridas e, conseqüentemente, possa estimular o crescimento físico dessas crianças.

OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

3.1.1 Determinar os efeitos imediatos e a longo prazo da suplementação oral da alanil-glutamina na permeabilidade intestinal e no estado nutricional de crianças residentes na comunidade do Parque Universitário do Pici (PU).

3.2 Objetivos Específicos

3. 2.1 Determinar o efeito da suplementação oral de alanil-glutamina na função de barreira intestinal, medida pela taxa de excreção urinária de Lactulose:Manitol (LM), em crianças residentes no PU;

3.2.2 Determinar os efeitos da suplementação oral de alanil-glutamina nos indicadores antropométricos (peso–para–idade, peso-para-estatura e estatura-para-idade) e crianças residentes no PU;

3.2.3 Determinar os eventos adversos ocorridos na suplementação oral de alanil-glutamina em crianças residentes no PU .

MATERIAIS E MÉTODOS

4.0. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Desenho e Duração do Estudo

O estudo é um ensaio clínico randomizado controlado, para determinar o efeito da alanil-glutamina/glicina na permeabilidade intestinal e o estado nutricional em crianças maiores de 6 meses e menores de 8 anos de idade, em crianças desnutridas ou sob risco nutricional residentes no PU.

O estudo foi realizado no período de julho de 2003 a novembro de 2004 e cada criança envolvida no estudo foi observada por um período de 4 meses após o 1°dia do protocolo de estudo.

4.2. Descrição da População

4.2.1 População do Parque Universitário do Pici (PU)

A comunidade do PU fica localizada a 5km ao sul da Faculdade de Medicina, Universidade Federal, Fortaleza, CE. As **Figuras 4 e 5** mostram, respectivamente, a fotografia satélite e localização geográfica do PU com a distribuição das crianças envolvidas no estudo. Um censo realizado, na comunidade, em janeiro de 2000, documentou que aproximadamente 15% dessa população é menor de 8 anos de idade. O nível sócio-econômico dessa população é baixo considerando os seguintes dados: 75% das famílias vivem com menos de 2 salários mínimos (R$226/mês na época), 60% tem acesso a água encanada, 10% tem banheiros com descarga e 85% das mães têm uma escolaridade inferior a 8ª Série do Ensino Fundamental. Em 2002, duzentos e vinte e uma crianças menores de 8 anos, que estavam envolvidas em um projeto de pesquisa, foram medidas e pesadas e oitenta e duas (37%) dessas crianças possuíam escore *z* <-1 para um dos indicadores antropométricos (peso-para-idade, estatura-para-idade ou peso-para-estatura) .

Figura 4. Fotografia satélite da Comunidade Parque Universitário do Pici. A comunidade do Parque Universitário (PU) está localizada no perímetro urbano da cidade de Fortaleza, aproximadamente 3º 44’ ao sul da linha do equador e 38º 34’ a oeste do meridiano de Greenwich.

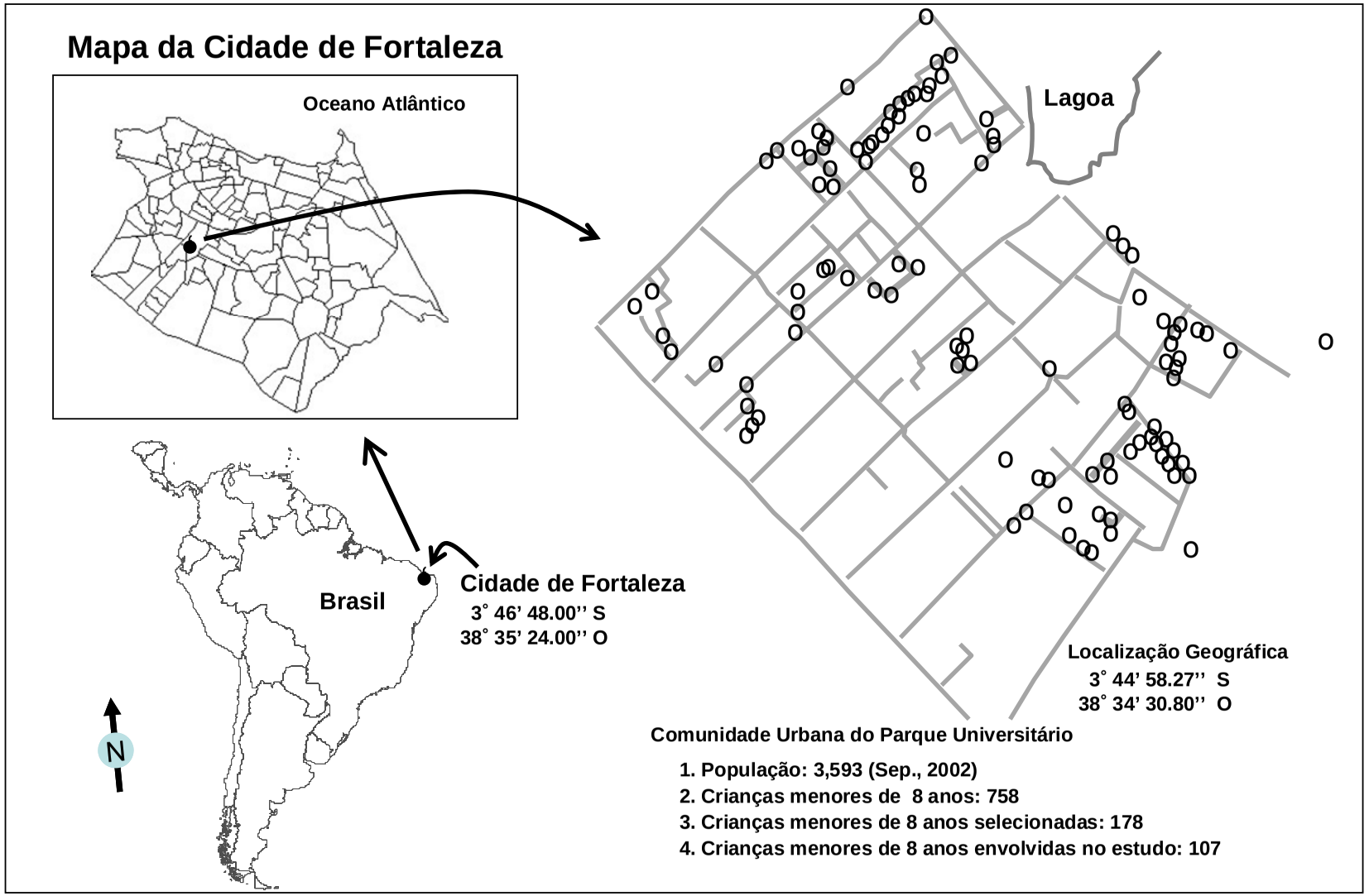


Figura 5. Localização geográfica do Parque Universitário do Pici e distribuição das crianças incluídas no estudo.

4.2.2 População do Estudo

A população envolvida no estudo é formada por 107 crianças maiores de 6 meses e menores de 8 anos de idade que moram no PU, alocadas por randomização em dois grupos de estudo. O primeiro grupo recebeu 24,1g de pó de alanil-glutamina e o segundo grupo, 25g de glicina, oferecidos em 50 mL de leite integral, de forma isonitrogênica, com consistência e sabor semelhantes.

Para o cálculo da quantidade de alanil-glutamina a ser oferecida por criança foi utilizado a dose equivalente molar da quantidade em massa de glicose (20g/L ou 111mM de glicose) existente no soro de rehidratação oral recomendado pela Organização Mundial da Saúde. Para o cálculo da quantdiade de glicina a ser oferecida foi utilizado a massa de nitrogênio existente em 24,1g de alanil-glutamina (4,66g) e calculado a quantidade de glicina que contivesse essa mesma quantidade de nitrogênio.

4.2.3 Critérios de Inclusão/Exclusão/Desistência**.** As crianças, para serem incluídas no estudo, deveriam satisfazer os seguintes critérios:

- > 6 meses e < 8 anos de idade, com escores *z* < -1 da mediana de referência do NCHS para um dos indicadores antropométricos (peso-para-estatura, estatura-para-idade, peso-para-idade);
- residência no PU;
- pais ou responsáveis estarem de acordo e assinarem o termo de consentimento.

Os critérios de exclusão do estudo foram:

- amamentação exclusiva;
- participantes em um outro estudo nos últimos dois anos;
- presença de doenças sistêmicas ou infecciosas graves no período de seleção;
- irmão(ã) inscrito(a) no programa;
- presença de doenças crônicas (tuberculose, AIDS).

Saída ou desistência do estudo foi considerada como:

- a criança tenha recusado a tomar a solução contendo alanil-glutamina ou glicina;
- os pais tenham decidido retirá-la do estudo;
- a criança tenha manifestado qualquer Evento Adverso Sério como náusea, vômito, cólicas abdominais relacionadas à ingestão da solução contendo alanil-glutamina ou glicina .

4.2.4 Procedimentos de Envolvimento – Aleatoriedade

Cada criança foi alocada no grupo de estudo aleatoriamente, utilizando-se blocos aleatórios permutados de comprimentos adequados (n=20), para que pudessem receber alanil-glutamina ou glicina por um período de 10 dias. Uma lista mestra com o registro das crianças, em ambos os grupos, foi preparada por um indivíduo que não estava envolvido em qualquer fase do estudo. Esta lista mestra foi guardada separadamente, lacrada na Unidade de Pesquisas Clínicas /Faculdade de Medicina/ Universidade Federal do Ceará (UPC/FM/UFC), e só foi aberta 4 meses após o envolvimento da última criança (final do acompanhamento da criança), sob o consentimento dos pesquisadores responsáveis.

4.3 Avaliações Clínicas

4.3.1 Avaliação na Entrada

Para toda criança envolvida no estudo, no 1˚dia do protocolo de estudo, era realizado um breve exame físico com a tomada das medidas antropométricas. Nesse mesmo dia, os detalhes do estudo eram cuidadosamente discutidos com os pais ou responsáveis legais, com a leitura do termo de consentimento, aprovado pelo Conselho de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário/Faculdade de Medicina/Universidade Federal do Ceará (COMEPE/FM/UFC), que assinavam consentimento antes de qualquer forma de avaliação relacionada ao estudo.

4.3.2 Avaliação Durante o Estudo - Fases do Protocolo

O protocolo de estudo é mostrado **na Figura 6** e foi composto de quatro fases como se seguem:

FASE 1: 1˚dia do protocolo de estudo

- coleta de dados demográficos (data de nascimento, sexo, endereço), informações sobre amamentação, peso do nascimento; coleta de medidas antropométricas (peso, altura);
- registro de episódios de diarréia no 1˚dia e nas 2 semanas retrospectivas, com classificação da intensidade da diarréia (se presente);
- realização do teste Lactulose:Manitol (ingestão de Lactulose e Manitol coleta de urina durante 5 horas,transporte da amostra para UPC/FM/ UFC);
- coleta de sangue para dosagem de glutamina sérica;
- coleta de amostra de fezes para realização de parasitológico de fezes;
- registro diário dos Eventos Adversos (EAs) e Sérios Eventos Adversos (SEAs) observados durante até 14 dias da suplementação.

FASE 2 : 10˚ (± 4) dia do protocolo de estudo

- coleta de medidas antropométricas;
- realização do teste Lactulose:Manitol;
- registro de EAs e SEAs, notificação de SEAs ao COMEPE/FM/UFC (até 14 dias da ingestão do composto estudado).

FASE 3 : 30˚ (± 7) dia do protocolo de estudo

- coleta de medidas antropométricas;
- registro da presença ou ausência de episódio de diarréia no 30˚ dia e nas 2 semanas retrospectivas,com classificação da intensidade (se presente).

FASE 4 : 120˚ (± 14) dia do protocolo de estudo

- coleta de medidas antropométricas;
- registro de episódios de diarréia no 120˚ dia e nas 2 semanas retrospectivas, com classificação da intensidade (se presente).

No final da **FASE 4,** as medidas de desfecho do estudo, escore *z* (para avaliar estado nutricional) e taxa de excreção urinária de Lactulose:Manitol (para determinar a permeabilidade intestinal) foram calculadas para análise estatística e comparação entre os 2 grupos estudados.

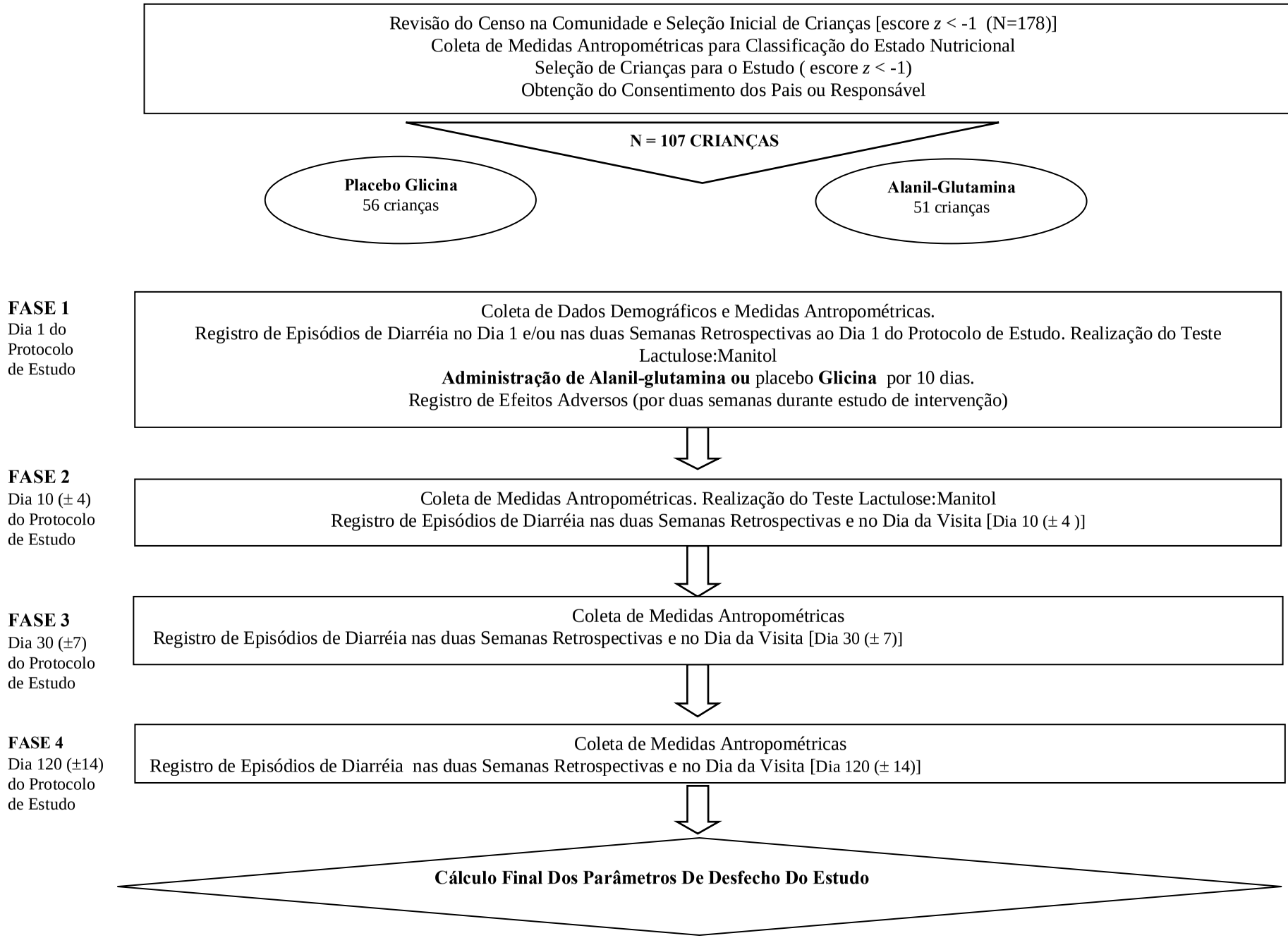


Figura 6. Diagrama fluxonal do protocolo do estudo. Fases 1,2 ,3 e 4 do estudo do protocolo com descrição das atividades desenvolvidas para cada fase do estudo.

4.3.3 Medidas Antropométricas e Avaliação Antropométrica

Para avaliação e classificação do estado nutricional de todas as crianças envolvidas no estudo, as medidas antropométricas (peso e estatura) foram aferidas da seguinte maneira:

Peso. Para aferição da massa corporal, foi utilizada uma balança digital portátil (Tanita Solar Scale, Tanita Corporation of América Inc, Arlington,IL) graduada por 0,100kg. A massa foi arredondada aos 0,100kg mais próximos e as crianças pesadas usando roupas leves e sem calçados.

Estatura. A medida da estatura foi realizada utilizando-se um antropômetro e arredondada ao 0,1cm mais próximo. Para a medição da estatura, as crianças estavam descalças e as menores de 2 anos foram medidas deitadas (aferição do comprimento).

Indicadores antropométricos. As medidas antropométricas eram registradas no formulário do protocolo de estudo e, utilizando-se o software EpiInfo 6.0 (CDC, Atlanta), os indicadores antropométricos: estatura-para-idade, o peso-altura e o peso-idade foram calculados e expressos como escores *z.*

4.4 Coleta e Monitoramento dos Dados

4.4.1 Vigilância Epidemiológica e Coleta de Dados

A vigilância ativa epidemiológica na comunidade do PU é realizada, semanalmente, por uma equipe formada por três agentes de saúde e uma enfermeira coordenadora de campo. As crianças envolvidas no estudo foram visitadas durante o período do ensaio clínico, 2-3 vezes ao dia, por uma das agentes de saúde, para supervisão direta da ingestão do suplemento estudado, registro da quantidade ingerida e de efeitos adversos observados. Caso a criança estivesse dormindo, a agente de saúde retornava em outro horário, para assegurar a ingestão do composto estudado. Não houve intervenção ou visita domiciliar durante os fins de semana ou feriados.

Após o período do ensaio clínico, as visitas foram realizadas no 10°dia do protocolo de estudo (com a tolerância máxima de 14 dias), para tomada de medidas antropométricas (peso e altura) e realização do teste de permeabilidade intestinal; e no 30° dia (com tolerância máxima de 37 dias) e 120° dia (com tolerância máxima de 134 dias) para tomada de medidas antropométricas (peso e altura). Também foi realizado o registro e classificação de episódios de diarréia no dia da visita e nas 2 últimas semanas anteriores ao dia da visita domiciliar. O limite de tolerância máxima, em relação ao dia do protocolo de estudo, foi utilizado para cada fase de estudo em respeito aos feriados e fins de semana, e, no caso da criança não encontrar-se em casa no dia da visita domiciliar realizada pela agente de saúde.

Para cada criança foi preenchido um formulário, contendo dados demográficos (endereço, data do nascimento, sexo), peso ao nascer, informações sobre a duração do aleitamento materno, presença de doença diarréica (no dia da visita e nas 2 semanas retrospectivas ao dia da visita), classificação da diarréia (se presente) quanto à intensidade. No mesmo formulário foram registrados o volume ingerido da solução e os eventos adversos observados para cada dia do ensaio clínico. Dados adicionais para análise de desfechos finais, como o volume de urina coletado (para teste da permeabilidade intestinal no 1° e 10° dia), peso e altura nos 1°, 10° (± 4), 30° (± 7) e 120° (±14) dias do ensaio clínico, também foram registrados no mesmo formulário (**Anexo 1**).

4.4.2 Monitoramento e Duração da Coleta de Dados

Para todas as crianças envolvidas no estudo, o período de coleta de dados teve a duração de 4 meses após o período de 10 dias de suplementação.

A equipe de vigilância epidemiológica se reunia semanalmente, os dados sobre os novos casos eram relatados e os eventos adversos, registrados em protocolo padrão (**Anexo 2**).

Os formulários das crianças foram reavaliados semanalmente, para averiguação da fidedignidade dos dados que foi baseada nos critérios de exatidão, integralidade e legibilidade dos dados coletados.

Os dados coletados foram armazenados, utilizando-se uma planilha simples do Programa Excel (Microsoft Corporation, New York, NY), com entrada dupla e independente, no computador do Serviço de Gerenciamento de Dados da UPC/FM/UFC, Fortaleza,CE.

4.4.3 Monitoramento dos Eventos Adversos (EAs)

Qualquer EA (por exemplo, dores abdominais, náuseas, vômitos, diarréia ou distensão abdominal) foi registrado em formulário apropriado, com a indicação de natureza, início, término, gravidade e a relação com o suplemento utilizado e a intervenção realizada para o evento observado (**Anexo 2**).

O registro, classificação e notificação dos Sérios Eventos Adversos ao COMEPE foram realizados em formulários específicos **(Anexos 3 e 4)** como descritos na Seção 4.6.2 (p. 56).

4.5 Avaliações Laboratoriais

Para cada criança envolvida no estudo, foram realizadas as seguintes avaliações laboratoriais:

4.5.1 Cromatografia Líquida de Alta Performance para Determinação de Monossacarídeos e Dissacarídeos.

Os açúcares manitol, melibiose e lactulose foram comprados da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO) e utilizados como açúcares-padrões para análise em cromatografia líquida de alta *performance* com detecção amperométrica (HPLC-PAD). O hidróxido de sódio 50% (v/v) foi utilizado como eluente para coluna de cromatografia. O sistema analisador de carbohidrato BioLC HPLC, a que foi

adicionado o módulo de bomba gradiente GPM-2, o módulo eluente de gás EDM-II e o detector pulsátil amperométrico PAD-II com eletrodos de ouro foram adquiridos da Dionex (Sunnyvale, CA). A coluna de troca-aniônica CarboPac MA-I (250 mm x 4.0 mm diâmetro interno de resina pelicular) com o módulo de proteção foi também adquirida da Dionex. As injeções foram realizadas automaticamente com o módulo AutoSampler da Dionex.

O método utilizado para dosagens de manitol, melibiose e lactulose foi previamente validado por Barboza Júnior et al. (1999), no Laboratório de Doenças Infecciosas da Unidade de Pesquisas Clínicas & Instituto de Biomedicina, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará. Em resumo, a eluição dos açúcares foi realizada usando eluente isocrático (concentração constante) de hidróxido de sódio (480 mM) com o fluxo de 0,4 ml/min. A temperatura da coluna foi a do ambiente no laboratório. A determinação dos açúcares foi conduzida com detector amperométrico com o seguinte padrão de potencial de duração: 0,15 v, 720 ms; oxidação 0,70 v, 120 ms; redução -0,30 v, 360 ms. A variação de saída do detector foi ajustada para 1,0 mA, com tempo de resposta para integração de 3s. Cinqüenta microlitros de cada amostra foram injetadas automaticamente. A quantificação das amostras foi realizada utilizando o sistema de dados BioAutoIon 450 (Dionex).

As amostras de urina (50 microlitros) para dosagens foram diluídas em 50 microlitros de uma solução contendo melibiose (padrão interno; 3,6 mM) e adicionada de água bidestilada e deionizada no volume de 2,9 ml. Após filtração (0,22 mícron), 50 microlitros foram utilizados para dosagem no HPLC-PAD.

4.5.2 Teste de Permeabilidade Intestinal

Para realização do teste de permeabilidade intestinal**,** uma amostra de urina foi coletada nos 1° e 10° dias (±4) do protocolo do estudo.

O teste de permeabilidade intestinal (**Figura 7**) foi realizado em jejum de pelo menos três horas, no início da manhã, nas crianças do estudo. Crianças até 10 kg tomaram 2 mL por kg de peso e, acima desse peso, ingeriram 20 mL de uma solução contendo 5g de lactulose e 1g de manitol. A urina foi coletada por cinco

horas em recipiente contendo 1 mL de clorhexidina (40 mg/mL). O volume total de urina foi anotado e uma amostra de 5 mL foi estocada a -20 °C, para posterior dosagem de lactulose e manitol pelo método de HPLC-PAD descrito anteriormente.

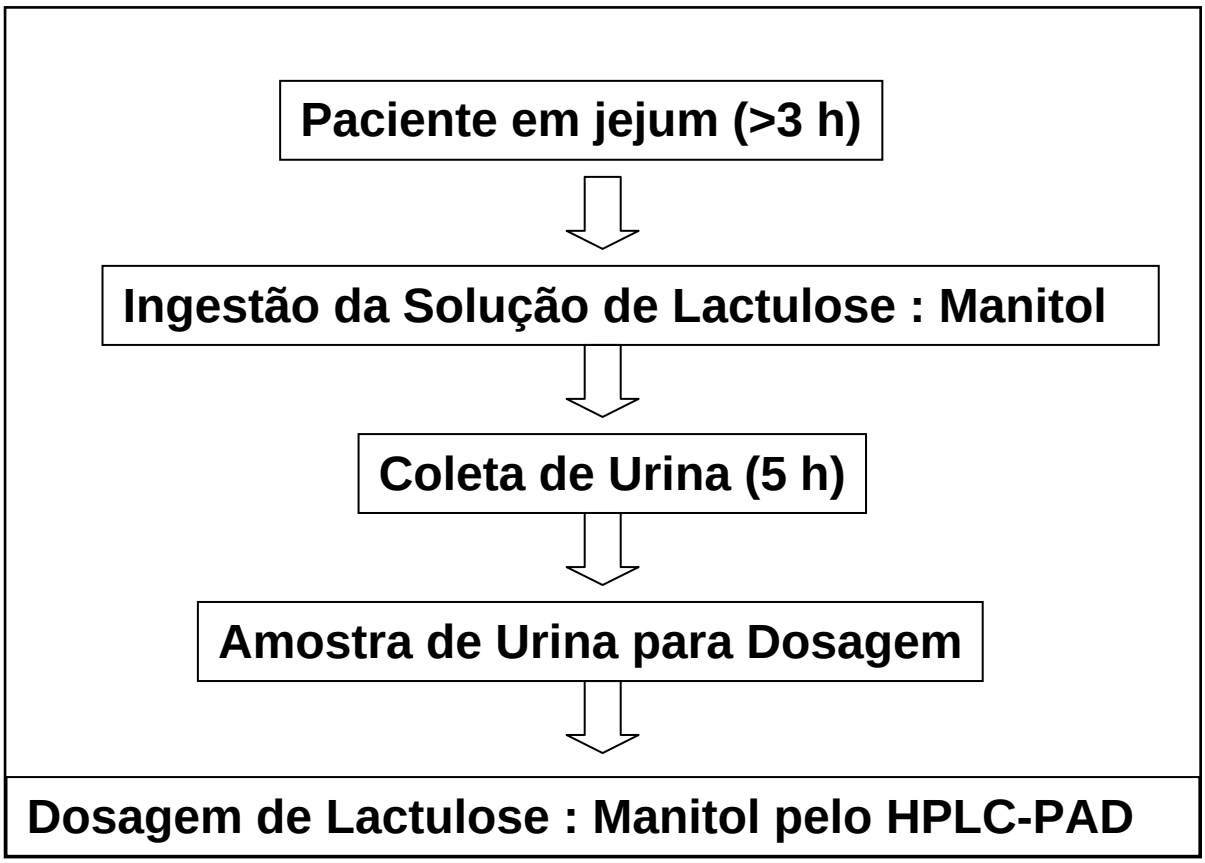


Figura 7 – **Teste de permeabilidade intestinal**. O teste foi realizado nas crianças em jejum de mais de três horas, que ingeriram uma solução com 5g de lactulose, 1g de manitol e 20 mL de água potável. Crianças abaixo até 10 kg ingeriram 2 mL/ kg. A urina foi coletada por cinco horas, o volume total medido e uma amostra de 5 mL foi utilizada para dosagem de lactulose e manitol, pelo método de cromatografia líquida de alta performance com detecção amperométrica pulsátil (HPLC-PAD).

O manitol foi adquirido da HenriFarma Produtos Químicos e Farmacêuticos, Ltda., S. Paulo, SP e a lactulose (Lactulona) da Luitpold Produtos Farmacêuticos Ltda., Barueri, SP. A clorhexidina foi adquirida da Sigma Co. (St. Louis, MO).

4.5.3 Cromatografia Líquida de Alta Performance para Determinação de Glutamina.

Por motivos de custos, uma amostra de sangue de quarenta e quatro crianças envolvidas no protocolo do estudo foi coletada para determinação dos níveis séricos de glutamina no 1°dia do protocolo do estudo. O método para dosagens de glutamina foi o mesmo utilizado por Bidlingmeyer et al. (BIDLINGMEYER, COHEN E TARVIN 1984). Em resumo, as dosagens de glutamina foram realizadas a partir das amostras de sangue das crianças que participaram do protocolo do estudo. Uma alíquota de 200 microlitros de soro foi misturada inicialmente com 200 microlitros do ácido tricloroacético (6 N), agitada até completa emulsão e, em seguida, centrifugada a 3.000 rpm por 10 minutos. Uma amostra de 100 microlitros de cada sobrenadante e do padrão de fenilalanina (Sigma-Aldrich, St. Louis MO) foi secada a vácuo. Em seguida, foram adicionados em cada tubo 10 microlitros de uma solução, contendo metanol:água:trietilamina (2:2:1), e secados a vácuo. Nestas amostras foram adicionados 20 microlitros de outra solução contendo metanol:água:trietilamina:PITC (7:1:1:1) e incubadas por 20 minutos, na temperatura ambiente, e depois secado a vácuo. Estas amostras foram diluídas em 100 microlitros de salina fosfatada, centrifugadas a 3.000 rpm por 10 minutos e, em seguida, uma alíquota de 10 microlitros injetada no cromatógrafo líquido de alta *performance* de fase reversa (Waters system 2690 Alianca com detector de UV-486; Millford, MA). A leitura das amostras foi realizada no detector de luz ultravioleta a 254 nanometros.

4.5.4 Parasitológico de fezes

Uma amostra de fezes de noventa e duas crianças envolvidas no estudo foram coletadas para estudo parasitológico no 1° dia do protocolo do estudo. As amostras foram transportadas para processamento do exame parasitológico simples de fezes pelo método tradicional (BROWN e NEVA,1983), no laboratório da UPC/FM/UFC. Por essa técnica, uma gota das fezes líquidas ou uma mistura de 1:1 das fezes sólidas com solução salina foi misturada numa lâmina com 1 gota de Lugol e examinada entre lâmina e lamínula, sendo então examinada sob microscópio óptico, inicialmente sob aumento de 10X para identificação de helmintos e, uma segunda vez, com aumento de 40X para identificação de protozoários. Para

detecção de *Cryptosporidium parvum,* foi utilizada uma lâmina fluoro, previamente fixada com metanol, a qual foi corada pelo método álcool-ácido modificado (BROWN e NEVA,1983).

As amostras de fezes foram estocadas em conservante (formol 10%) e também no *freezer* para posterior concentração. O procedimento de concentração das fezes é utilizado para melhorar a sensibilidade do exame direto para parasitas intestinais, através da concentração dos ovos e larvas de helmintos e cistos de protozoários e oocistos de *Cryptosporidium parvum.* Foi utilizado o *kit* FPC (Fecal Parasite Concentrator; Evergreen Scientific, Los Angeles, Califórnia), uma modificação do método de concentração de Ritchie (PERRY, 1990) que utiliza éter-formalina. O *kit* é um sistema fechado onde as fezes são concentradas, usando-se acetato de etil-formalina e centrifugadas. Com o sedimento obtido nesse processo, duas lâminas foram preparadas: uma do tipo fluoro, que foi então corada conforme o procedimento descrito para pesquisa de *Cryptosporidium,* e outra lâmina comum, preparada e lida conforme descrito para pesquisa de ovos de helmintos e cistos de protozoários (BROWN e NEVA,1983).

4.6 Considerações Éticas

4.6.1 Formulário de Informação e Termo de Consentimento

Os formulários do estudo e o termo de consentimento foram revisados e aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina (**Anexo 5**). Os pais ou responsáveis legais forneceram um consentimento por escrito, que descrevia a finalidade do estudo, os procedimentos a serem realizados com a criança durante todo o período de estudo (4 meses), os riscos e benefícios da participação. Os pais ou responsáveis legais receberam uma cópia do formulário de consentimento (**Anexo 6**).

4.6.2 Registro e Notificação dos Eventos Adversos

Para definir e classificar os Eventos Adversos observados durante o período de estudo foram seguidas as recomendações do National Institute of Health,

Estados Unidos da América (NIH /EUA), que define como EA toda e qualquer ocorrência médica indesejada em um paciente ou sujeito envolvido em uma investigação clínica de produto farmacêutico que esteja relacionada ao tratamento do estudo (ICTDR Investigator Manual, 2000). Um EA pode, portanto, ser qualquer sinal, sintoma ou doença indesejável (incluindo os achados laboratoriais anormais), temporariamente associada com o uso de produtos medicinais (sob investigação).

Sério Evento Adverso (SEA). Um Sério Evento Adverso (SEA) é definido como qualquer EA que tenha como conseqüência um dos itens seguintes: 1) morte; 2) hospitalização; 3) seqüelas incapacitantes; 4) eventos julgados pelos pesquisadores como sérios, por terem risco iminente de morte ou incapacidade.

Todos os EAs observados foram registrados em formulário próprio (**Anexo 3**) e classificados como esperados/ não esperados; relacionados ou não ao suplemento estudado e, quando classificados como SEAs, foram notificados, no intervalo máximo de 7 dias após o início do evento, ao COMEPE/FM/UFC, em formulário específico (**Anexo 4**).

4.6.3. Confidenciabilidade dos Dados

Todos os dados foram mantidos em local seguro no Serviço de Gerenciamento de Dados da Unidade de Pesquisas Clinicas da UFC. Todos os lançamentos informatizados e trabalhos de rede foram realizados, utilizando-se números codificados, e não houve necessidade de liberação de informações clínicas.

4.7 Considerações Estatísticas

4.7.1 Cálculo do Tamanho da Amostra

As alterações nos logarítmos da taxa de excreção urinária de Lactulose:Manitol foram selecionadas como desfecho primário por serem dados

objetivos e refletirem a função de barreira e a área de superfície de absorção intestinais.

Estimou-se que mais de quinhentas crianças teriam menos de 8 anos de idade e, pelo menos, 250 (50%) estariam aptas, isto é, teriam escores *z* menores do que a mediana do escore *z* de altura-por-idade. Este número de crianças satisfaria o objetivo do trabalho de possuir cinqüenta e duas crianças por grupo (total de 104), o qual foi calculado da seguinte maneira:

$$n = \frac{(u + v)^2 (sd_1^2 + sd_2^2)}{(\mu_1 - (\mu_2)^2}$$

onde

n = número de indivíduos para cada grupo

sd = desvio padrão do logaritmo da razão Lactulose:Manitol em crianças dos nossos estudos anteriores.

$\mu_1 - \mu_2$ = diferença esperada entre as médias dos grupos estudados

u = ponto percentual colateral da distribuição normal correspondente a 100% - de poder do teste, ex.: neste caso o poder = 90%, u = 1,28

v = ponto percentual da distribuição normal correspondente ao nível de significância bi-lateral (neste caso, o nível de significância = 5 %, v = 1,96).

Baseados em dados de estudos preliminares do grupo de pesquisa da UPC/FM/UFC, utilizando-se glutamina, esperava-se que as crianças suplementadas com alanil-glutamina manteriam a taxa do logaritmo de Lactulose:Manitol (0,03 $\pm$ 0,60) e que a diferença entre os grupos estudados seria ainda maior com a utilização de alanil-glutamina e com o maior tempo de utilização que no estudo anterior. Portanto, a amostra de quarenta e oito crianças em cada grupo seria suficiente para detectar-se uma diferença no logaritmo da taxa de Lactulose: Manitol de 0.35 com 80% de poder para detectar uma redução com nível de significância estatística de $p \leq 0,05$, entre os grupos estudados, porém, como era esperado uma perda/desistência de 10% das crianças envolvidas, decidiu-se pela inclusão de cinqüenta e quatro crianças em cada grupo (Total = 108) como mostra a Tabela 4.

Para elaboração dos cálculos, foi considerado como **desfecho primário** a alteração na taxa de Lactulose:Manitol após 10 dias de alanil-glutamina ou glicina**.**

Como **desfecho secundário,** o ganho de peso durante os 10 dias de tratamento com alanil-glutamina ou glicina e após 30 e 120 dias do término do ensaio clínico.

Tabela 4 – Grupos aleatórios para a suplementação de alanil-glutamina em crianças residentes na comunidade do Parque Universitário do Pici.

Grupos	**A (N = 54)**	**B (N = 54)**
Substância	Glicina *(25g + 50mL de leite integral)	Alanil-glutamina (24,1g + 50 mL de leite integral)

* Controle: glicina, isonitrogênica, similar em sabor e aparência à alanil-glutamina. N significa o tamanho da amostra.

3.7.2 Análise Estatística

Os dados coletados tiveram entrada e digitação duplas realizadas por duas pessoas diferentes. O Programa Access (Microsoft Corporation, New York, NY) foi utilizado para validação dos dados. O cálculo de parâmetros como o teste de permeabilidade intestinal foi realizado utilizando-se o Programa Excel (Microsoft Corporation, New York, NY). Para os cálculos dos escores z para estatura-para-idade, peso-para-idade e peso-para-estatura, foi utilizado o programa EpiInfo versão 6.0 (Center for Diseases Control, Atlanta, GA).

A análise estatística foi realizada utilizando-se o Statistical Package for Social Sciences versão 11.0 (SPSS Inc., Chicago, IL). As tabelas e gráficos foram realizados utilizando-se o software GraphPad Prism versão 3.0 (GraphPad Software, San Diego, CA). Para mapear cada criança residente na comunidade do Parque Universitário do Pici envolvida no estudo, foi utilizado o software ArcGIS versão 9.0 (ESRI Co., Redlands, CA).

Para examinar mudanças ocorridas nos dados antropométricos ao longo das fases de estudo em cada grupo estudado, foram utilizados os testes não pareados t de Student. Foi realizada análise de covariância para alterações cumulativas no escore z dos indicadores antropométricos. O teste do qui-quadrado ou teste exato de Fisher foram utilizados para dados não paramétricos e para

comparações das proporções dos eventos adversos observados entre os grupos estudados.

Os resultados obtidos da taxa urinária de Lactulose:Manitol em ambos os grupos foram transformados em logaritmo e submetidos à análise estatística, aplicando-se o teste *t* de Student. Valores de $p \leq 0,05$ foram considerados significantes.

RESULTADOS

4. RESULTADOS

Cento e setenta e oito crianças foram selecionadas, usando o censo comunitário e escore *z* < -1 para um dos indicadores antropométricos (P/I, E/I, P/E). Após a assinatura do consentimento, pelos pais ou responsável, foram selecionadas 107 crianças que foram randomizadas em 2 grupos de estudo: alanil-glutamina (51 crianças) e glicina (56 crianças). O período do seguimento total e o motivo da saída dessas crianças são mostrados na **Figura 8**.

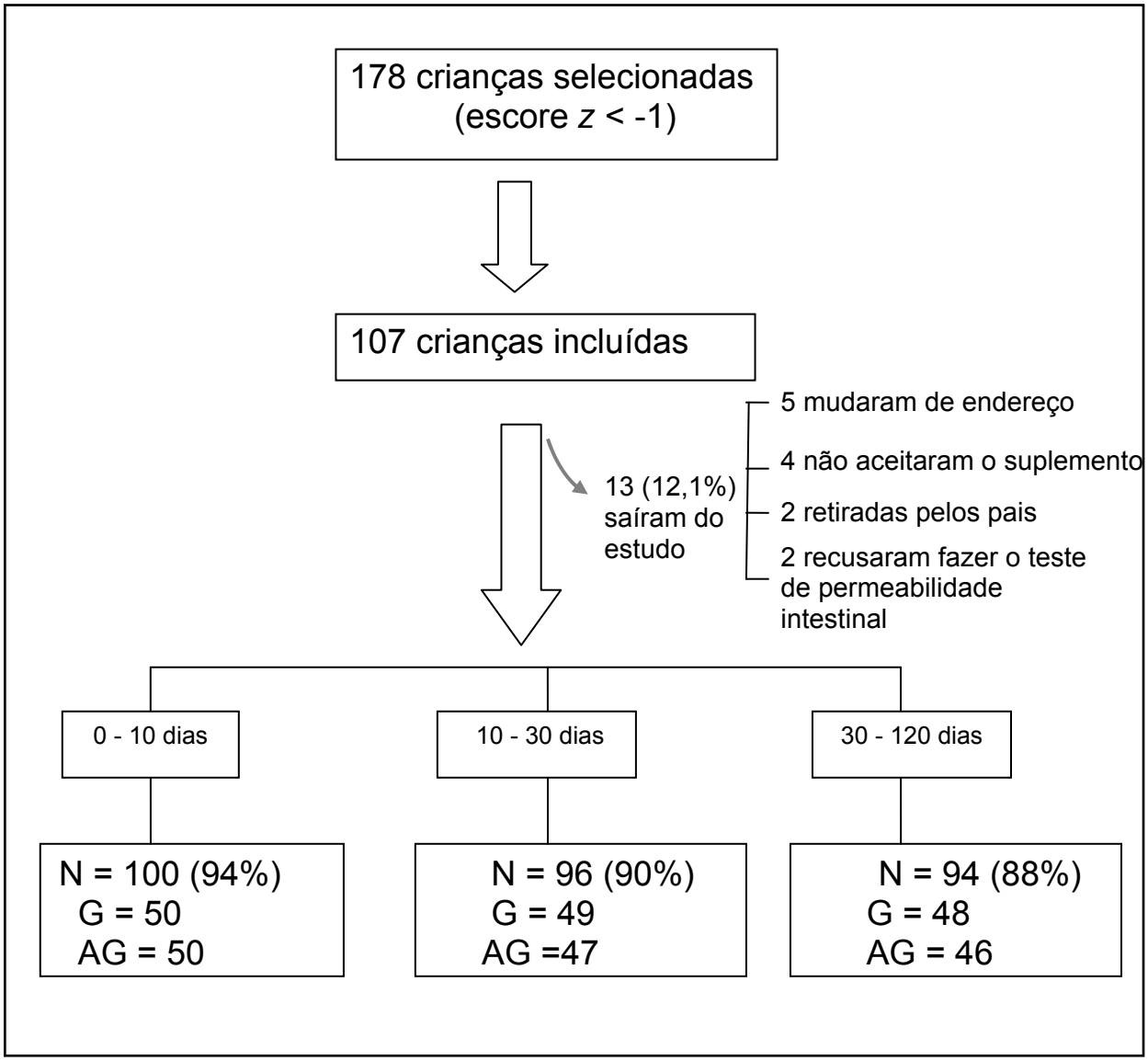


Figura 8. Diagrama do número de crianças selecionadas e incluídas no ensaio clínico segundo os dias de estudo. G= glicina; AG= alanil-glutamina.

No final do 10° (+ 4) dia do protocolo, sete crianças saíram do estudo com a permanência de 100 (94%) crianças incluídas. Ao terminar a segunda fase do estudo (10°- 30° dias), noventa e seis (90%) crianças permaneciam no estudo e, ao final dos 120 dias (+14) do protocolo de estudo, um total de noventa e quatro crianças (88%) permaneciam envolvidas no estudo com uma percentagem de 12% de descontinuação ou saída do estudo. As razões para a saída do estudo antes do tempo esperado foram em ordem de freqüência: mudança de endereço (38,5%), não aceitação da solução de suplementação de micronutrientes, todas do grupo glicina (30,7%), pais ou responsáveis retiraram as crianças por razões particulares, não esclarecidas ao investigador (15,4%), crianças não aceitaram a realização do teste Lactulose:Manitol (15,4%).

As características dos grupos estudados por sexo, idade, peso ao nascimento, estado nutricional, dosagem sérica de glutamina e teste de Lactulose:Manitol estão descritas na **Tabela 5**. No início do estudo, não houve diferença estatística quanto à idade, sexo, peso ao nascimento, estado nutricional (avaliado pelo escore *z)*, dosagem sérica de glutamina e taxa de excreção urinária de Lactulose:Manitol, entre os grupos estudos. Os dois grupos de estudo tiveram no mínimo escore *z* menor que -1 para um dos indicadores antropométricos (peso-para-estatura, estatura-para-idade e peso-para-idade). Em ambos os grupos a média da concentração plasmática de glutamina foi abaixo da variação média normal (N = 0.479 – 0.821 μmol/ml). Os episódios de diarréia não foram comuns nos grupos estudados. No início do protocolo do estudo, somente duas crianças foram identificadas com diarréia (aguda). Durante as outras fases do estudo, só foi detectado um caso de diarréia (aguda) nas duas semanas retrospectivas ao 30° dia do protocolo de estudo.

Tabela 5 – Características das crianças por grupo de estudo segundo a idade, sexo, medidas antropométricas, taxa de Lactulose:Manitol, níveis plasmáticos de glutamina. Julho de 2003 a novembro de 2004.

Parâmetros	Grupo de estudo	
	Placebo **glicina** [a]	**Alanil-glutamina** [b]
	N = 56	**N = 51**
Idade (meses) média ± DP	42,2 ± 18,05	43,1 ± 19,07
Peso ao nascimento (g) média ± DP	3,0 ± 0,5	3,1 ± 0,5
Sexo		
Masculino N (%)	27 (48)	28 (55)
Feminino N (%)	29 (52)	23 (45)
Escore z (média ± DP)[c]		
Peso-para-Estatura	- 0,23 ± 1,089	-0,29 ± 1,297
Estatura-para-Idade	-1,39 ± 1,170	-1,52 ± 0,852
Peso-para-Idade	-1,06 ± 0,887	-1,21 ± 0,878
Diarréia no 1° dia	1 (1,8%)	1 (2,0%)
Taxa de Lactulose: Manitol		
Mediana (variação)	0.0302 (0,0-5,5812)	0.0385 (0,0-0,8922)
Níveis Plasmáticos de Glutamina	N = 23	N = 21
(N= 0,479 – 0,821 μmol/mL)	0,1699 ± 0,0573	0,1814 ± 0,0547

[a] glicina quantidade isonitrogênica (25 g/ dia) oferecida em 50 mL de leite integral por 10 dias, iniciando no 1° dia do protocolo de estudo.

[b] alanil-glutamina (24 g/ dia) oferecida em 50 mL de leite integral por 10 dias, iniciando no 1° dia do protocolo de estudo.

[c] não houve diferença estatística nesses paramêtros quando comparados entre os grupos estudados (p > 0, 05, teste exato de Fisher ou teste t de Student).

A **Tabela 6** resume o percentual da taxa de excreção urinária de lactulose e manitol, e a taxa de Lactulose:Manitol em ambos os grupos. No grupo suplementado com alanil-glutamina, o percentual de excreção urinária de lactulose

diminuiu significantemente entre o 1° e 10° dia (mediana = 0,222 e variação = 4,675 *versus* mediana = 0,082 e variação = 2,550; $p \leq 0,05$). O mesmo ocorreu para o manitol (mediana = 6,156 e variação = 24,735 *versus* mediana = 2,756 e variação = 20,626; $p \leq 0,05$). Não houve alteração na taxa de excreção urinária de lactulose e manitol no grupo suplementado por glicina, e, em ambos os grupos, não houve diferença estatística na taxa de excreção da Lactulose:Manitol.

Tabela 6 – Medidas da permeabilidade intestinal por grupo estudado antes e no décimo dia após a intervenção clínica. Julho de 2003 a novembro de 2004.

Medidas da permeabilidade intestinal	Grupo de estudo	
	Placebo **glicina** [a]	**Alanil-glutamina** [b]
	N = 46	**N = 39**
% Excreção de Lactulose	mediana (variação)	mediana (variação)
Dia 1	0,258 (3,336)	0,222 (4,675)
Dia 10	0,161 (4,107)	0,082 (2,550) [*]
% Excreção de Manitol	mediana (variação)	mediana (variação)
Dia 1	5,378 (26,796)	6,156 (24,735)
Dia 10	4,893 (24,602)	2,756 (20,626) [*]
Taxa de Lactulose:Manitol	mediana (variação)	mediana (variação)
Dia 1	0,0379 (5,581)	0,0423 (0,228)
Dia 10	0,0257 (0,603)	0,0345 (0,533)

[a] Placebo = glicina em quantidade isonitrogênica (25 g/dia) oferecida por via oral em 50 mL de leite integral por 10 dias, iniciando no 1° dia do protocolo do estudo.

[b] Alanil-glutamina (24 g/dia) oferecida em 50 mL de leite integral por 10 dias, iniciando no 1° dia do protocolo do estudo.

[*] $p \leq 0,05$ antes *versus* após tratamento com alanil-glutamina, mas não para glicina, teste *t* de Student pareado após transformação logarítima dos dados.

A **Figura 9** mostra a dispersão da taxa de Lactulose em torno da mediana em ambos os grupos antes e após suplementação.

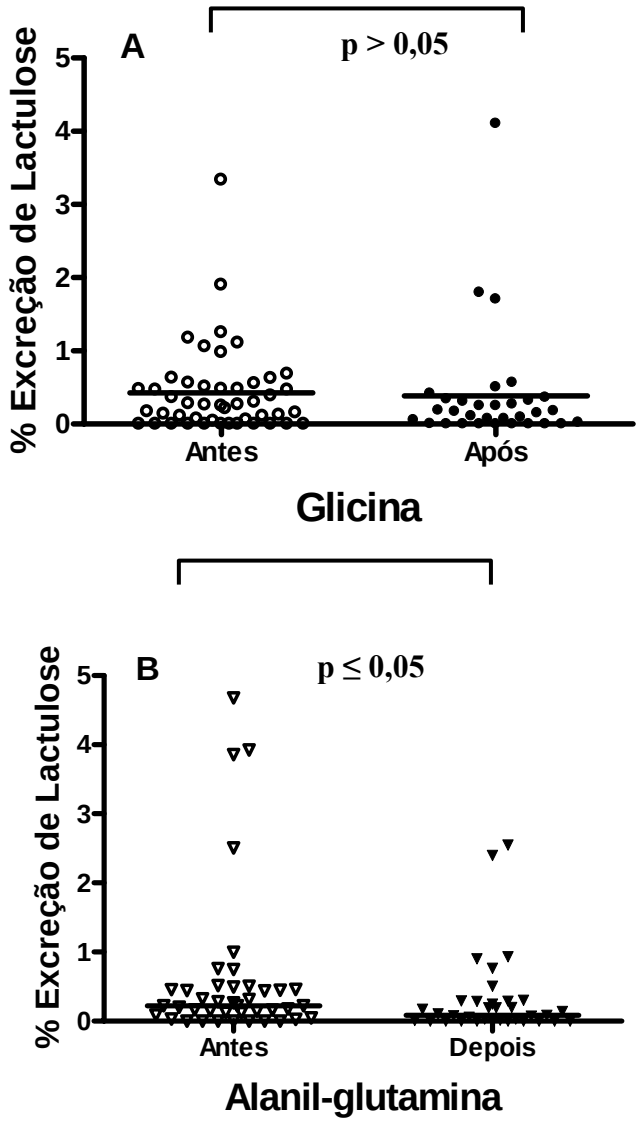


Figura 9. Dispersão do percentual de excreção da lactulose urinária antes e após suplementação com glicina e alanil-glutamina. **Painel A** mostra que não houve alteração significante de excreção em crianças suplementadas com placebo (glicina). **Painel B** mostra uma redução significante da porcentagem de excreção de lactulose em crianças suplementadas com alanil-glultamina. Os dados foram transformados em logaritmos para fornecer uma distribuição normal e, então, analisados usando o teste t de Student pareado. Valores de $p \leq 0,05$ foram considerados significantes.

Os indicadores antropométricos nas diferentes fases do protocolo para os grupos em estudo são mostrados na **Tabela 7.** A média do escore *z* para o indicador peso-para-estatura foi semelhante em ambos os grupos no início do estudo, mas no grupo suplementado com alanil-glutamina, houve uma diferença estatística signifcante ($p \leq 0,05$), ao se comparar essa média nos 30° e 120°dias respectivamente, -0,12 ± 1,342 e 0,04 ± 1,381, com a média do 10° (-0,21 ± 1,328) . Essa diferença não foi observada no grupo suplementado com glicina ($p > 0,05$).

As alterações cumulativas dos escores *z* (medida final menos medida inicial do protocolo de estudo) para os indicadores antropométricos (peso-para-estatura, estatura-para-idade e peso-para-idade), após ajustamento para idade e sazonalidade foram comparadas entre os grupos estudados e são mostradas na **Tabela 8**. As alterações cumulativas foram significativas ($p \leq 0,05$) para peso-para-estatura e peso-para-idade, no grupo alanil-glutamina, quando comparada com o grupo da glicina. A **Figura 10** mostra o efeito cumulativo da alanil-glutamina e da glicina nos indicadores antropométricos, peso-para-altura e peso-para-idade (escores *z)*, nos 1°-120°dias do protocolo de estudo, em ambos os grupos. Essas alterações não foram significativas quando analisadas para o indicador estatura-para-idade em ambos os grupos.

Um total de vinte (19%) Eventos Adversos (EAs) foram observados nas cento e sete crianças envolvidas no estudo, e três (2,8%) desses foram classificados como Sérios Eventos Adversos (SEAs). A distribuição dos EAs e SEAs por grupo estudado é mostrada na **Tabela 9**. A freqüência por ordem decrescente foi vômitos (8,4%), diarréia (2,8%), náusea (1,9%), infecção respiratória (1,9%), escabiose (1,9%), asma (0,9%) epistaxe (0,9%). Os três SEAs observados, 2 eventos de diarréia aguda (uma em cada grupo) e 1 evento de asma (grupo da alanil-glutamina), que exigiram internamento hospitalar, evoluíram sem deixar seqüelas e foram considerados como não relacionados com a ingestão do produto. A proporção de EAs e SEAs entre os grupos estudados não foi significante.

Tabela 7 – **Indicadores antropométricos das 107 crianças por grupo de estudo para cada fase de estudo. Julho de 2003 a novembro de 2004.**

Indicadores antropométricos (Dia do estudo)	Grupos de Estudo			
	Placebo **Glicina**[a]		**Alanil-glutamina**[b]	
		Escore z		**Escore z**
	N	**Média ± DP**	**N**	**Média ± DP**
Peso-para-Estatura				
Dia 1	56	- 0,23 ± 1,089	51	- 0,29 ± 1,297
Dia 10	50	- 0,19 ± 1,084	50	- 0,21 ± 1,328
Dia 30	49	- 0,13 ± 1,141	47	- 0,12 ± 1,342 *
Dia 120	48	- 0,20 ± 1,259	46	- 0,04 ± 1,381 *
Estatura-para-Idade				
Dia 1	56	-1,39 ± 1,170	51	-1,52 ± 0,852
Dia 10	50	-1,33 ± 1,175	50	-1,55 ± 0,882
Dia 30	49	-1,34 ± 1,232	47	-1,55 ± 0,880
Dia 120	48	-1,42 ± 1,309	46	-1,81 ± 0,902
Peso-para-Idade				
Dia 1	56	-1,06 ± 0,887	51	-1,21 ± 0,878
Dia 10	50	- 0,98 ± 0,871	50	-1,17 ± 0,907
Dia 30	49	- 0,96 ± 0,892	47	-1,09 ± 0,904
Dia 120	48	- 1,04 ± 0,825	46	-1,12 ± 0,862

[a] glicina em quantidade isonitrogênica (25 g/ dia) oferecida em 50 mL de leite integral durante 10 dias, iniciando no 1°dia do protocolo de estudo.

[b] alanil-glutamina (24 g/dia) oferecida em 50 mL de leite integral por 10 dias iniciando no 1°dia do protocolo de estudo.

* $p \leq 0,05$ (teste *t* de Student) quando comparado o 10° dia com o 30° ou 120°dia, no grupo alanil-glutamina, mas não significante no grupo glicina.

Tabela 8 – Valores cumulativos dos escores *z* ajustados por idade e sazonalidade durante os 120 dias de acompanhamento das crianças incluídas no estudo. Julho de 2003 a novembro de 2004.

Indicadores Antropométricos	Grupos estudados				
	Placebo **Glicina** [a]		**Alanil-Glutamina** [b]		
	N	**Média do escore *z* ± EPM**	**N**	**Média do escore *z* ± EPM**	***p***
Peso-para-Estatura [c]					
1 – 120 dias	40	0,078 ± 0,077	42	0,298 ± 0,075	0,044
Peso-para-Idade [c]					
1 – 120 dias	40	- 0,094 ± 0,048	42	0,055 ± 0,046	0,029
Estatura-para-Idade[c]					
1 – 120 dias	40	- 0,269 ± 0,051	42	- 0,316 ± 0,049	0,508

[a] Glicina isonitrogênica (25 g/dia) oferecida por via oral dissolvida em 50 ml de leite integral por 10 dias.

[b] Alanil-glutamina (24 g/dia) oferecida por via oral dissolvida em 50 ml de leite integral por 10 dias.

[c] Os dados são mostrados em média do escore *z* ± erro padrão da média (EPM) para alterações cumulativas (medida final menos medida inicial do protocolo de estudo) nos escores *z* dos indicadores antropométricos após ajustamento para idade e sazonalidade. A análise estatística foi realizada utilizando-se o modelo de covariância.

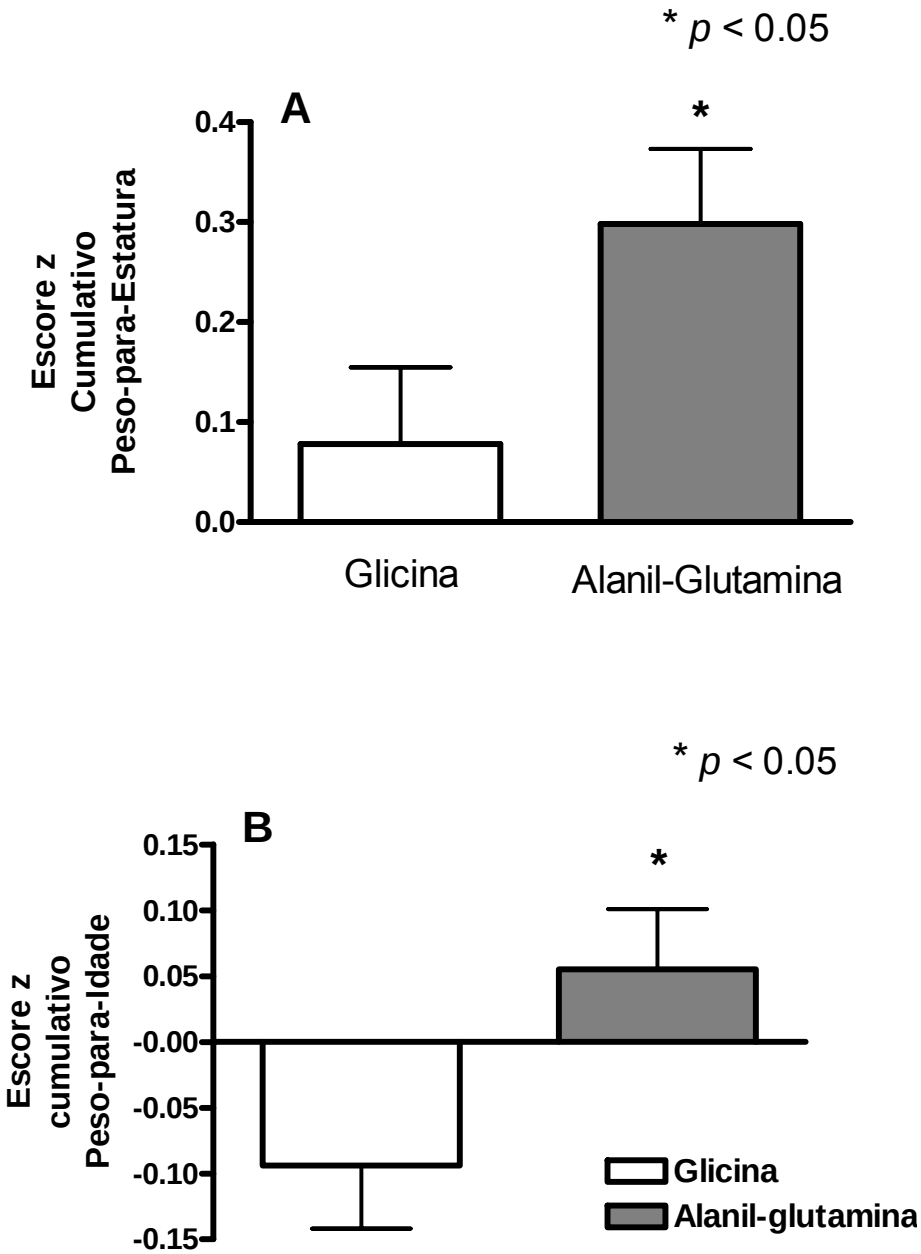


Figura 10. **Efeito cumulativo (1-120 dias) da alanil-glutamina nos indicadores antropométricos peso-para-estatura e peso-para-idade (escores z) Painel A**. Aumento significativo no peso-para-estatura da alanil-glutamina *versus* glicina controle corrigido pela idade e sazonalidade. **Painel B**. Aumento significativo no peso-para-idade da alanil-glutamina versus glicina controle. Os dados são apresentados em média ± erro padrão da média. Utilizou-se a análise de covariância para correção da idade e sazonalidade e o teste *t* não-pareado de Student para comparação entre os grupos estudados.

Tabela 9 – **Eventos Adversos (EAs) e Sérios Eventos Adversos (SEAs) observados por grupo estudado nas 107 crianças envolvidas no estudo. Julho de 2003 a Novembro de 2004.**

Eventos Adversos	Grupos estudados		
	Total de pacientes	**Placebo (glicina)** [a]	**Alanil-glutamina** [b]
	107 (%)	N = 56 (%)	N = 51 (%)
EAs [c]	20 (18,7)	14 (25)	6 (12)
Vômitos	9 (8,4)	9 (16)	0 (0)
Náuseas	2 (1,9)	1 (1,8)	1 (2)
Diarréia	3 (2,8)	2 (3,6)	1 (2)
Infec. respiratória	2 (1,9)	1 (1,8)	1 (2)
Asma	1 (0,9)	0 (0)	1 (2)
Epistaxe	1 (0,9)	0 (0)	1 (2)
Escabiose	2 (1,9)	1 (1,8)	1 (2)
SEAs [c]	3 (2,8)	1 (1,8)	2 (4)
Diarréia	2 (1,9)	1 (1,8)	1 (2)
Asma	1 (0,9)	0 (0)	1 (2)

[a] Placebo glutamina = glicina em quantidade isonitrogênica (25 g/dia) oferecida em leite integral por 10 dias iniciando no 1° do protocolo de estudo.

[b] Alanil-glutamina oral (24 g/dia) oferecida em leite integral por 10 dias iniciando no 1° dia do protocolo de estudo.

[c] Não significante (p > 0,05, qui quadrado, teste exato de Fisher).

Amostra de fezes foram coletadas, dentro de três dias do início do protocolo de estudo, para pesquisa de helmintos e parasitas nas fezes. Todas as amostras foram transportadas em gelo e processadas dentro de 4 horas da coleta por métodos padronizados (LIMA et al., 2005). No final do estudo, foram coletadas fezes de noventa e duas crianças (43 no grupo alanil-glutamina e 49 no grupo glicina) para exames parasitológicos. Seis dessas amostras (7%) eram fezes liquefeitas (4 no grupo alanil-glutamina e 2 no grupo da glicina). Pelo menos um parasita foi encontrado em trinta e sete crianças (40%) e, em nove crianças (10%), dois ou mais parasitas foram encontrados. A **Tabela 10** mostra os parasitas mais encontrados por ordem de freqüência, por grupo estudado: *Ascaris lumbricoides*

(33%), *Trichuris trichiuris (9%)*, *Giardia lamblia (5%)*, *Strongyloides stercoralis (2%)* e *Ancylostoma duodenale (1%)*. Os grupos de tratamento não apresentaram diferenças estatísticas nas freqüências de parasitas intestinais (p > 0,05, qui quadrado).

Tabela 10. Parasitas encontrados nas amostras de fezes de 92 crianças incluídas no estudo. Julho 2003 a novembro 2004.

Parasitas	Grupos estudados [a]	
	Placebo glicina N = 49 (%)	Alanil-glutamina N = 43 (%)
A. lumbricóides	18 (64)	12 (67)
T. trichiuris	5 (18)	3 (16)
S. stercoralis	1 (3,5)	1 (5)
A. duodenale	1 (3,5)	0 (0)
G. lamblia	3 (11)	2 (11)
Total	28 (100)	18 (100)

[a] Os grupos não difererem quanto à freqüência de parasitas intestinais (p> 0,05, qui quadrado ou teste exato de Fisher).

DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

Por várias décadas, tem-se se reconhecido os efeitos da desnutrição na saúde e sobrevivência infantil, incluindo crescimento físico, morbidade, mortalidade, desenvolvimento cognitivo, reprodução, capacidade de trabalho (PELLETIER, FRONGILLO JR. e HABICHT, 1993; POLLITT, 1995; POLLIT et al., 1995; GRANTHAM-MCGREGOR, WALKER e CHANG, 2000; PELLETIER e FRONGILLO 2003; BRYCE et al., 2005). Recentemente existe uma teoria que a desnutrição nos primórdios da vida (gestação e primeiros meses de vida) coloca a criança sob maior risco de desenvolvimento de doenças de aparecimento na idade adulta como hipertensão arterial, doenças coronarianas e obesidade (BARKER e FALL, 1993; PRENTICE e MOORE, 2005).

Desde 1980, medidas interventivas de saúde e nutrição têm sido um componente de órgãos governamentais e não governamentais de alcance nacional e internacional. Medidas amplamente implementadas por vários países em desenvolvimento, como monitorização do crescimento, emprego de solução de rehidratação oral, estímulo à amamentação, campanhas de imunização e intervenção com micronutrientes, têm mostrado sua eficiência em diminuir a morbidade e mortalidade infantil.

A melhora na nutrição infantil é vista por vários países desenvolvidos e agências internacionais como World Bank e UNICEF, como uma estratégia importante para aumentar o capital humano e promover crescimento econômico da nação (MARTORELL, 1996).

YOON et al. (1997) fornecem provas suficientes que prevenir desnutrição é uma estratégia importante para melhorar a sobrevivência infantil. Para MARTORELL (2001), a prevenção de desnutrição também leva à melhora de funções nos sobreviventes, incluindo melhor crescimento, desenvolvimento e cognição (MATORELL, 2001). No entanto, o declínio da prevalência global de desnutrição infantil tem sido muito lento, quase imperceptível (UNICEF, 2006a). Vários autores concordam que a melhora no estado nutricional da população poderia ser um objetivo primário por causa dos efeitos a curto e longo prazo no

desenvolvimento humano e econômico da nação (PELLETIER, 2003; MARTORREL,1996; SCHROEDER e MARTORELL, 1997). Alguns apontam a necessidade de um maior compromisso dos programas de saúde infantil em países subdesenvolvidos na melhora do estado nutricional e, isso segundo sua opinião, não é um desafio muito grande como previamente pensado (SCHROEDER e MARTORELL, 1997).editorial

A alta prevalência de doenças parasitárias e infecciosas em países subdesenvolvidos contribui para a prevalência de desnutrição nesses países (DE ONIS et al,1993; DICKSON et al., 2000). Similarmente, a criança com déficit estatural e com baixo peso não só está sob maior risco de doenças e de morte, como também possui uma maior susceptibilidade à severidade de doenças infecciosas (CAUFIELD et al., 2004). A má nutrição continua sendo apontada como um fator de risco mais importante para o aumento de doenças em países em desenvolvimento (MURRAY e LOPEZ, 1997).

O relatório do UNICEF (2006a) pede com urgência que a nutrição infantil seja um elemento central das políticas públicas e dos orçamentos dos países.

A suplementação de nutrientes durante um tempo adequado em crianças com deficiência desses nutrientes pode reduzir a prevalência da desnutrição e mortalidade de certas infecções em mães e crianças (FILTEAU E TOMKINS, 1999) e esse efeito é significativo mesmo após o controle da situação econômica familiar.

O propósito desse estudo foi determinar o efeito da suplementação da alanil-glutamina por 10 dias na função de barreira intestinal e conseqüentemente no estado nutricional de crianças residentes em uma comunidade urbana carente na cidade de Fortaleza, capital do Ceará. Os dados mostram que alanil-glutamina, mas não o placebo glicina, melhora o estado nutricional infantil, medido pelo indicador antropométrico peso-para-estatura e peso-para-idade comparado com o controle glicina. Por outro lado, o escore *z* do indicador antropométrico estatura-para-idade nessas crianças não foi alterado por alanil-glutamina ou glicina por todo o período de seguimento do estudo. Esse efeito sugere que alanil-glutamina, mas não glicina, melhora o estado nutricional das crianças.

Estudos anteriores mostram a associação entre desnutrição e atrofia das vilosidades intestinais e alterações na função de barreira intestinal (LUNN, NORTHROP-CLEWES e DOWNES, 1991a, 1991b; SULLIVAN, et al., 1992; LUNN, 2000; LIMA et al., 2005). Recentemente, um estudo demonstrou a importância da glutamina no reparo da função de barreira intestinal em crianças desnutridas (LIMA et al., 2005). Os resultados aqui apresentados mostram um efeito consistente com o derivado da glutamina, a alanil-glutamina, na melhora do dano da mucosa intestinal observado em crianças desnutridas. Como a glicina utilizada aqui, como placebo, foi utilizada em quantidade isonitrogênica, os efeitos observados sugerem que são independentes da quantidade de nitrogênio e, provavelmente, dependentes da via metabólica ou dos mecanismos de modulação da glutamina na expressão genética de proteínas envolvidas como via de transdução estimuladas por fatores de crescimento celular (RHOADS et al., 1997; KIM et al. 2005). Mais ainda, o efeito da glutamina no reparo da função de barreira intestinal provavelmente resultou na diminuição da prevalência de emagrecimento observada nessas crianças.

Estudos recentes com glutamina são também consistentes no prognóstico de doenças críticas provavelmente por manterem a barreira fisiológica intestinal e reduzir a freqüência de infecção (DE-SOUZA e GREENE 2005). Em trabalho recente, examinou-se o efeito de uma suplementação padrão para recuperação de desnutridos graves, adicionada de glutamina ou glicina, na permeabilidade intestinal em crianças mal nutridas e admitidas em um hospital infantil de Fortaleza. A taxa de Lactulose:Manitol melhorou significativamente em crianças que receberam glutamina por 10 dias, mas não nas crianças que receberam glicina ou fórmula não enriquecida (LIMA et al., 2005). Outro estudo semelhante, realizado pelo grupo de pesquisadores da UPC/FM/UFC, utilizando alanil-glutamina, glutamina ou glicina, em pacientes com AIDS, mostraram uma melhora significante na diarréia, função de absorção e níveis de droga anti-retroviral em pacientes utilizando alanil-glutamina ou glutamina por 5-10 dias, mas não naqueles utilizando glicina (BUSHEN et al., 2004).

No presente estudo a morbidade por diarréia foi baixa para se poder fazer uma comparação entre os dois grupos. Talvez devido à história de diarréia ter sido feita retrospectivamente no período de duas semanas anteriores à visita, ou por

causa da variação sazonal de diarréia, ou do tamanho pequeno da amostra para detecção de morbidade.

A renovação do epitélio gastrintestinal tem sido estudada mais intensamente em camundongos do que no ser humano. O intestino delgado de um animal adulto tem aproximadamente 10^6 criptas e cada cripta tem uma média de 250-300 células epiteliais (BJERKNES e CHENG, 1999). Todas as células do epitélio de cada cripta são derivadas de poucas células multipotentes localizadas próximo à base da cripta. A regulação e função destas células na dinâmica da renovação do epitélio gastrintestinal continuam ainda obscuras. As células filhas, originadas diretamente destas células multipotentes na cripta, são amplificadas em número através de vários ciclos de rápida divisão celular. Em média estes ciclos duram de 12-16 horas. Através de um processo ainda não conhecido, estas células filhas são diferenciadas ao longo de suas evoluções clonais em quatro tipos celulares diferentes: enterócitos; células caliciformes; células enteroendócrinas; e células de Paneth. Com exceção das células de Paneth, todas as três linhagens de células migram para o topo do vilos. A migração da cripta para o vilus intestinal é completada em 2-5 dias e as células são removidas através de esfoliações e/ou apoptose. As células de Paneth, diferentes dos outros tipos celulares, não migram para o topo do vilos, mas adquirem, no seu processo de diferenciação, a habilidade de produzirem peptídeos com ação antimicrobiana e fatores de crescimento. Elas permanecem residindo na base da cripta por um período relativamente longo, aproximadamente 20 dias, interpondo-se entre células multipotentes, células colunares (enterócitos) primitivas e células diferenciadas de outras linhagens, tais como células caliciformes e enteroendócrinas (CHENG e LEBLOND, 1974).

A manutenção entre o balanço da produção e a perda de células do epitélio gastrintestinal é um desafio constante na dinâmica deste epitélio. O custo energético é enorme: aproximadamente 10^6 células epiteliais (aproximadamente 1 g) são produzidas a cada cinco dias no intestino de um camundongo adulto (POTTEN, 1992). Isto significa que um camundongo adulto de 25g produzirá, em aproximadamente 4 meses, o equivalente à sua massa corpórea. Cada cripta tem um tempo de vida finito, dividindo-se, aproximadamente a cada 110 dias, aparentemente após um período crítico de expansão da sua população de células

epiteliais (TOTAFURNO et al., 1987). Os fatores que definem a regulação na dinâmica deste epitélio são ainda largamente desconhecidos. Muitos pesquisadores estão decididos no desafio de entender como a dinâmica deste epitélio é regulada ao nível da cripta intestinal, apesar da complexidade do sistema de renovação no epitélio intestinal. Entender este processo tem uma importante implicação farmacológica e pode prover estratégias para: (a) promover a recuperação da lesão do epitélio gastrintestinal em condições como desnutrição e doenças diarréicas; (b) promover o reparo quando a barreira epitelial é lesada em decorrência das doenças inflamatórias intestinais; (c) aumentar a área de absorção em pacientes com a síndrome do intestino curto; (d) reduzir a supressão da renovação epitelial em pacientes utilizando quimioterapia ou radioterapia, assim prevenindo e limitando a mucosite resultante de complicações e fator limitante destas intervenções; (e) reduzir lesões pré-cancerosas no epitélio de indivíduos predispostos a este risco.

Alguns artigos têm demonstrado avanços no conhecimento a respeito da dinâmica e regulação do epitélio gastrintestinal. BJERKNES e CHENG (1999) demonstraram que a cripta contém células de vida curta (≤ 10 dias), células de vida longa (≥ 100 dias), progenitoras unipotencial e multipotencial das células caliciformes e enterócitos, bem como células-tronco de longa vida multipotencial. Os autores também demonstraram que estas células progenitoras se dispersam no processo de migração para o topo do vilos, ao invés de permanecerem conectadas. Este fato lançou a luz para a dinâmica e possível co-regulação das zonas de adesão firmes e zonas de aderências intercelulares no epitélio gastrintestinal. Isto também explicou um achado anterior (BJERKNES e CHENG, 1985), no qual demonstrou que 75-80% das novas células caliciformes das criptas no duodeno são encontradas aos pares, ao passo que mais de 80% dessas células encontram-se isoladas no vilus. É possível que a regulação na expressão de E-caderina, uma proteína de junções aderentes, influencie a dissociação das junções intercelulares (HERMISTON, WONG e GORDON, 1996). De fato, o uso de glutamina em cultura de células tem evidenciado a proteção na regulação da expressão de proteínas de junções firmes (ocludina e ZO-1), bem como de proteínas de aderências (E-caderina e beta-catenina) na lesão induzida por acetaldeído (SETH et al., 2004). Recentemente, constatou-se que a família de proteínas denominadas claudinas é de fundamental importância para a barreira funcional intestinal e um dos principais componentes das

junções firmes no epitélio gastrintestinal (VAN ITALLIE e ANDERSON, 2004). As expressões dessas proteínas pelas células do epitélio podem alterar as propriedades do transporte paracelular, tais como a condutância elétrica, a seletividade para cargas elétricas, a discriminação pelo tamanho do soluto e a permeação de solutos apolares. Os achados deste trabalho evidenciam uma redução significativa na permeação ao marcador lactulose com o uso de alanil-glutamina, mas não com o uso de glicina controle, sugerindo também uma maior expressão gênica nas proteínas de junções firmes do epitélio gastrintestinal em crianças nesta comunidade carente em Fortaleza, CE.

A regulação no processo clonal de amplificação das células da cripta intestinal está começando a ser desvendada. O peptídeo, denominado *glucagon-simile 2* (GLP-2) e derivado da proteína pró-glucagon, é um produto de um tipo subcelular do epitélio gastrintestinal e possui a habilidade de estimular o crescimento e reparação desse epitélio BJERKNES e CHENG (2001) demonstraram que a administração de GLP-2 aumenta o número de enterócitos no epitélio gastrintestinal, entretanto esse epitélio não possui a capacidade de expressão do receptor para este peptídeo. Os autores demonstraram ainda que neurônios entéricos sejam capazes de expressar estes receptores, respondem ao GLP-2 e transmitem o sinal, o qual é sensível ao bloqueador de canais de sódio tetrodotoxina, de volta para o epitélio. Assim, o sistema nervoso entérico é o componente chave para a regulação e reparação deste epitélio (BJERKNES e CHENG, 2001). Neste trabalho é desconhecido se a alanil-glutamina, na dose utilizada, tenha suprimido a co-regulação do GLP-2 no epitélio das crianças que participaram deste estudo.

Dois outros fatores de crescimento, tais como, os fatores de crescimento de fibroblastos e R-spondina, foram recentemente avaliados como possíveis agentes para terapia de estímulo para o crescimento epitelial e recuperação do epitélio lesado, decorrente de doenças intestinais (doenças inflamatórias intestinais) ou mucosites resultantes da quimioterapia ou radioterapia (ABRAHAM e CHO, 2005). KIM et al. (2005) observaram que R-spondina induziu uma exagerada expansão da zona de proliferação (mais do que o observado com o fator 7 de crescimento de fibroblasto ou GLP-2), talvez refletindo o estímulo direto de R-spondina na ativação de beta-catenina. Neste trabalho não sabemos também o grau de inibição possível

da alta dose de alanil-glutamina utilizada na expressão da proteína R-spondina ou nos fatores de crescimento de fibroblastos.

Existem vários fatores de crescimento celular que influenciam a renovação do epitélio intestinal, como os fatores de crescimento de fibroblastos, R-spondina-1 e -2, e fator semelhante ao glucagon, o qual a glutamina e seu derivado podem regular, reduzindo a expressão gênica com altas doses (KIM et al., 2005; KAZANSKAYA et al., 2004; GREGORIEFF e CLEVERS, 2005). De fato, dados *in vitro* são consistentes com a proliferação de célula intestinal, dose dependente de glutamina (2-30 mM) e talvez independente do seu efeito no aumento da condutividade tecidual e modulação de proteínas de junções firmes para diminuir a permeabilidade intestinal e a lesão epitelial (BRITO et al., 2005; CARNEIRO et al., 2006). Recentemente, o grupo de pesquisa na UPC tem demonstrado que glutamina, na dose acima de 50 mM, não é capaz de estimular a proliferação de células intestinais em cultura, chegando a reduzir este processo (dados ainda não publicados).

As doses farmacológicas utilizadas em estudos anteriores foram muito mais baixas, aproximadamente de 0,34g/kg/dia do que a utilizada neste estudo (cerca de 1,79g/kg/dia). Essa dose elevada de alanil-glutamina pode ter influenciado a modulação de células pluripotentes no processo de renovação celular, expresso pelo decréscimo no percentual de excreção urinária de manitol, refletindo um decréscimo na área de absorção intestinal, no grupo de crianças suplementadas com alanil-glutamina, mas não observado no grupo suplementado com glicina.

Durante a última década tem havido muito interesse no amino ácido glutamina, particularmente no seu uso clínico potencial para nutrição parenteral e enteral. Atualmente existem muitos trabalhos avaliando a eficácia da glutamina, mas somente alguns trabalhos avaliando os eventos adversos e toxicidade da glutamina e derivados (GARLICK, 2001). A aplicação terapêutica da glutamina ainda é pouco conhecida e novas experimentações clínicas são recomendadas com melhor definições de parâmetros primários e secundários, bem como seus pontos finais de avaliações. Esta limitação se deve aos custos altos das experimentações clínicas de intervenções, bem como o número de horas de trabalho por pessoa e estrutura física

necessárias para a realização das mesmas. Este estudo constitui um dos raros na área, bem como um tipo de experimentação com boa definição de parâmetros e pontos finais de avaliações desses parâmetros.

Uma revisão de SACKS (1999) concluiu que a glutamina é segura, com possível exceção em grupos de pacientes com doenças hepáticas e renais, bem como em pacientes neonatos pré-termos ou idosos. Apesar de um número pequeno de estudos, alguns deles tiveram como objetivo primário a avaliação da segurança no uso clínico de glutamina. Entretanto, nestes estudos de investigação de segurança, os tratamentos foram de curta duração; assim, informações na segurança de longo prazo, maior ou igual a um mês, no uso de glutamina são ainda ausentes. Isto é importante avaliar já que existem grupos de pacientes em terapia nutricional enteral ou parenteral de longa duração. Outro ponto importante, principalmente na avaliação de longa duração na segurança, é o uso indiscriminado da glutamina pela população, por longo período de tempo, sem nenhum acompanhamento por parte de profissionais, como nutricionistas, educadores físicos e médicos.

Nessa discussão foram analisados os dados na literatura referentes aos eventos adversos e toxicidade no uso da glutamina. A pesquisa na literatura resultou em quatro estudos que especificavam a segurança no uso da glutamina. O estudo mais completo neste assunto é o de ZIEGLER et al. (1990), o qual utilizou quatro grupos de pacientes para examinar a segurança da glutamina em diferentes circunstâncias. No primeiro grupo, os autores utilizaram seis voluntários e foi administrada por via oral glutamina em três diferentes doses (0, 0,1, 0,3 g/kg), e monitorizados por 4 h; no segundo grupo, nove voluntários tomaram a glutamina por via endovenosa em três diferentes doses (0, 0,0125, 0,025 g/kg/h) por 4 h; no terceiro grupo, sete voluntários tomaram glutamina em uma solução de nutrição parenteral total em três doses (0, 0,285, 0,570 g/kg/d), durante no mínimo cinco dias; e no quarto grupo, oito pacientes transplantados de medula óssea tomaram glutamina em três doses (0, 0,285, 0,570 g/kg/d) durante 30 +/- 2 dias. A análise farmacocinética foi realizada durante 4 h em três voluntários. No sangue foram analisados glutamina, glutamato, outros amino ácidos, glicose, insulina, glucagon e hormônio do crescimento. Na urina foram analisados creatinina, amônia, uréia e

nitrogênio total. O hemograma completo foi realizado, bem como avaliados o estado mental, sinais vitais, temperatura, sinais e sintomas clínicos de toxicidade. Esse estudo detalhado e com padrão de seguimento no qual a glutamina foi administrada em doses acima de 0,57 g/kg/d (40 g/d), durante 4 h, 30 dias, em voluntários sadios e doentes, não foi capaz de detectar sintomas e sinais clínicos e laboratoriais de eventos adversos ou toxicidade.

Um segundo estudo de toxicidade foi realizado por HORNSBY-LEWIS et al. (1994), os quais examinaram os efeitos da suplementação da glutamina em pacientes sob nutrição parenteral total. Sete pacientes foram randomizados para receberem nutrição parenteral total com o suplemento de glutamina na dose de 0.285 g/kg/dia. Os seguintes exames foram utilizados para monitorar a toxicidade: no sangue foram dosados amônia, bilirubina, uréia, nitrogênio, creatinina, glicose, amino ácidos, hemograma completo, transaminase glutâmico oxaloacético, transaminase glutâmico piruvato, fosfatase alcalina e dehidrogenase do ácido láctico. Nenhum evento adverso ou toxicidade foi atribuído ao uso de glutamina, destacando-se neste estudo a retirada de dois pacientes com elevada concentração de enzimas hepáticas, provavelmente relacionadas com complicações devido ao uso da nutrição parenteral e não devido ao uso de glutamina. Infelizmente neste estudo não houve grupo controle para uma melhor avaliação.

No terceiro estudo de toxicidade ao uso de glutamina, JIANG et al. (1999), em um estudo duplo-cego, randomizado e controlado (n = 120 pacientes no pós-operatório), examinaram a segurança clínica do dipeptídeo alanil-glutamina. O grupo controle recebeu a solução de nutrição parenteral total e o grupo tratado recebeu a solução de nutrição parenteral total isonitrogênica, incluindo a alanil-glutamina na dose de 0,5 g/kg/dia, durante 6 dias. As seguintes medidas foram realizadas no sangue: hemoglobina, contagem total e diferencial de células sangüíneas, plaquetas, glutamina, sódio, potássio, cloreto, transaminase glutâmico piruvato, fosfatase alcalina, glicose, colesterol, uréia, creatinina, bilirrubina, triglicerídios, bicarbonato; volume urinário, balanço nitrogênico e taxa de infecção. A comparação entre o grupo controle e tratado com alanil-glutamina não mostrou nenhuma diferença significativa nos parâmetros de indicação de eventos adversos e toxicidade.

No quarto estudo, LACEY et al (1996), diferentes dos demais acima citados, avaliaram eventos adversos e toxicidade ao uso de glutamina em neonatos pré-termo. Foram observados os efeitos da adição de glutamina na solução de nutrição parenteral na dose equivalente a 0,4 g/kg/dia durante no máximo 15 dias em neonatos pré-termos. A concentração plasmática de glutamina aumentou em 50%, mas glutamato e amônia permaneceram dentro dos limites normais nestes pacientes. Com base nesses achados e na ausência de sinais e sintomas clínicos de eventos adversos e toxicidade, incluindo neurotoxicidade, estes autores concluíram que a glutamina na dose utilizada foi segura em neonatos pré-termos.

A dose elevada de alanil-glutamina utilizada nesse estudo foi segura e bem tolerada pelas crianças com maior risco para desnutrição de residentes em uma comunidade urbana carente, e esses dados são consistentes assim com outros dados previamente publicados (LIMA et al., 2005).

CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

Os resultados sugerem que alanil-glutamina quando utilizada oralmente como suplemento alimentar está associada a uma melhora na barreira de função intestinal, medida por um decréscimo no percentual da taxa de excreção urinária de lactulose.

Estes dados também sugerem que alanil-glutamina, mas não a glicina em quantidade isonitrogênica, estava associada a uma melhora no estado nutricional de crianças (diminuição de emagrecimento), medido pelo escore z para o indicador antropométrico peso-para-estatura e peso-para-idade, sugerindo uma melhora no ganho ponderal em crianças sob risco nutricional residentes em uma comunidade urbana de Fortaleza.

A comparação entre o grupo controle e o grupo tratado com alanil-glutamina não evidenciou sinais e sintomas de eventos adversos e toxicidade relacionados com o suplemento de glutamina na dose utilizada, durante dez dias de tratamento nestes pacientes.

Estudos mais extensivos, em crianças, sob risco nutricional ou desnutridas, menores de 3 anos são necessários para o entendimento da relação entre infecção, inflamação, função de barreira intestinal, crescimento e, especialmente, funções cognitivas de execução e sua melhora com alanil-glutamina.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

ABRAHAM, C.; CHO, J.H. Inducing intestinal growth. N. Engl. J. Med., v.353, n. 21, p. 2297-2299, 2001.

AL DEWACHI, H.S.; WRIGHT, N.A.; APPLETON D.R.; WATSON, A.J. The cell cycle time in the rat jejunal mucosa. Cell Tissue Kinet., v.7, n. 6, p.587-594,1974.

ALLEN, L.H. The nutrition CRSP: what is marginal malnutrition, and does it affect human function? Nutr. Rev., v.51, n. 9, p. 255-267,1993.

ALLEN, L.H. Nutritional influences on linear growth: a general review. Eur. J. Clin. Nutr., v.48, n.1, p. 75S-89S, 1994.

ALLEN LH. Intervention for micronutrient deficiency control in developing countries: past, present and future. J. Nutr.,v.133, p. 3875S-3878S, 2003.

ASKANAZI, J.; CARPENTIER Y.A.; MICHELSEN, C.B.; ELWYN, D.H.; FÜRST, P.; KANTROWITZ, L.R.; GUMP, F.E.; KINNEY, J.M. Muscle and plasma amino acids following injury. Influence of intercurrent infection. Ann. Surg., v.192, n.1, p.78-85, 1980.

BAO, Y.; SILVA, T.M.; GUERRANT, R.L.; LIMA, A.M.; FOX, J.W. Direct analysis of mannitol, lactulose and glucose in urine samples by high-performance anion-exchange chromatography with pulse amperometric detection. Clinical evaluation of intestinal permeability in human immunodeficiency virus infection. J. Chromatogr. B. Biomed. Appl., v.685, n. 1, p.105-112, 1996.

BARBOZA JÚNIOR, M.S.; SILVA T.M.; GUERRANT, R.L.; LIMA, A.A. Measurement of intestinal permeability using mannitol and lactulose in children with diarrheal diseases. Braz. J. Med. Biol. Res., v.32, n.12, p.1499-1504,1999.

BARKER, D.J.; FALL, C.H. Fetal and infant origins of cardiovascular disease. Arch. Dis. Child., v.68, n.6, p.797-799,1993.

BASKERVILLE, A.; HAMBLETON, P.; BENBOUGH, J.E. Pathological features of glutaminase toxicity. Br. J. Exp. Pathol., v.61, n.2, p.132-138,1980.

BEHRENS, R.H.; LUNN, P.G.; NORTHROP, C.A.; HANLON, P.W.; NEALE, G. Factors affecting the integrity of the intestinal mucosa of Gambian children. Am. J. Clin. Nutr., v.45, n.6, p.1433-1441,1987.

BENTLEY, M.E.; CAULFIELD, L.E.; RAM, M.; SANTIZO, M.C.; HURTADO, E.; RIVERA, J.A.; RUEL, M.T.; BROWN, K.H. Zinc supplementation affects the activity patterns of rural Guatemalan infants. J. Nutr., v.127, n.7, p.1333-1338,1997.

BERGSTROM, J.; FÜRST, P.; NOREE, L.O.; VINNARS, E. Intracellular free amino acid concentration in human muscle tissue. J. Appl. Physiol., v.36, n. 6, p.693-697, 1974.

BIDLINGMEYER, B.A.; COHEN, S.A.; TARVIN, T.L. Rapid analysis of amino acids using pre-column derivatization.. J. Chromatogr.,v.336, n. 1, p.93-104,1984.

BJERKNES, M.; CHENG, H. Mucous cells and cell migration in the mouse duodenal epithelium. Anat. Rec., v.212,n.1, p. 69-73,1985.

Bjerknes, M.; Cheng, H. Clonal analysis of mouse intestinal epithelial progenitors. Gastroenterology, v.116, n. 1, p. 7-14, 1999.

BJERKNES, M.; CHENG, H. Modulation of specific intestinal epithelial progenitors by enteric neurons. Proc. Natl. Acad. Sci.,U. S. A., v. 98, n.22, p.12497-502, 2001.

BLACK, R.E.; MORRIS, S.S.; BRYCE, J. Where and why are 10 million children dying every year? Lancet, v.361, n.9376, p. 2226-2234, 2003.

BOELENS, P.G.; HOUDIJK, A.P.; HAARMAN, H.J.; NIJVELDT ,R.J.; MEIJER, S.; VAN LEEUWEN, P.A. Glutamine alimentation in catabolic state. J. Nutr., v.131, p. 2569S-2577S, 2001

BOZA, J.J.; MOENNOZ, D.; BOURNOT, C.E.; BLUM, S.; ZBINDEN, I.; FINOT, P.A.; BALLEVRE, O. Role of glutamine on the de novo purine nucleotide synthesis in Caco-2 cells. Eur. J. Nutr.,v.39, n.1, p. 38-46, 2000.

BRITO, G.A.; CARNEIRO-FILHO, B.; ORIA, R.B.; DESTURA, R.V.; LIMA, A.A.; GUERRANT, R.L. Clostridium difficile toxin A induces intestinal epithelial cell apoptosis and damage: role of Gln and Ala-Gln in toxin A effects. Dig. Dis. Sci., v.50, n.7, p. 1271-1278, 2005a.

Brito, G.A; Alcantara, C; Carneiro-Filho, B.A; Guerrant, R.L. Pathophysiology and impact of enteric bacterial and protozoal infections: new approaches to therapy. Chemotherapy. v.51, n. S1, p. 23S-35S, 2005b.

BROWN, W.H.; NEVA, F.A. Technical diagnostic methods. In: BROWN, W.H.; NEVA, F.A (Eds). Basic Clinical Parasitology. 5. ed. Connecticut.: ACC Norwalk, 1983. cap. 18, p. 315-25.

BRYCE, J.; BOSCHI-PINTO C.; SHIBUYA, K.; BLACK, R.E. WHO estimates of the causes of death in children. Lancet, v.365, n.9465, p. 1147-1152, 2005.

BUSHEN, O.Y.; DAVENPORT J.A.; LIMA, A.B.; PISCITELLI, S.C.; UZGIRIS, A.J.; SILVA, T.M.; LEITE, R.; KOSEK, M.; DILLINGHAM, R.A.; GIRÃO, A.; LIMA, A.A.; GUERRANT, R.L. Diarrhea and reduced levels of antiretroviral drugs: improvement with glutamine or alanyl-glutamine in a randomized controlled trial in northeast Brazil. Clin. Infect. Dis., v.38, n.12, p. 1764-1770, 2004.

CALDER, P.C. YAQOOB, P. Glutamine and the immune system. Amino. Acids, v.17, n.3, p. 227-241,1999.

CAMPBELL, D.I.; ELIA, M.; LUNN, P.G. Growth faltering in rural Gambian infants is associated with impaired small intestinal barrier function, leading to endotoxemia and systemic inflammation. J. Nutr., v.133, n.5, p. 1332-1338,2003.

CARNEIRO-FILHO, B.A.; BUSHEN, O.Y.; BRITO, G.A.; LIMA, A.A.; GUERRANT, R.L. Glutamine analogues as adjunctive therapy for infectious diarrhea. Curr. Infect. Dis. Rep., v.5, n.2, p. 114-119, 2003.

CARNEIRO-FILHO, B.A; FUJII, J.; BRITO, G.A; ALCÂNTARA, C.; ORIA, R.B.; LIMA, A.A.; OBRIG, T.; GUERRANT, R.L. Caspase and bid involvement in Clostridium difficile toxin A-induced apoptosis and modulation of toxin A effects by glutamine and alanyl-glutamine in vivo and in vitro. Infect Immun, v.74, p.81-7, 2006

CAUFIELD, L.E.; de ONIS, M.; BLOSSNER, M.; BLACK, R.E. Undernutrition as an underlying cause of child deaths associated with diarrhea, pneumonia, malaria, and measles. Am. J. Clin. Nutr.,v. 80, n.1, p.193-8, 2004.

CHENG, H.; LEBLOND, C.P. Origin, differentiation and renewal of the four main epithelial cell types in the mouse small intestine. III. Entero-endocrine cells. Am. J. Anat., v.141, n. 4, p. 503-19, 1974.

CURI, R.; LAGRANHA, C.J.; DOI, S.Q.; SELLITTI, D.F.; PROCOPIO, J.; PITHON-CURI T.C.; CORLESS, M.; NEWSHOLME, P. Molecular mechanisms of glutamine action. J. Cell. Physiol., v.204, n.2, p. 392-401, 2005.

DALLAS, M.J.; BOWLING, D.; ROIG, J.C.; AUESTAD, N.; NEU, J. Enteral glutamine supplementation for very-low-birth-weight infants decreases hospital costs. J. Parenter. Enteral Nutr., v.22, n.6, p. 352-356,1998.

DAMODARAN, M.; JAABACK, G.; CHIBNALL, A.C. The isolation of glutamine from an enzymic digest of gliadin. Biochem. J., v.26, p.1704-1713,1932.

DECKER-BAUMANN, C.; BUHL, K.; FROHMULLER, S.; VON HERBAY, A.; DUECK, M.; SCHLAG, P.M. Reduction of chemotherapy-induced side-effects by parenteral glutamine supplementation in patients with metastatic colorectal cancer. Eur. J. Cancer, v.35, n.2, p.202-7,1999.

De-Souza, D.A; Greene, L.J. Intestinal permeability and systemic infections in critically ill patients: effect of glutamine. Crit. Care Med., v.33, p. 1125-1135, 2005.

de Onis, M; Monteiro, C; Akre, J; Glugston, G. The worldwide magnitude of protein-energy malnutrition: an overview from the WHO Global Database on Child Growth. Bull World Health Org.,v.71, p. 703-712, 1993.

DE ONIS, M.; FRONGILLO, E.A; BLÖSSNER, M. Is malnutrition declining? An analysis of changes in levels of child malnutrition since 1980. Bull.World Health Org., v.78, p.1222-33, 2000.

DE ONIS, M.; BLÖSSNER, M. The WHO Global Database on Child Growth and Malnutrition: methodology and applications. Int. J. Epidemiol., v.32, p.518-26, 2003.

Dickson, R; Awasthi, S; Williamson, P; Demellweek, C; Garner, P. Effects of treatment for intestinal helminth infection on growth and cognitive performance in children: systematic review of randomised trials. B.M.J., v.320,n.7251, p.1697-1701, 2000.

DUGGAN, C.; GANNON, J.; WALKER, W.A. Protective nutrients and functional foods for the gastrointestinal tract. Am. J. Clin. Nutr., v.75, n.5, p. 789-808, 2002.

EAGLE, H. Nutrition needs of mammalian cells in tissue culture. Science, v.122, n.3168, p. 501-514, 1955.

Eagle H, Oyama VI, Levy M, Horton CL, Felishman R. The growth response of mammalian cells in tissue culture to L-glutamine and L-glutamic acid.J. Biol. Chem. ,v.218,n.2, p.607-16, 1956.

ELIA, M.; BEHRENS, R.; NORTHROP, C.; WRAIGHT, P.; NEALE, G. Evaluation of mannitol, lactulose and 51Cr-labelled ethylenediaminetetra-acetate as markers of intestinal permeability in man. Clin. Sci., (Lond). v.73, n.2, p.197-20, 1987.

FARQUHAR, M.G.; PALADE, G.E. Junctional complexes in various epithelia. J Cell Biol ., v.17,p. 375-412, 1963.

FERRARIS, R.P.; CAREY H.V. Intestinal transport during fasting and malnutrition. Annu. Rev. Nutr.,v.20, n.195-219, 2000.

Filteau, S.M; Tomkins, A.M. Promoting vitamin A status in low-income countries. Lancet. ,v.353, n.9163, p. 1458-1459, 1999.

FLEMING, S.C.; KAPEMBWA, M.S.; LAKER, M.F.; LEVIN, G.E.; GRIFFIN, G.E. Rapid and simultaneous determination of lactulose and mannitol in urine, by HPLC with pulsed amperometric detection, for use in studies of intestinal permeability. Clin. Chem., v.36, n.5, p. 797-799,1990.

FORD, R.P.; MENZIES I.S.; PHILLIPS A.D.; WALKER-SMITH J.A.;TURNER M.W. Intestinal sugar permeability: relationship to diarrhoeal disease and small bowel morphology. J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr., v.4, n.4, p. 568-574,1985.

FOX, A.D.; KRIPKE, S.A.; de PAULA, J.; BERMAN, J.M.; SETTLE, R.G.; ROMBEAU, J.L. Effect of a glutamine-supplemented enteral diet on methotrexate-induced enterocolitis. J. Parenter. Enteral Nutr.,v.12, n.4, p. 325-331,1988.

FÜRST, P.; POGAN, K.; STEHLE, P. Glutamine dipeptides in clinical nutrition. Nutrition, v.13, n.7-8, p. 731-737, 1997.

Gardner, J.M.; Grantham-McGregor, S.M.; Himes, J.; Chang, S. Behaviour and development of stunted and nonstunted Jamaican children. J. Child. Psychol. Psychiatry, v.40, n.5, p. 819-827, 1999.

GARLICK, P.J. Assessment of the safety of glutamine and other amino acids. **J. Nutr**., v.131, n.9, p. 2556S-61S, 2001.

GARREL, D.; PATENAUDE, J.; NEDELEC, B.; SAMSON, L.; DORAIS, J., CHAMPOUX, J.; D´ELIA, M.; BERNIER, J. Decreased mortality and infectious morbidity in adult burn patients given enteral glutamine supplements: a prospective, controlled, randomized clinical trial. **Crit. Care Med**., v.31, n.10, p.2444-9, 2003.

GASKIN, P.S.; WALKER, S.P.; FORRESTER, T.E.; GRANTHAM-MCGREGOR, S.M. Early linear growth retardation and later blood pressure. **Eur. J. Clin. Nutr**., v.54, p. 563-567, 2000.

GÓMEZ-SANTOS, F. Desnutricion. **Bol. Med. Hosp. Infant. Mex**., v.3, p.543-51,1946.

GOTO, K.; CHEW, F.; TORUN, B.; PEERSON, J.M.; BROWN, K.H. Epidemiology of altered intestinal permeability to lactulose and mannitol in Guatemalan infants. **J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr**., v.28, n.3, p. 282-290,1999.

GRANTHAM-MCGREGOR, S.M.; POWELL, C.; FLETCHER, P. Stunting severe malnutrition and mental development in young children. **Eur. J. Clin. Nutr**., v.43, p. 403-409, 1989.

GRANTHAM-MCGREGOR, S.M.; WALKER, S.P.;CHANG, S. Nutritional deficiencies and later behavioural development. **Proc. Nutr. Soci**.,v. 59, p.47-54, 2000.

GRANT, J.P.; SNYDER, P.J. Use of L-glutamine in total parenteral nutrition. **J. Surg. Res**.,v.44, n. 5, p. 506-513, 1988.

GREGORIEFF, A.; CLEVERS, H. Wnt signaling in the intestinal epithelium: from endoderm to cancer. **Genes. Dev**., v.19, n.8, p.877-90. 2005.

GUERRANT, R.L.; SCHORLING, J.B.; MCAULIFFE, J.F.; de SOUZA, MA. Diarrhea as a cause and an effect of malnutrition: diarrhea prevents catch-up growth and malnutrition increases diarrhea frequency and duration. **Am. J. Trop. Med. Hyg**., v.47, n. 1 Pt 2, p.28-35. 1992.

HAAS, J.D.; MARTINEZ, E.J.; MURDOCH, S.; CONLISK, E.; RIVERA, J.A.; MARTORELL,R. Nutritional supplementation during the preschool years and physical work capacity in adolescent and young adult Guatemalans. **J. Nutr**.,v.125, n.9, p. 1078S-1089S, 1995.

HAUSSINGER, D. Glutamine metabolism in the liver: overview and current concepts. **Metabolism**., v.38, n.8, p.14-7, 1989.

HELTON, W.S.; ROUNDS, J.; WILMORE, D.W. Glutamine prevents pancreatic atrophy and fatty liver during elemental feeding. **J. Surg. Res**., v.48, n. 4, p.297-303, 1990.

HERMISTON, M.L.; WONG, M.H;GORDON, JI. Forced expression of E-cadherin in the mouse intestinal epithelium slows cell migration and provides evidence for non autonomous regulation of cell fate in a self-renewing system. Genes. Dev. ,v.10, n. 8, p. 985-96, 1996.

HLASIWETZ, H.; HABERMANN, J. Ueber die Proteinstoffe. Ann. Chem., v.169, p.150-166, 1873.

HORNSBY-LEWIS, L.; SHIKE, M.; BROWN, P.; KLANG, M.; PEARLSTONE, D.; BRENNAN, M.F. L-glutamine supplementation in home total parenteral nutrition patients: stability, safety, and effects on intestinal absorption. J. Parenter. Enteral Nutr., v.18, n.3, p. 268-73, 1994.

Horvath, K.; Jami, M.; Hill, I.D.; Papadimitriou, J.C.; Magder, L.S.; Chanasongcram, S. Isocaloric glutamine-free diet and the morphology and function of rat small intestine. J. Parenter. Enteral Nutr., v.20,n.2, p. 128-134, 1996.

HOUDIJK, A.P.; NIJVELDT, R.J.; VAN LEEUWEN, P.A. Glutamine-enriched enteral feeding in trauma patients: reduced infectious morbidity is not related to changes in endocrine and metabolic responses.J. Parenter. Enteral Nutr., v. 23,n. 5, p. S52-S58,1999.

Houdijk, A.P.; van Leeuwen, P.A. Glutamine-enriched enteral nutrition in multiple trauma patients. Nutrition, v.16, n. 1, p. 70-71, 2000.

ICTDR -Investigator Manual. Monitoring and Reporting Adverse Events. International Centers for Tropical Disease Research Network, 2002.

ISSLER, R.M.S.; GIUGLIANI, E.R.J. Identificação de grupos mais vulneráveis à desnutrição infantil pela medição do nível de pobreza. J. Pediatr., v.73, n.21, p.101-105, 1997.

JACKSON, W.D.; GRAND, R.J. The human intestinal response to enteral nutrients: a review. J. Am. Coll. Nutr., v.10, n.5, p. 500-509, 1991.

Jacobs, DO; Evans, DA; Mealy, K; O'Dwyer, ST; Smith, RJ; Wilmore, DW. Combined effects of glutamine and epidermal growth factor on the rat. Surgery. v.104. p. 358-364, 1988.

JESCHKE, M.G.; DEBROY, M.A.; WOLF, S.E.; RAJARAMANS, S.; THOMPSON, J.C. Burn and starvation increase programmed cell death in small bowel epithelial cells. Dig. Dis. Sci., v.45, n.2, p. 415-420, 2000.

JOSEPH, KS; KRAMER, M.S Review of the evidence on fetal and early childhood antecedents of adult chronic disease. Epidemiol Rev., v.18, p. 158-74, 1996.

Johnson, L.R. Regulation of gastrointestinal mucosal growth. Physiol. Rev., v.68, p. 456-502, 1998.

JIANG, Z.M.; CAO, J.D.; ZHU, X.G.; ZHAO, W.X.; YU, J.C.; MA, E.L.; WANG, X.R.; ZHU, M.W.; SHU, H.; LIU, Y.W. The impact of alanyl-glutamine on clinical postoperative patients: a randomized double-blind controlled study of 120 patients. **J Parenter Enteral Nutr** , v.23, n. 5 suppl p. S62-S66, 1999.

KATZ, J.; GOLDEN, S.; WALS, P.A. Stimulation of hepatic glycogen synthesis by amino acids. **Proc. Natl. Acad. Sci.,** U. S. A, v.73, n.10, p. 3433-3437, 1976.

KAZANSKAYA, O.; GLINKA, A.; DEL BARCO BARRANTES, I.; STANNEK, P. NIEHRS, C., WU, W. R-Spondin2 is a secreted activator of Wnt/beta-catenin signaling and is required for Xenopus myogenesis **Dev. Cell**., v.7, n. 4, p. 525-34, 2004.

KHAN, K.; ELIA, M. Factors affecting the stability of L-glutamine in solution. **Clin. Nutr**., v.10, n. 4, p. 186-192, 1991.

KIM, KA.; KAKITANI, M.; ZHAO, J.; OSHIMA, T.; TANG, T.; BINNERTS, M.; LIU,Y.; BOYLE, B., PARK, E.,EMTAGE, P.;FUNK, W.D.; TOMIZUKA, K. Mitogenic influence of human R-spondin1 on the intestinal epithelium. **Science**, v. 309, n. 5738, p.1256-9, 2005.

KLIMBERG, V.S.; SALLOUM, R.M.; KASPER, M.; PLUMLEY, D.A.; DOLSON, D.J.; HAUTAMAKI, R.D.; MENDENHALL, W.R.; BOVA, F.C.; BLAND, K.I.; COPELAND, E.M. 3RD, et al..Oral glutamine accelerates healing of the small intestine and improves outcome after whole abdominal radiation. **Arch. Surg**., v.125, n. 8, p. 1040-1045, 1990a.

KLIMBERG, V.S.; SOUBA, W.W.; DOLSON, D.J. MENDENHALL, W.M.;, BAVA, F.J; KHAN, S.R.; HACKETT, R.L.; SALLOUM, R.M.; HAUTAMAKE, R.D.; PLUMLEY, D.A.; MENDENHALL, W.M.; BOVA, F.J.; KHAN, S.R.; HACKETT, R.L.; et al. a. Prophylactic glutamine protects the intestinal mucosa from radiation injury. **Cancer** v. 66, p. 62-68, 1990b.

KREBS, H.A. Metabolism of amino acids IV. The shynthesis of glutamine from glutamic acid and ammonia, and the enzymic hydrolysis of glutamine in animal tissues. **Biochem J** , v.33, p.1951-1969,1935.

LABOW, B.I.; SOUBA, W.W. Glutamine. World J. Surg.v.24,n.12, p.1503-1513, 2000.

LACEY, J.M.; WILMORE, D.W. Is glutamine a conditionally essential amino acid? **Nutr. Rev**., v. 48, n.8, p. 297-309, 1990.

LACEY, J.M.; CROUCH, J.B.; BENFELL, K.; RINGER, S.A.; WILMORE, C.K. MAGUIRE, D.;WILMORE, D.W. The effects of glutamine-supplemented parenteral nutrition in premature infants. **J. Parenter. Enteral. Nutr**., v.20, n.1, p. 74-80, 1996.

LARA, T.M.; JACOBS, D.O. Effect of critical illness and nutritional support on mucosal mass and function. **Clin. Nutr**., v.17, n.3, p. 99-105, 1998.

LIMA, A.A.M. Glutamina e alanil-glutamina: síntese química, efeito no transporte de água, eletrólitos e permeabilidade intestinal, eletrólitos e permeabilidade intestinal. 1998. 238 f. Tese de Titular em Farmacologia - Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Ce, 1998.

LIMA, A.A.; BRITO, L.F.; RIBEIRO, H.B.; MARTINS, M.C.; LUSTOSA, A.P.; ROCHA, E.M.; LIMA, N.L.; MONTE, C.M.; GUERRANT, R.L. Intestinal barrier function and weight gain in malnourished children taking glutamine supplemented enteral formula. **J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr**., v.40, p. 28-35, 2005.

LIMA, A.A.; CARVALHO, G.H.; FIGUEIREDO, A.A.; GIFFONI, A.R.; SOARES, A.M.; SILVA, E.A.; GUERRANT, R.L. Effects of an alanyl-glutamine-based oral rehydration and nutrition therapy solution on electrolyte and water absorption in a rat model of secretory diarrhea induced by cholera toxin. **Nutrition**, v.2, n.18, p. 458-62, 2002.

LIMA, A.A.; FANG, G.; SCHORLING, J.B.; de ALBUQUERQUE, L.; MCAULIFFE, J.F.; MOTA S, LEITE, R.; GUERRANT, R.L. Persistent diarrhea in Northeast Brazil: etiologies and interactions with malnutrition. **Acta Paediatr**., v.81, n.381, p. 39-44. 1992.

LIMA, A.A.; MOORE, S.R.; BARBOZA JÚNIOR, M.S.; SOARES, A.M.; SCHLEUPNER, M.A.; NEWMAN, R.D.; SEARS, C.L.; NATARO, J.P.; FEDORKO, D.P.; WUHIB, T.; SCHORLING, J.B.; GUERRANT, R.L. Persistent diarrhea signals a critical period of increased diarrhea burdens and nutritional shortfalls: a prospective cohort study among children in northeastern Brazil. **J. Infect. Dis**., v.181, n.5, p.1643-1651, 2000.

LIMA, A.A.; SILVA, T.M.; GIFONI, A.M.; BARRETT, L.J.; MCAULIFFE, I.T.; BAO, Y.; FOX, J.W.; FEDORKO, D.P.; GUERRANT, R.L. Mucosal injury and disruption of intestinal barrier function in HIV-infected individuals with and without diarrhea and cryptosporidiosis in northeast Brazil. **Am. J. Gastroenterol**., v.92, n. 10, p.1861-1866, 1997.

LISTER, M.A. Letter. Philos. Trans. R .Soc. (London)v. 8, p. 6060-6065,1673.

LUNN, P.G. The impact of infection and nutrition on gut function and growth in childhood. **Proc. Nutr. Soc**., v.59, n.1, p. 147-154, 2000.

LUNN, P.G.; NORTHROP-CLEWES, C.A; DOWNES, R.M. Chronic diarrhoea and malnutrition in the Gambia studies on intestinal permeability. **Trans. Roya. Soc. Trop. Med. Hygi**.,v. 85, p.8-11, 1991a.

LUNN, P.G.; NORTHROP-CLEWES, C.A.; DOWNES, R.M. Intestinal permeability, mucosal injury, and growth faltering in Gambian infants**. Lancet**, v. 338, n.8772, p. 907-910,1991b.

LUTTER, C.K.; RIVERA, J.A. Nutritional status of infants and young children and characteristics of their diets. **J. Nutr**., v.133, p.S2941-S2949, 2003.

MARTORELL, R.. Conseqüências de longo prazo da subnutrição no desenvolvimento físico e mental, **Anais Nestlé**, v. 61, p.19-30, 2001.

MARTORELL, R. The role of nutrition in economic development. **Nutr. Rev**., v.54, p. S66 -S71,1996.

MCKEEHAN, W.L. Glycolysis, glutaminolysis, and cell proliferation. **Cell. Biol. Int**. Rep. v.6, p. 635-650, 1982.

MEISTER A. Metabolism of glutamine. **Physiol**. v. 36, p. 103-127, 1956.

MENZIES, I.S. Absorption of intact oligosaccharide in health and disease. **Biochem. Soc. Trans.** v.2, p. 1024-1027, 1974.

MENZIES, I.S.; LAKER, M.F.; POUNDER, R.; BULL, J.; HEYER S.; WHEELER, P.G.; CREAMER, B. Abnormal intestinal permeability to sugars in villous atrophy. **Lancet** v.2, n. 8152, p. 1107-1109, 1979.

MONTEIRO, C.A. A dimensão da pobreza, da desnutrição e da fome no Brasil: implicações para políticas públicas. Seminário Especial fome e Pobreza. Rio de janeiro, Setembro, 2003. Estudos e pesquisas n.53, p.1-10. Disponível em: **www.forum** nacional.org.br/publi.

MOORE, S.R.; LIMA, A.A; CONAWAY, M.R..; SCHORLING, J.B.; SOARES, A.M.; GUERRANT, R.L. Early childhood diarrhoea and helminthiases associate with long-term linear growth faltering**. Int.J. Epidemiol**. v.30, n.6 , p.1457-64, 2001.

MÜLLER O, KRAWINKWEL, M. Malnutrition and health in developing countries. **CMAJ** v.173, n.3, p. 279-86, 2005.

MURRAY, C.J; LOPEZ, A.D. Mortality by cause for eight regions of the world: Global Burden of Disease Study. **Lancet**., v. 349, n.9061, p. 1269-1276, 1997.

NATHAVITHARANA, K.A.; LLOYD, D.R.; RAAFAT, F.; BROWN, G.A.; MCNEISH A.S. Urinary mannitol: lactulose excretion ratios and jejunal mucosal structure. **Arch. Dis. Child**, v.63, n.9, p. 1054-1059, 1988.

NATIONAL CENTER OF HEALTH STATISTIC. Growth curves for children birth-18 years: United States Department of Health Education and Welfare, Vital and Health Statistic; Series 11, Nb.165, 1977.

NEU, J.; ROIG, J.C.; MEETZE, W.H.; VEERMAN, M.; CARTER, C.; MILLSAPS, M.; BOWLING, D.; DALLAS, M.J.; SLEASMAN, J.; KNIGHT, T.; AUESTAD, N. Enteral glutamine supplementation for very low birth weight infants decreases morbidity. **J**. **Pediatr.**, v.131, n.5, p. 691-699, 1997.

NEWSHOLME, E.A; CRABTREE, B.; ARDAWI, M.S.. Glutamine metabolism in lymphocytes: its biochemical, physiological and clinical importance. **Q.J. Exp. Physiol.**, v.70, n. 4, p.473-89, 1985a.

NEWSHOLME, E.A; CRABTREE, B.; ARDAWI, M.S. a. The role of high rates of glycolysis and glutamine utilization in rapidly dividing cells. Biosci. Rep.,v.5, n.5, p 393-400, 1985b.

O'Dwyer, ST; Smith, RJ; Hwang, TL; Wilmore, DW. Maintenance of small bowel mucosa with glutamine-enriched parenteral. J. Parenter. Enteral. Nutr., v.13, p. 579-585, 1989.

OPPONG, K.N.; AL MARDINI, H.; THICK, M.; RECORD, C.O. Oral glutamine challenge in cirrhotics pre- and post-liver transplantation: a psychometric and analyzed EEG study. Hepatology, v.26, n.4, p. 870-876, 1997.

Pearson, A.D.J.; Eastham, E.J.; Laker, M.F.; Craft, A.W.; Nelson, R. Intestinal permeability in children with Crohn´s disease and ulcerative colitis. Brit. Med. J., v. 285, p. 20-21, 1982.

PELLETIER, D.L.; FRONGILLO, E.A. Changes in child survival are strongly associated with changes in malnutrition in developing countries J Nutr., v. 133, p.107-119, 2003.

Pelletier, D.L.; Frongillo, E.A.; Habicht, J.P. Epidemiologic evidence for a potentiating effects of malnutrition on child mortality. Am. J. Public. Health., v. 83, p. 1130-1133, 1993.

PELLETIER, D.L.; FRONGILLO, E.A., SCHROEDER, D.G.; HABICHT, J.P. The effects of malnutrition on child mortality in developing countries. Bull. World Health Org., v.73, n.4, p. 443-448, 1995.

PERRY, J.L.; MATTHEWS, J.S.; MILLER, G.R. Parasite detection efficiencies of five stool concentration systems. J. Clin. Microbiol., v. 28, n.6, p.1094-7,1990.

PITTS, R.F. Renal production and excretion of ammonia. Am. J. Med., v. 36, p.720 - 42, 1964.

POLLITT, E.; GORMAN, K.S.; ENGLE, P.L.; RIVERA, J.A.; MARTORELL, R. Nutrition in early life and the fulfillment of intellectual potential. J. Nutr., v.125, n.4, p. 1111S-1118S, 1995.

Potten, C.S. The significance of spontaneous and induced apoptosis in the gastrointestinal tract of mice. Cancer Metastasis Rev., v. 11, p. 179-195, 1992.

Prentice, A.M; Moore, S.E. Early programming of adult diseases in resource poor countries. Arch. Dis. Child., v.90, p. 429-432, 2005.

PUNJABI, N.H.; KUMULA, S.; RASIDI, C.; et al. Glutamine supplemented ORS is superior to standard citrate glucose ORS for maintenance therapy of adult cholera patients in Jakarta (abstract). Am.J. Trop. Med. Hyg., v. 45, p. 114, 1999.

Rampal, P. Total artificial nutrition is associated with major changes in the fecal flora. Eur. J. Nutr., v.39, p. 248-255, 2000.

REID, E.W. Report on experiments upon absorption without osmosis. Br. Med. J., v.i, p. 323-326, 1892.

REITZER, L.J.; WICE, B.M.; KENNELL, D. Evidence that glutamine, not sugar, is the major energy source for cultured HeLa cells. J. Biol. Chem., v.254, n.8, p. 2669-2676, 1979.

RENNIE, M.J. Muscle protein turnover and the wasting due to injury and disease. Br. Med. Bull., v.41, n.3, p. 257-264, 1985.

RIBEIRO JUNIOR, H.; RIBEIRO, T.; MATTOS, A.; PALMEIRA, C.;FERNANDEZ, D.; SANT′ANA, I.; RODRIGUES I.; BENDICHO, M.T.; FONTAINE, O. Treatment of acute diarrhea with oral rehydration solutions containing glutamine. J. Am. Coll. Nutr., v.13, n.3, p. 251-5, 1994.

ROBERFROID, MB. Prebiotics and probiotics: are they functional foods? Am. J. Clin. Nutr.,v. 71, p.:S168-90, 2000.

ROEDIGER, W.E. Famine, fiber, fatty acids, and failed colonic absorption: does fiber fermentation ameliorate diarrhea? J. Parenter. Enteral Nutr, v.18, n.1, p. 4-8, 1994.

ROSE, WC. The nutritive significance of the amino acids. Physiol. Rev., v. 18, p.109-136,1938.

ROSS, B.D.;HEMS, R; KREBS, H.A. The rate of gluconeogenesis from various precursors in the perfused rat liver . Biochem. J., v. 102, p. 942-951, 1967.

Rowbottom, D.G.; Keast, D; Morton, A.R. The emerging role of glutamine as an indicator of exercise stress and overtraining. Sports Med., v. 21, p.80-97, 1996.

Rybolt, A.H.; Laughon, B.E.; Greenough, III W.B.; Bennett, R.G.; Thomas, D.R.; Barlett, J.G. Protein-losing enteropathy associated with Clostridium difficile infection. Lancet , v.i, p. 1353-1355, 1989.

SACKS, G.S. Glutamine supplementation in catabolic patients. Ann. Pharmacol.,v.33, n.3, p. 348-54, 1999.

Sazawal, S.; Bentley, M.; Black, R.E.; Dhingra, P.; George, S.; Bhan, M. Effect of zinc supplementation on observed activity in low socioeconomic Indian preschool children. Pediatrics, v.98, n.6 (Pt 1), p. 1132-1137, 1996.

SCHAERER, E.; NEUTRA, M.R.; KRAEHENBUHL, J.P. Molecular and celular mechanisms involved in transepithelial transport. J. Membr. Biol., v.123, p.93-103, 1991.

SCHEPPACH, W.; LOGES, C.; BARTRAM, P.; CHRISTL, S.U.; RICHTER, F.; DUSEL, G.; STEHLE, P.; FUERST, P.; KASPER, H. Effect of free glutamine and alanyl-glutamine dipeptide on mucosal proliferation of the human ileum and colon. **Gastroenterology**, v.107, n.2, p. 429-34, 1994.

SCHORLING, J.B.; WANKE, C.A.; SCHORLING, S.K.; MCAULIFFE, J.F.; DE SOUZA, M.A.; GUERRANT, R.L. A prospective study of persistent diarrhea among children in an urban Brazilian slum. Patterns of occurrence and etiologic agents. **Am. J. Epidemiol**., v.132, n.1, p. 144-156, 1990.

SCHROEDER, D.G; MARTORELL, R. Enhancing child survival by preventing malnutrition. **Am. J. Clin. Nutr**., v.65, p. 1080-1081, 1997.

SCHULZE, E.; BOSSHARD, E. Ueber das Glutamin. **Landwirtsch Vers Sta**.,v.29, p. 295- 307, 1883.

SCRIMSHAW, N.S.; TAYLOR, C.E.; GORDON, J.E. Interactions of nutrition and infection. **World Health Organ. Monograph Series** v.57, p.3-329, 1968.

SEBOLT, J.S.; WEBER, G. Negative correlation of L-glutamine concentration with proliferation rate in rat hepatomas. **Life Sci**.,v. 34, p. 301-306, 1984.

SETH, A.; BASOURY, S.; SHETH, P.; RAO, R.K. L-Glutamine ameliorates acetaldehyde-induced increase in paracellular permeability in Caco-2 cell monolayer. **Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol**., v.287, n.3, p.G510-G517, 2004.

SHRIMPTON, R.; VICTORA C.G.; dE ONIS, M.;, LIMA, R.C.; BLÖSSNER, M.; CLUGSTON, G. Worldwide timing of growth faltering: Implications for Nutritional interventions **Pediatrics** v.107, n.5.; p. E75, 2001.

SIGULEM, D.M.; DEVINCENZI, M.U.; LESSA, A.C. Diagnóstico do estado nutricional da criança e do adolescente. **J. Pediatr**., v.76, n. 3, p. 275S -284S, 2000.

SMITH, R.J. Glutamine metabolism and its physiologic importance. **J. Parenter. Enteral.Nutr**., v.14, n.4, p. 40S-44S, 1990.

SMITH, R.J.; WILMORE, D.W. Glutamine nutrition and requirements. **J. Parenter. Enteral Nutr**., v. 14, n.4, p. S94-S99, 1990.

SOUBA, W.W. Intestinal glutamine metabolism and nutrition. **J. Nutr. Biochem**., v.4, p.2-9, 1993.

SOUBA, W.W.; HERSKOWITZ, K.; SALLOUM, R.M.; CHEN, M.K.; AUSTGEN, T.R. Gut glutamine metabolism. J. Parenter. Enteral. Nutr. v.14, n. 4, p.45S-50S, 1990.

SOUBA, W.W.; SMITH, R.J.; WILMORE, D.W. Glutamine metabolism by the intestinal tract. **J. Parenter. Enteral Nutr**., v.9, n. 5, p. 608-617, 1985.

SOUBA, W.W., WILMORE, D.W. Postoperative alteration of arteriovenous exchange of amino acids across the gastrointestinal tract. **Surgery** v. 94, n.2, p.342-50, 1983.

STEPHENSEN, C.B. Burden of infection on growth failure. **J Nutr**., v.129, p.S534 - S538, 1999.

STEHLE, P.; ZANDER, J.; MERTES, N.; ALBERS, S.; PUCHSTEIN, C.; LAWIN, P.; FÜRST, P. Effect of parenteral glutamine peptide supplements on muscle glutamine loss and nitrogen balance after major surgery. **Lancet**, v.1, n. 8632, p. 231-233, 1989.

SULLIVAN, P.B.; LUNN, P.G.; NORTHROP-CLEWES, C.; CROWE, P.T.; MARSH, M.N.; NEALE, G. Persistent diarrhea and malnutrition--the impact of treatment on small bowel structure and permeability. **J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr**., v.14, n.2, p. 208-215, 1992.

THOMPSON, A.B.R.; KEELAN, M.; THIESEN, A.; CLANDINI, M.T.; ROPELESKI, M.; WILD, G.E. Small bowel review: diseases of the small intestine. **Dig. Dis. Sci**., v.46, p. 2555-2566, 2001.

TOMKINS, A.M.; WATSON, F.E. In: Malnutrition and infection: a review .Geneva: ACC/SCN, **World Health Org**, 1989.

TOTAFURNO, J.; BJERKNES, M.; CHENG, H. The crypt cycle. Crypt and villus production in the adult intestinal epithelium. **Biophys. J**., v. 52, n.2, p.279-94, 1987.

TRAVIS, S., MENZIES, I. Intestinal permeability: functional assessment and significance. **Clin. Sci**., v.82, p. 471-488, 1992.

UNICEF. Fundo das Nações Unidas para a Infância. Um quarto das crianças, em todo mundo, tem baixo peso. UNICEF. 2006.a; Disponível em: http://www.unicef.org/brazil. Acesso em: 20 de maio de 2006.

UNICEF.Fundo das Nações Unidas para a Infância. Desnutrição ameaça à saúde. Situação da infância brasileira. UNICEF p. 41-48, 2006b. http://www.unicef.org/brazil.

UNICEF.Fundo das Nações Unidas para a Infância. Infância ainda vulnerável. Mortalidade de crianças.Situação da infância brasileira.UNICEF, p.9-16.2006c. http://www.unicef.org/brazil

VAN ITALLIE, C.M.; ANDERSON, J.M. The role of claudins in determining paracellular charge selectivity. Proc. Am. Thorac. Soc. v.1, n.1, p.38-41, 2004.

VESELKOVA, A.; PIACHY, J.; ZEMAN, R. The dipeptide L-alanyl-L-glutamine--its preparation and therapeutic use. **Ceska Slov Farm**. v.45, n.1, p.14-16, 1996.

VICTORA, C.G.; KIRKWOOD, B.R.; ASHWORTH, A.; BLACK, R.E.; ROGERS, S.; SAZAWAL, S.; CAMPBELL, H. Potential interventions for the prevention of childhood pneumonia in developing countries: improving nutrition. **Am. J. Clin. Nutr** v. 70, p 309-20, 1999.

WALKER, S.P.; GRANTHAM-MCGREGOR, S.M.; POWELL, C.A.;, CHANG, S.M. Effects of growth restriction in early childhood on growth, IQ, and cognition at age 11 to 12 years and the benefits of nutritional supplementation and psychosocial stimulation. **J. Pediatr**. v.137, n.1, p. 36-41, 2000.

WALSH, NP; BLANNIN, AK; CLARK, AM; COOK, L; ROBSON, PJ; GLEESON M. The effects of high-intensity intermittent exercise on the plasma concentrations of glutamine and organic acids. **Eur. J. Appl. Physiol. Occup. Physiol**.,v.77, p. 434-438, 1998.

WATERLOW, J.C. Classification and definition of protein-calorie malnutrition. **Br. Med. J**., v.3, n.826, p. 566-569, 1972.

WATERLOW, J.C. Introduction. Causes and mechanisms of linear growth retardation (stunting). **Eur. J. Clin.Nutr**., v. 48 p.:1S 4S, 1994.

WEBER, F.L.; MADDREY, W.C.; WALSER, M. Amino acid metabolism of dog jejunum before and during absorption of keto analogues. **Am. J. Physiol.**, v.232, n.3, p. E 263-9, 1977.

WERNERMAN, J.; HAMMARQVIST, F. Glutamine: a necessary nutrient for the intensive care patient. **Int. J. Colorect. Dis**.,v.14, n.3, p.137-142, 1999.

WINDMUELLER, H.G. Glutamine utilization by the small intestine. **Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol**.,v. 53, p. 201-37, 1982.

WINDMUELLER, H.G.; SPAETH, A.E. Uptake and metabolism of plasma glutamine by the small intestine. **J. Biol .Chem**., v.249, n.16, p. 5070-9, 1974.

WINDMUELLER, H.G.; SPAETH, A.E. Intestinal metabolism of glutamine and glutamate from the lumen as compared to glutamine from blood. **Arch. Biochem. Biophys**., v.171, n.2, p. 662-72, 1975.

WINDMUELLER, H.G.; SPAETH, A.E. Identification of ketone bodies and glutamine as the major respiratory fuels in vivo for postabsorptive rat small intestine. **J. Biol. Chem.** ,v.253, n.1, p. 69-76, 1978.

WINDMUELLER, H.G.; SPAETH, A.E. Respiratory fuels and nitrogen metabolism in vivo in small intestine of fed rats. Quantitative importance of glutamine, glutamate, and aspartate. **J. Biol. Chem**., v. 255, n.1, p.107-12, 1980.

World Health Organization.Program for Control of Diarrhoeal Diseases. WHO Interim Progamme Report. Geneva: **World Health Org**,v.91,p.36, 1990.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Expert Committee on Physical status.The use and interpretation of anthopometry. Geneva; Technical Report Series No. 854, 1995.

World Health Organization. World Health Report. Geneva: The Organization 2002.

WU, G.; KNABE, D.A.; YAN, W., FLYNN, N.E. Glutamine and glucose metabolism in enterocytes of the neonatal pig. **Am. J. Physiol**., v.268, p. R334-42, 1995.

YALÇIN, S.S.; YURDAKOK, K.; TEZCAN, I.; ONER, L. Effect of glutamine supplementation on diarrhea, interleukin-8 and secretory immunoglobulin A in children with acute diarrhea.**J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr**., v. 38,p.494-501, 2004.

YOON, P.W; BLACK, R.E; MOULTON, L.H; BECKER, S. The effect of malnutrition on the risk of diarrheal and respiratory mortality in children <2 y of age in Cebu, Philippines. **Am. J. Clin. Nutr**., v.65, p. 1070-1077, 1997.

ZIEGLER, T.R. Glutamine supplementation in bone marrow transplantation. **Br. J. Nutr**., v.87, n. 1, p. 9 S -15 S, 2002.

ZIEGLER, T.R.; ALMAHFOUZ, A.; PEDRINI, M.T.; SMITH, R.J. A comparison of rat small intestinal insulin and IGF-1 receptors during fast and refeeding. **Endocrinology**. v.136, n. 11, p. 5148-5154, 1995.

ZIEGLER, T.R.; BAZARGAN, N.; LEADER, L.M.; MARTINDALE, R.G. Glutamine and the gastrointestinal tract. **Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care**, v.3, n.5, p.355-362, 2000.

ZIEGLER, T.R.; BENFELL, K.; SMITH, R.J.; YOUNG, L.S.; BROWN, E.; FERRARI-BALIVIERA, E.; LOWE, D.K.; WILMORE, D.W. Safety and metabolic effects of L-glutamine administration in humans. **J Parenter Enteral Nutr**., v.14, n. 4, p. 137S-146S, 1990.

ZIEGLER, T.R.;ESTÍVARIZ, C.F.; JONAS, C.R.;GU, L.H.; JONES, D.P.; LEADER L.M. Interactions between nutrients and peptide growth factors in intestinal growth, repair and function. **J. Parenter. Enteral. Nutr**., v.23, p.174 S -186S, 1999.

ZIEGLER, T.R.; EVANS, M.E.; FERNANDEZ-ESTIVARIZ, C.; JONES, D.P. Trophic and cytoprotective nutrition for intestinal adaptation, mucosal repair, and barrier function. Ann. Rev. Nutr.v.23, n. 229-261, 2003.

ZIEGLER, T.R.; SMITH, R.J.; BYRNE, T.A.; WILMORE, D.W. Potential role of glutamine supplementation in nutrition support. **Clin. Nutr**., v.12, p.S82, 1993.

ZIEGLER, T.R.; YOUNG, L.S.; BENFELL, K.; SCHELTING, A.M.; HORTOS, K.; BYE, R.; MORROW, F.D.; JACOBS, D.O.; SMITH, R.J.; ANTIN, J.H. Clinical and metabolic efficacy of glutamine-supplemented parenteral nutrition after bone marrow transplantation: a randomized, double-bind, controlled study. **Ann. Inter. Med**., v.116, p.821-828, 1992.

ANEXOS

ANEXO 1

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
UNIDADE DE PESQUISAS CLÍNICAS
ENSAIO CLÍNICO COM ALANIL GLUTAMINA E GLICINA
COMUNIDADE DO PARQUE UNIVERSITÁRIO DO PICI

HHMI_ _ _/_ DROGA nº _ _ _

1. DADOS DEMOGRÁFICOS

Nome _____ Sexo : 1. □ Masculino 2. □ Feminino

Data do Nascimento: __/__/__ Peso ao Nascer : __ __ __ __ g

Início do ensaio clínico: __/__/__ Saída do estudo: __/__/__

Início do ensaio clínico: __/__/__ Término do ensaio clínico: __/__/__

Razão da saída do ensaio clínico:

□ 1. término do estudo □ 2. decisão dos pais /responsável

□ 3. mudança de endereço □ 4. morte □ 5. outros (especificar)

_____

2. DADOS NO INÍCIO DO ENSAIO CLÍNICO

Tipo de alimentação: □ 1. aleitamento exclusivo □ 2. aleitamento misto □ não mama

Diarréia hoje : 1. □ SIM 2. □ NÃO

Se SIM, classifique a intensidade da diarréia

1. □ Grau I : 1 de evacuação liquefeita/dia
2. □ Grau II: 2-3 evacuações liquefeitas/dia
3. □ Grau III : ≥ 4 evacuações liquefeitas/dia ou aumento no número de evacuações/ dia
4. □ Grau IV: ≥ 8 evacuações liquefeitas/dia ou aumento acentuado no número de evacuações/ dia

Presença de sangue : 1. □ SIM 2. □ NÃO Duração da diarréia em dias: ____

Diarréia nas últimas 2 semanas: 1. □ SIM 2. □ NÃO Se "sim", duração em dias ___

Intensidade da diarréia

1. □ Grau I : 1 de evacuação liquefeita/dia
2. □ Grau II: 2-3 evacuações liquefeitas/dia
3. □ Grau III : ≥ 4 evacuações liquefeitas/dia ou aumento no número de evacuações/ dia
4. □ Grau IV: ≥ 8 evacuações liquefeitas/dia ou aumento acentuado no número de evacuações/ dia

3. **DADOS DURANTE O ESTUDO (ATÉ DIA 10):**

ATENÇÃO: Qualquer efeito adverso (EA) anotar no formulário próprio

Alanil-glutamina/glic	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4	Dia 5	Dia 6	Dia 7	Dia 8	Dia 9	Dia 10
Ingestão de Suco(ml)										

OBS:_____
_____
_____

4. **DADOS DURANTE O ESTUDO (DIA 30)**

Diarréia nas 2 últimas semanas 1. □ SIM 2. □ NÃO Se "sim", duração em dias ___

1. □ Grau I : 1 de evacuação liquefeita/dia
2. □ Grau II: 2-3 evacuações liquefeitas/dia

3. □ Grau III : ≥ 4 evacuações liquefeitas/dia ou aumento no número de evacuações/ dia
4. □ Grau IV: ≥ 8 evacuações liquefeitas/dia ou aumento acentuado no número de evacuações/ dia

5. **DADOS CLÍNICOS DURANTE O ESTUDO (120 dias)**
Diarréia nas 2 últimas semanas 1. □ SIM 2. □ NÃO Se "sim", duração em dias ___
1. □ Grau I : 1 de evacuação liquefeita/dia
2. □ Grau II: 2-3 evacuações liquefeitas/dia
3. □ Grau III : ≥ 4 evacuações liquefeitas/dia ou aumento no número de evacuações/ dia
4. □ Grau IV: ≥ 8 evacuações liquefeitas/dia ou aumento acentuado no número de evacuações/ dia

6. EXAMES LABORATORIAIS
TESTE DE LACTULOSE /MANITOL

	Data	Hora Inicial	Hora Final	Volume Urinário (ml)
Dia zero	_____	__/__/__	_____	_____
Dia 10	_____	__/__/__	_____	_____

AMOSTRA DE FEZES (antes do ensaio): 1. □ SIM 2. □ NÃO
AMOSTRA DE SANGUE (antes do ensaio) : 1. □ SIM 2. □ NÃO
Taxa de Glutamina : _____

7. SEQÜÊNCIA DE AVALIAÇÃO

	1 DIA	**10 DIAS**	**30 DIAS**	**120 DIAS**
DATA				
PESO				
ALTURA				

OBS:_____
_____
_____
_____

Assinatura: _____ Data: ___/___/___

ANEXO 2

Efeito da alanil-glutamina no estado nutricional e reparação da mucosa intestinal em crianças desnutridas de uma comunidade urbana do nordeste do Brasil

FICHA DE EVENTOS ADVERSOS

1. Número do participante……|___|___|___|___|___|___|
2. Data do contato……..|___|___|/|___|___|/|___|___|___|___|
   dia mês ano
3. 3. Sexo : 1. Masculino 2. Feminino Data do nascimento: |___|___|/|___|___|/|___|___|___|___|

4. Diagnóstico:

5. Evento: _____

6. Data do início do evento adverso:.....|___|___|/|___|___|/|___|___|___|___|
   dia mês ano

7. Relacionado ao produto em estudo?.....|___|
   1=certamente 4=remotamente
   2=provavelmente 5=nenhum ou não relacionado
   3=possivelmente

8. O **EA** foi grave? ***(0=não; 1=sim)***.....|___|
   Em caso afirmativo, complete a ficha de Eventos Adversos Graves .

9. Evento Adverso de maior gravidade durante o estudo.....|___|
   1=leve 4=risco de vida
   2=moderado 5=óbito
   3=grave

9. O EA recebeu tratamento? ***(0=não; 1=sim)***.....|___|
   Em caso afirmativo, descreva o tratamento _____

10. Desfecho do EA.....|___|
    1=resolução sem seqüela
    2=resolução com seqüela → ***especificar seqüela*** _____
    3=EA persistiu até o final do estudo ou até ser descontinuado o estudo
    4=participante morreu em decorrência deste EA
    5=desconhecido, pois o participante não pode ser localizado

11. Data da resolução ou morte.....|___|___|/|___|___|/|___|___|___|___|
    dia mês ano

_____

*** Grave significa**:

- risco de vida ou fatal
- resultou em incapacidade permanente ou temporária
- resultou em hospitalização ou prolongamento da hospitalização
- determinou anomalia congênita num feto
- pôs em risco o participante e requeriu intervenção clínica ou cirúrgica para evitar desfecho grave
- qualquer outro evento que o investigador considere grave

O EA era esperado? |___|
0 = Não
1 = Sim

_____ _____

Iniciais do preenchedor da ficha Data do preenchimento da ficha

☐ Relatório Inicial
☐ Relatório Seqüencial

ANEXO 3

Efeito da alanil-glutamina no estado nutricional e reparação da mucosa intestinal em crianças desnutridas de uma comunidade urbana do nordeste do Brasil

FICHA DE EVENTOS ADVERSOS GRAVES

Nome do local Número do Centro ☐☐☐☐ Número do participante ☐☐ ☐☐ Iniciais do participante ☐☐☐ Data do preenchimento (DD/MM/AAAA) _____/_____/_____

Data de Nascimento: (DD/MMM/AAAA) ____/____/____ Sexo: Masculino ☐ Feminino ☐

Peso: ____ ____ ____ ☐☐ ./ ☐ kg

Indicar a categoria do EAG de acordo com as seguintes opções:

☐ óbito
☐ risco de vida iminente
☐ persistente/significativo
☐ incapacitante
☐ hospitalização
☐ prolongamento de hospitalização
☐ determinou anomalia congênita
☐ grave de acordo com o investigador
☐ toxicidade laboratorial

DADOS DO PRODUTO EM ESTUDO
Complete a tabela abaixo

Nome do produto em estudo (listar 1 produto em estudo para cada linha) Atenção: Se o estudo é cego, indique pelo código	**Dose, Via, Posologia do produto em estudo no início do EAG**	**Data em que o produto em estudo foi administrado pela 1ª vez** DD/MMM/AAAA	**Data em que o produto em estudo foi administrado pela última vez** DD/MMM/AAAA

Evento (palavra chave ou causa do óbito)	***Data do Início*** (DD/MMM/AAAA)	***Gravidade*** (Complete somente uma coluna. Marque só um ítem nesta coluna)		***Correlação*** (ao Produto em estudo)	PROVAVELMENTE ou NÃO RELACIONADO (Complete abaixo)
		☐ Leve	☐ Grau 1	☐ Sem correlação	Evento tem relação c/:
		☐ Moderado	☐ Grau 2	☐ Provavelmente não/Remota	☐ Procedimento do Estudo? Qual _____
		☐ Grave	☐ Grau 3	☐ Possivelmente	☐ Outra doença ou condição? Qual ____
		☐ Risco de vida	☐ Grau 4	☐ Provavelmente	☐ Outra droga? Qual _____
		☐ Grau 5 (Óbito)	☐ Grau 5 (Óbito)	☐ Certamente	

Situação do Produto em Estudo (como resultado do evento descrito acima)	**Situação do participante/ Desfecho**
☐ Foi administrado completamente	☐ Pendente
☐ Continua sendo administrado	☐ Resolvida sem seqüela Data / /
☐ Foi adiado	☐ Resolvida com seqüela Data / /
☐ Ajuste de dose, especificar: _____	☐ Especificar seqüela: _____
☐ Participação interrompida pelo investigador	☐ Óbito Autópsia: ☐ Não realizada
	☐ Realizada (providenciar relatório)
	☐ Planejada
☐ Outra, especificar: _____	☐ Situação desconhecida

☐ Relatório Inicial
☐ Relatório Seqüencial

Efeito da alanil-glutamina no estado nutricional e reparação da mucosa intestinal em crianças desnutridas de uma comunidade urbana do nordeste do Brasil

FICHA DE EVENTOS ADVERSOS GRAVES

Nome do local
Número do Centro ☐☐☐☐

Número do participante ☐☐ ☐☐

Iniciais do participante ☐☐☐

Data do preenchimento (DD/MM/AAAA)
_____/_____/_____

Data de Nascimento: (DD/MMM/AAAA) ____/____/____ Sexo: Masculino ☐ Feminino ☐

Peso: ____ ____ ____ ☐ lb ./ ☐ kg

RESUMO DO EVENTO
Incluir abaixo história clínica do evento, sinais e sintomas associados, outras etiologias levadas em consideração, tratamento médico e antecedentes clínicos relevantes, ou anexar resumo (usas páginas adicionais, se necessário).

Testes Laboratoriais
Listar resultados laboratoriais anormais relevantes na tabela abaixo.

Teste	***Data da coleta (DD/MMM/AAAA)***	***Resultado anormal***	***Valores normais***	***Resultado prévio a este EAG***	***Data da coleta***

TESTES DIAGNÓSTICOS (Ex: RMN, Ultrassonografia, TC)
Listar testes diagnósticos anormais abaixo ou anexar cópias dos testes diagnósticos.

Teste	Data de realização (DD/MMM/AAAA)	Resultados/Comentários

☐ Relatório Inicial
☐ Relatório Seqüencial

Efeito da alanil-glutamina no estado nutricional e reparação da mucosa intestinal em crianças desnutridas de uma comunidade urbana do nordeste do Brasil

FICHA DE EVENTOS ADVERSOS GRAVES

Nome do local Número do Centro ☐☐☐☐ | Número do participante ☐☐ ☐☐ | Iniciais do participante ☐☐☐ | Data do preenchimento (DD/MM/AAAA) _____/_____/_____

Data de Nascimento: (DD/MMM/AAAA) ____/____/____ Sexo: Masculino ☐ Feminino ☐

Peso: ____ ____ ____ ☐ lb ./ ☐ kg

☐ Nenhum medicamento concomitante relevante
Listar medicamentos concomitantes relevantes que o participante vinha tomando até um mês antes do início do EAG.

Medicamento	Data do início	Interrupção	Dose	Indicações	Suspeito
1. ☐			☐ Desconhecida		☐ Sim ☐ Não
2. ☐			☐ Desconhecida		☐ Sim ☐ Não
3. ☐			☐ Desconhecida		☐ Sim ☐ Não
4. ☐			☐ Desconhecida		☐ Sim ☐ Não
5. ☐			☐ Desconhecida		☐ Sim ☐ Não
6. ☐			☐ Desconhecida		☐ Sim ☐ Não

Preenchida por (assinatura):	Preenchida por (extenso):	Data:
Investigador (assinatura):	Investigador (extenso):	Data:

Data de Envio/Fax para: (DD/MMM/AAAA)

☐ DMID	_____/_____/_____	☐ Não se aplica
☐ IRB	_____/_____/_____	☐ Não se aplica
☐ Central de Dados	_____/_____/_____	☐ Não se aplica
☐ Outro, especificar:	_____/_____/_____	☐ Não se aplica

ANEXO 4

NOTIFICAÇÃO DE SÉRIO EVENTO ADVERSO (SEA)* ao COMEPE

PROTOCOLO Nº : 04/02 **APROVADO PELO COMEPE em: 28/02/2002**

Projeto de Pesquisa: Efeito da alanil-glutamina no estado nutricional e reparação da mucosa intestinal em crianças desnutridas de uma comunidade urbana do Nordeste do Brasil
Pesquisadores: Noélia Leal Lima; Aldo Ângelo Moreira Lima; Helena Serra Azul
Tipo de estudo: Experiência clínica duplo cego

Local	Droga/medicamento	Dose	Via de administração	Duração
PU	**Alanil-glutamina/glicina**	**24,1g/25 g**	**VO**	**10 dias**

Identificação do paciente: HHMI _____/___ **Nome:** _____
Sexo: 1. Masculino 2. Feminino Data do nascimento: _____/____/____

SEA: _____Início do SEA:____/___/___Término do SEA: ___/___/__
Data de Início da ingestão da droga: ___/___/___ Último dia de ingestão da droga: __/__/___

O SEA apresentado , em relação ao uso da medicação:
1. não relacionado 2. provavelmente não relacionado
3. possivelmente relacionado 4.definitivamente relacionado

Breve história do SEA:
_____
_____
_____
_____
_____
_____
_____

O SEA resolveu-se:
1. espontaneamente 2. tratamento médico 3. auto-medicação
4. internamento 5. óbito 6. outros (especificar)
_____

Medicação tomada para aliviar/tratar o SEA

Droga	Dose/via de administração	Data de Início	Data do Término

Preenchida por : _____ Data do preenchimento: __/__/_
Responsável pelo envio: _____Data do envio: __/__/__

_____

** Veja definições de **EA** (Evento Adverso) e **SEA** (Sério Evento Adverso) na folha de trás*

EA (Evento Adverso) é definido como qualquer desvio de saúde e inclui:

- Piora de condições presentes no início do estudo
- Deterioração de paciente devido a sua doença de base
- Doença intercorrente
- Eventos relacionados ou possívelmente à concomitante medicação

Podem ser incluídos qualquer dos efeitos não esperados como:

- Sintomas (dor de cabeça, náusea , tontura)
- Achados no exame físico: elevação da PA, queda de cabelos, hepatoesplenomegalia
- Síndrome ou doença
- Valores de laboratório anormais
- Overdose
- Toxicidade

SEA (Sério Evento Adverso) é definido como:

- Morte durante o período da vigilância (definido no protocolo como até 20 dias após o último dia de ingestão da droga)
- Ameaça de morte (definido como risco imediato de morte durante o evento)
- Resulta em internamento hospitalar durante o período de vigilância (definido no protocolo como até 20 dias após o último dia de ingestão da droga)
- Resulta em permanente ou significante incapacidade física ou cognitiva
- Resulta em anomalia congênita ou defeito no nascimento
- Qualquer outro evento médico que pode não resultar em morte, mas pode ser ameaça de morte, ou requerer hospitalização; quando baseado, em julgamento médico, o evento poderá ser de risco para o indivíduo e requerer intervenção médica ou cirúrgica para prevenir os desfechos listados acima.

ANEXO 5

Universidade Federal do Ceará
Comitê de Ética em Pesquisa

Of. Nº 30/02 Fortaleza, 01 de março de 2002
Protocolo nº 04/02
Pesquisador responsável: Dra. Noélia Leal Lima
Deptº./Serviço: Departamento de Saúde Materno Infantil/UFC
Título do Projeto: "O efeito da alanil-glutamina no estado nutricional e reparação da mucosa intestinal em crianças desnutridas de uma comunidade urbana do Nordeste do Brasil"

Levamos ao conhecimento de V.Sª. que o Comitê de Ética em Pesquisa e do Complexo Hospitalar da Universidade Federal do Ceará – COMEPE, dentro das normas que regulamentam a pesquisa em seres humanos, do Conselho Nacional de Saúde – Ministério da Saúde, Resolução nº196 de 10 de outubro de 1996 e Resolução nº 251 de 07 de agosto de 1997, publicadas no Diário Oficial, em 16 de outubro de 1996 e 23 de setembro de 1997, respectivamente, aprovou o projeto supracitado na reunião do dia 28 de fevereiro de 2002.

Atenciosamente,

Drª Mª Elisabete Amaral de Moraes
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa
COMEPE/HUWC/UFC

ANEXO 6

Consentimento para Participação no Estudo Duplo – Cego Comparativo da Alanil-Glutamina no Tratamento de Criança na Comunidade

Pesquisa na Comunidade do Parque Universitário do Pici (PU)

Convidamos você e seu filho, _____ a fazer parte da pesquisa de avaliação da eficácia da alanil-glutamina na nutrição infantil. A solução enriquecida com alanil-glutamina tem sido utilizada para o tratamento de desnutrição e será utilizada em seu filho misturada ao suco de frutas por 10 dias.

Enquanto seu filho estiver na pesquisa, nós observaremos a quantidade de suco de frutas enriquecido ingerida pelo seu filho. Assim, nós gostaríamos de coletar amostras de fezes para determinar as possíveis causas da diarréia. Adicionalmente, nós gostaríamos de medir e pesar seu filho, medir a largura do braço dele e retirar uma pequena amostra de sangue (5 ml), utilizando agulha descartável, para ver se ele tem anemia e deficiência de glutamina. A urina do seu filho será coletada por um período de 5 horas - após a ingestão de suco de frutas contendo 2 açúcares (lactulose e manitol)- no 1º e 10º dia do tratamento para avaliação da função intestinal.

Os benefícios em acrescentar alanil-glutamina na alimentação da criança são de melhorar a nutrição e promover recuperação rápida do intestino. Não se conhecem efeitos colaterais da alanil-glutamina e os riscos não existem. O risco de pequenas manchas onde nós tiraremos sangue serão mínimos na medida do possível, através da pressão no local após a retirada de sangue. Seu prontuário será guardado com confidência em respeito a sua identidade pessoal. A pessoa para contato em caso de dúvidas é o Dr. Aldo Ângelo Moreira Lima, Unidade de Pesquisas Clínicas, UFC, Tel.: 288-84440.

Você estará livre para sair da pesquisa em qualquer época que desejar, sem prejudicar a saúde de seu filho, bastando avisar a um dos médicos ou enfermeiras envolvidos.

_____ _____

Assinatura do Responsável Membro do Grupo de Pesquisa

_____ Data: _____ / _____ / _____

Assinatura da Testemunha

PUBLICAÇÕES

ARTIGOS PUBLICADOS

Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition
44:365–374 © 2007 by European Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition and North American Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition

Wasting and Intestinal Barrier Function in Children Taking Alanyl-Glutamine–Supplemented Enteral Formula

*Noélia L. Lima, *Alberto M. Soares, *Rosa M.S. Mota, *Helena S.A. Monteiro, *†Richard L. Guerrant, and *†Aldo A.M. Lima

**Clinical Research Unit & Institute of Biomedicine/Center for Global Health, School of Medicine, Federal University of Ceará, Fortaleza, Brazil, and †Center for Global Health, University of Virginia, Charlottesville*

ABSTRACT

Objective: We examined the effect of a diet supplemented with alanyl-glutamine (AG) or placebo glycine (G) on intestinal barrier function and growth in children in northeastern Brazil.
Patients and Methods: One hundred seven children ages 7.9 to 82.2 months with a weight-for-age (WAZ), height-for-age (HAZ), or weight-for-height (WHZ) *z*-score less than −1 were studied. From July 2003 to November 2004, 51 study patients received AG (24 g/d) and 56 received G (25 g/d; isonitrogenic concentration) control for 10 days. Lactulose/mannitol excretion ratio was used as a measure of intestinal permeability and was performed on days 1 and 10 of nutritional supplementation. Weight and height were measured on days 1, 10, 30, and 120 of the protocol.
Results: The patients were similar on admission with regard to age, sex, birth weight, nutritional status, lactulose/mannitol ratio, and serum concentrations of glutamine and arginine. The percentage of lactulose urinary excretion significantly improved (decreased) in children receiving AG for 10 days but not in those receiving glycine controls. AG significantly increased cumulative change over 120 days in WHZ and WAZ scores but not HAZ scores after adjustment for age and season in comparison with the placebo glycine group.
Conclusions: Children tolerated AG-supplemented enteral formula well, and it significantly improved cumulative WHZ and WAZ over 120 days in comparison with children in the placebo glycine group. The data also suggested a beneficial effect of AG in the barrier function paracellular pathway, albeit with reduced mannitol excretion. Thus, although the effect of AG on reduced mannitol concentration requires clarification, AG appears to improve nutrition and barrier function. ***JPGN 44:365–374, 2007.*** **Key Words:** Intestinal barrier function—Malnutrition—Alanyl-glutamine—Glycine—Wasting—Stunting.
© 2007 by European Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition and North American Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition

INTRODUCTION

In developing countries, growth deficits are caused predominantly by 2 factors: enteric and other infections and inadequate food (1–4). We and others have found profound and lasting effects of diarrheal illnesses, particularly persistent and recurrent illnesses, on subsequent nutritional status, and effects of undernutrition predisposing to increased diarrhea frequency and duration, thus documenting the vicious circle of diarrhea and malnutrition (5–9). In Brazil, growth deficits are common in children living in rural areas, where 8.3% of children younger than 2 years are underweight (10) and the infant mortality rate is still high at 26.6/1000 live births, with rates being higher in the northeast region. For example, the rate in the northeast state of Ceará rises to 35/1000 live births (11). Prenatal factors such as maternal weight, height, and weight gain during pregnancy, and postnatal growth deficits, are significant indicators of inadequate nutrition and have been associated both directly and indirectly with infant and child mortality and with cognitive physical development, educational performance, and increased risk for chronic diseases (2,3,7,12–13). Therefore, continued improvement in child health and development will require improved targeting of selective interventions and general nutritional improvement for the most marginalized populations.

In malnourished children, intestinal permeability is chronically impaired, and mucosal damage may persist

Received May 2, 2006; accepted November 13, 2006.
Address correspondence and reprint requests to A.A.M Lima, Clinical Research Unit & Institute of Biomedicine, R. Cel. Nunes de Melo, No. 1315, Rodolfo Teófilo, Fortaleza, CE, Brazil (e-mail: aalima@veloxmail.com.br).
Supported in part by the Clinical Research Unit & Institute of Biomedicine/Center for Global Health and grant no. 55000645 from the Howard Hughes Medical Institute International Infectious Disease Scholar.

Copyright © 2007 by Lippincott Williams & Wilkins.Unauthorized reproduction of this article is prohibited.

for a prolonged period because the normal repair response to villous damage or atrophy is impaired (14,15). Mucosal damage results in slowing of growth as a result of reduced energy intake and malabsorption (16,17). The differential sugar absorption test is a noninvasive test that has been validated by small biopsy studies as a useful indicator of mucosal damage in children (15,18,19), and it is accepted as an indirect method of assessing intestinal mucosal absorptive and barrier function (15,20).

Glutamine plays a pivotal role in several metabolic pathways and is an essential precursor for nucleotide biosynthesis, thus explaining its critical requirement by proliferating cells such as those in the intestinal epithelium (21). Glutamine oxidation by intestinal epithelial cells provides a major energy source for the mucosa, and it processes nitrogen and carbon from the lumen and from the bloodstream into precursors for hepatic ureagenesis and gluconeogenesis (22–24). The ability of the gut mucosa to metabolize glutamine may be even more important during diarrhea and malnutrition, as has been shown in other forms of stress (25), when glutamine depletion may be severe and when oral nutrition may be interrupted because of the severity of the illness (26). Several studies in humans and animals have confirmed the central position that the intestine occupies in overall glutamine transport, electrolyte and water absorption, and metabolism (25,27–30). Studies of adult patients with cholera in Indonesia, comparing a glutamine-based solution with the standard World Health Organization oral rehydration solution (ORS), found a significant 25% reduction in the stool volume in the first 24 hours and a 30% reduction in total stool fecal volume loss in the glutamine group (31,32). Ribeiro et al (33) found that a glutamine-based ORS with 90 mmol/L L-glutamine + 90 mmol/L L-glucose was well tolerated and was comparable to the standard WHO ORS in treating dehydration in infants with noncholera diarrhea. Yalcin et al (34) showed that the duration of diarrhea was shorter in children 6 to 12 months old who received supplementation with glutamine ($0.3\ g \cdot kg^{-1} \cdot d^{-1}$) than in those receiving placebo. Recently, Lima et al (15) also showed the beneficial effect of glutamine on speeding repair of damaged intestinal mucosa and barrier function in children with malnutrition.

The major limitations of glutamine, however, are its limited solubility and its tendency to hydrolyze to potentially toxic glutamate. Both drawbacks are solved by linking glutamine to alanine, and we have found that alanyl-glutamine (AG) is stable, highly soluble, well tolerated, and at least as effective in driving sodium cotransport and intestinal injury repair in vitro (21,35–37), in animals (38,39), and in patients (40). We hypothesized that AG would improve the intestinal barrier function and growth deficits in undernourished children in northeastern Brazil. The major objective was to investigate the role of AG on intestinal barrier function and growth in children living an urban community in northeast Brazil.

PATIENTS AND METHODS

Study Type and Consent Form

This study was a prospective double-blinded randomized placebo-controlled trial (phase III). The protocol and consent form for this study were approved by ethical committees at the Federal University of Ceará, Fortaleza, Brazil, and at the University of Virginia.

Location and Population

The location of the study was Parque Universitário, an urban community in the southwest (3° 44′ 58.27″ south; 38° 34′ 30.80″ west) and approximately 5 km from the Clinical Research Unit & Institute of Biomedicine/Center for Global Health (UPC&IBIMED/CSG) headquarters in Fortaleza, capital of the northeast state of Ceará, Brazil (Fig. 1). The city of Fortaleza (3° 46′ 48.00″ south; 38° 35′ 24.00″ west) has 2.6 million inhabitants, and the infant mortality is 35/1000 live births.

Parque Universitário has 9872 habitants (2005), 1530 (15%) of whom are children younger than 8 years old. After signed consent was obtained from the parent or guardian, children ages 6 months to 8 years were invited to participate in the study. The study protocol screened children (2 months to 8 years old) with less than −1 *z*-score for this population in any of the anthropometric parameters (HAZ, WAZ, or WHZ *z*-score).

Selection and Enrollment of Participants

For inclusion in the study, children met the following criteria: age 6 months to 8 years with HAZ, WAZ, or WHZ *z*-score less than −1; residence in the Parque Universitário urban community, and agreement by the child's parent or guardian and a signed informed consent. The cutoff point below −1 *z*-score was chosen to include children most at risk for malnutrition and impaired intestinal barrier function in the study population at the Parque Universitário urban community. Children were excluded if they had been exclusively breastfed, they had participated in any other studies in the past 2 years, they had any severe systemic disease at the time of screening, their siblings from the same household were enrolled in this study protocol, or they had temperatures elevated above 102°F or chronic diseases (tuberculosis or AIDS) at the time of screening.

A total of 178 children were screened from the community census; the criterion for anthropometric measurements was less than −1 *z*-score (Fig. 2). After signed consent, a total of 107 eligible children were enrolled and randomized into 2 groups, alanyl-glutamine (51 children) and placebo glycine (56 children). Figure 2 summarizes the flow diagram for the study protocol. The study protocol had 4 time points. At time point 1 (day 1) we collected anthropometric measurements (age, sex, weight, and height), performed the lactulose:mannitol test, obtained histories of any diarrheal illnesses (2 weeks' recall using a surveillance system), collected blood samples for glutamine and arginine serum concentration and stool sample

Copyright © 2007 by Lippincott Williams & Wilkins.Unauthorized reproduction of this article is prohibited.

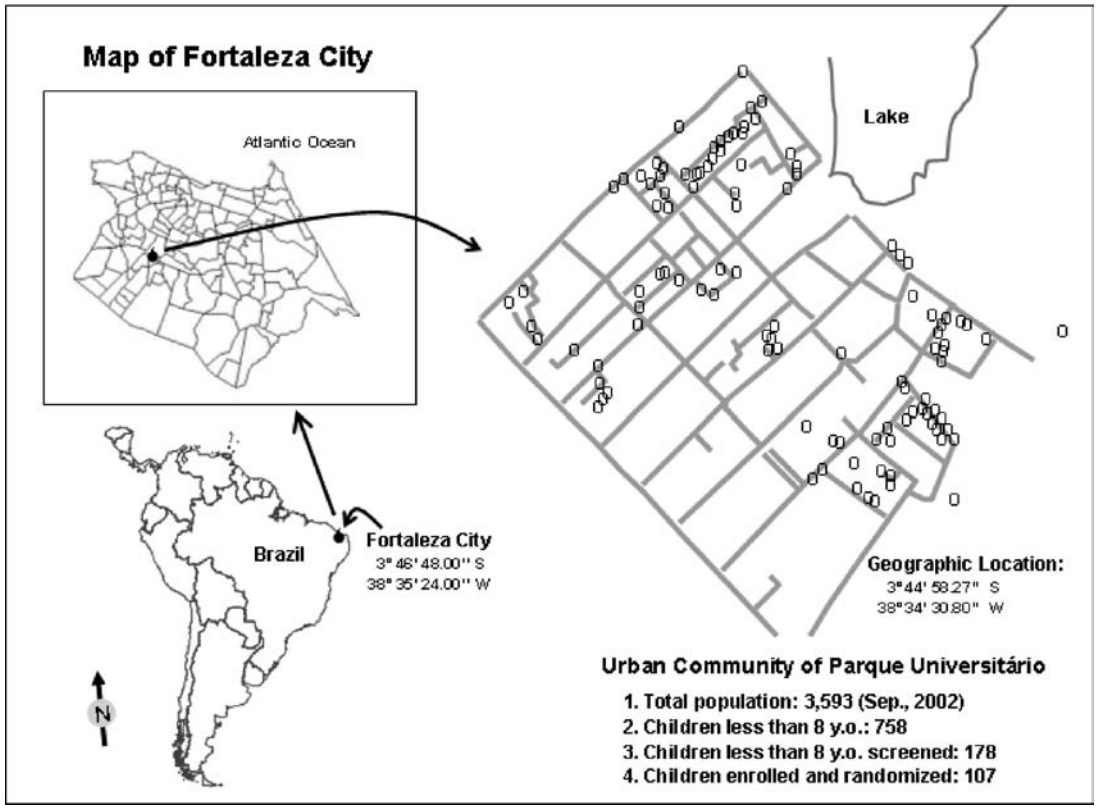


FIG. 1. Geographic location of the study and distribution of children enrolled in the study at the Parque Universitário urban community.

for parasitological examination, and initiated the AE and SAE system for collecting information daily for 2 weeks during the nutrient intervention. At time point 2 (day 10 $\pm$ 3 days) we collected anthropometric measurements, performed the lactulose:mannitol test, and continued the AE and SAE system to complete event information for the initial 2 weeks. At time point 3 (day 30 $\pm$ 7 days) we collected anthropometric measurements and collected information on diarrheal disease and illness. At time point 4 (day 120 $\pm$ 14 days) we collected anthropometric measurements and information on diarrheal disease and illness. At the end of these time points we assessed the final study outcome measures such as nutritional indices and lactulose:mannitol ratio.

Study Duration and Intervention Regimen

The study duration was from July 2003 to November 2004. A total of 178 children were eligible (ages 2–96 months and anthropometric measurement *z*-score less than -1), and 107 children were enrolled in the study groups (Fig. 2). Each child admitted to the study was allocated by restricted randomization by use of random permuted blocks of adequate lengths to receive isonitrogenous amounts of AG or glycine (G) placebo. The master randomization list was kept separately, sealed, and locked at the UPC&IBIMED/CSG and was broken only at the end of the study by the principal investigator. The treatment AG or placebo G was given orally. Alanyl-glutamine (Rexim S.A., Degussa Group, Courbevoie, France), 24 g daily, or matching placebo G (Spectrum Chemical, Gardena, CA), 25 g daily, was given as nutritional therapy for improvement in intestinal barrier function and growth in children. Oral AG or placebo G was given mixed with whole milk (50 mL) for 10 days, starting at day 1 of the study protocol.

Assessment of Anthropometric Measurements and Diarrhea Morbidity

Trained investigators measured and recorded anthropometric measurements (height and weight) using standard procedures, quality control, and equipment. Supine height in children younger than 24 months and standing height in children at least 24 months old was recorded for all participants in the study by use of an anthropometric scale with an accuracy of 0.1 cm. Body weights were measured on a calibrated digital weighting scale (Tanita Solar Scale, Arlington, IL) with an accuracy of 100 g. The anthropometric measurements were taken at 1, 10, 30, and 120 days of the study protocol (Fig. 2).

Diarrheal illnesses in the children studied were assessed daily during 1 to 10 days of treatment and in the last 2 weeks with household visits by the field team (1 nurse field coordinator and 3 health care agents) with use of a cross-section surveillance system at 30 and 120 days (Fig. 2). Diarrhea was defined as 3 or more liquid stools in the previous 24 hours. An episode of diarrhea was defined as diarrhea days (>1day)

Copyright © 2007 by Lippincott Williams & Wilkins.Unauthorized reproduction of this article is prohibited.

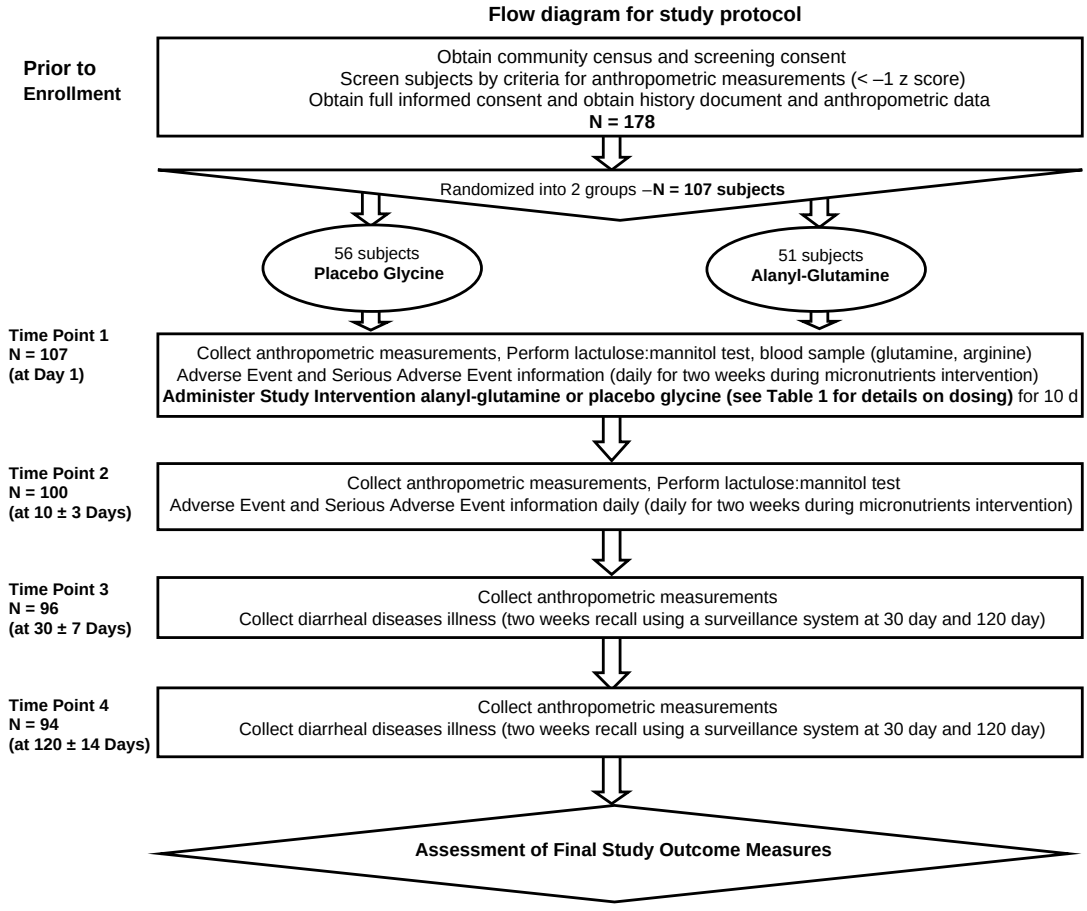


FIG. 2. Flow diagram for study protocol.

separated by at least 48 hours without this symptom. Diarrheal disease episodes were classified as acute (<14 days' duration), persistent (≥14 to <30 days' duration), or chronic (≥30 days' duration).

Intestinal Permeability Test

All of the participants ingested a test solution containing 5 g lactulose (Duphar Laboratories, Southampton, UK) and 1 g mannitol (Henrifarma Produtos Químicos e Farmacêuticos LTDA, Sao Paulo, Brazil), dissolved in 20 mL water after at least 3 hours of fasting. Urine was collected 5 hours after administration of the test solution, the total volume was recorded, and an aliquot was preserved with chlorhexidine (0.236 mg/mL of urine; Sigma Chemical, St Louis, MO) and an aliquot of 5 mL storage for sugar analysis. The lactulose and mannitol concentrations were measured with high-pressure liquid chromatography with pulsed amperometric detection as previously described (19).

Adverse Event and Serious Adverse Event System

An adverse event (AE) was defined as any untoward medical occurrence that may arise during administration of the AG or placebo G and that may or may not have a causal relationship with the study agent. A serious adverse event (SAE) was defined as any adverse experience occurring at any dosage of AG or G placebo that resulted in any of the following outcomes: death, threat to life, requirement for inpatient hospitalization, persistent or significant disability or incapacity, or an important medical event. All AEs and SAEs were recorded, reviewed by qualified staff, and reported according to procedures detailed as good clinical practice (41). Unexpected events and SAEs that occurred during the study were reported in accordance with the US Division of Microbiology and Infectious Diseases' required reporting and guidelines for SAEs (42). These SAEs were reported to the Federal University of Ceará Review Board.

Sample Size Calculation

The lactulose:mannitol ratio was selected as the primary outcome variable to be used in the calculation of sample size because it was objective data and because it reflected overall intestinal barrier disruption. On the basis of data from our preliminary studies (lactulose:mannitol ratio = 0.13 ± 0.04), we calculated that a sample size of 21 patients in both the control and the experimental groups would give 90% power to

Copyright © 2007 by Lippincott Williams & Wilkins.Unauthorized reproduction of this article is prohibited.

detect a reduction of 30% or more in lactulose:mannitol ratios at a significance level of $P = 0.05$. We enrolled at least 35 patients in each group ($N = 70$) to allow for the possibility of a 20% dropout rate and adjusted sample size for the secondary parameters as anthropometric measurements.

This sample size of $n = 35$ in each group was also appropriate to determine an effect of interest in the mean HAZ, WHZ, or WHZ changes between children receiving AG or placebo G. With use of a 2-tailed test with type I error of 5%, the proposed sample size was sufficient to have 80% power to detect a difference of 0.36 and 90% to detect a difference of 0.42. A loss of 5 children per study group for the 120-day anthropometric measurement outcome assessments, a 14% loss, would still result in a study with 80% or 90% power to detect a mean change of 0.39 or 0.45, respectively.

Statistical Analysis

All of the data were entered twice by a different person, and validation was done with Excel software (Microsoft Corporation). Excel was also used to calculate parameters such as the intestinal permeability test. EpiInfo Nutstat program software version 6.0 (Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA) was used to calculate *z*-scores for HAZ, WAZ, and WHZ. Statistical analysis was performed with the Statistical Package for Social Sciences (version 11.5, SPSS Inc, Chicago, IL). The GraphPad Prism program software version 3.0 (GraphPad Software, San Diego, CA) was also used to create complementary tables and to analyze and generate study data graphics for publishing the results. ArcGIS program software version 9.0 (ESRI Co, Redlands, CA) was used to map each child entered in the study at the Parque Universitário urban community.

Analysis of covariance was used for cumulative changes in anthropometric *z*-scores. The unpaired Student *t* test was used to examine total months' change in anthropometric parameters between groups. The χ^2 or Fisher exact test was used for nonparametric data and to compare proportions of AEs and SAEs between groups. For analysis of the primary outcome, lactulose:mannitol results were log-transformed in preparation for submission to statistical analysis using paired and unpaired Student *t* tests. The Pearson correlation was used after age and season between permeability test parameters and anthropometric *z*-scores were controlled for. Values were considered significant when $P \leq 0.05$.

RESULTS

The completion of follow-up visits at the Parque Universitário urban community is shown in Figure 2. Of 107 children, 94 completed all 120 days of follow-up. Thus, 88% of the total children enrolled completed the follow-up visits. Thirteen children (12%) were discontinued from the study protocol: 7 children between 1 and 10 days; 4 children between 10 and 30 days; and 2 children between 30 and 120 days. The reasons for discontinuation or dropout from the study protocol were as follows: 5 children changed address, 4 children did not accept treatment micronutrient supplementation (all from placebo G), 2 parents discontinued for unknown reasons, and 2 children did not accept the lactulose:mannitol test.

Table 1 summarizes the characteristics of the children by groups, age, sex, birth weight, nutritional status, nutrient (glutamine and arginine) serum concentration, and lactulose:mannitol ratio. At study entry, there were no significant differences between the study groups in age, sex, birth weight, nutritional status (measurements of *z*-scores), serum micronutrient concentrations, or lactulose:mannitol ratios. In all of the groups, at least 2 of the anthropometric measurements were a mean of less than -1 *z*-score. One child in each group (2%, 1/51 for placebo G; 1.8%, 1/56 for AG) had diarrhea at the start of the study protocol, and 1 child also in each group had a history of diarrhea (1 day's duration for placebo G and 2 days' duration for AG) in the last 2-week recall at 30 and 120 days of the study protocol. The median and range values of the lactulose:mannitol ratio were within the confidence interval for values in healthy children in this community. The mean serum concentrations for glutamine and arginine were borderline or below the normal range for both groups.

Table 2 and Figure 3 summarizes the percent urinary excretion of lactulose and mannitol and the lactulose:-mannitol ratios for all groups. The analysis was adjusted for age and season in both groups. In the AG-supplemented group, the percent urinary excretion of lactulose decreased significantly between days 1 and 10 (median 0.222, range 4.675; vs median 0.082, range 2.550; $P \leq 0.05$), and there was also a significant decrease in mannitol (median 6.156, range 24.735; vs median 2.756, range 20.626; $P \leq 0.05$). The lactulose:mannitol ratio or the difference between day 10 to day 1 by treatment group did not change significantly in either group or when compared between groups. The urinary excretion of lactulose and mannitol did not change for placebo glycine. The Pearson correlation of anthropometric measurements with urinary mannitol or lactulose excretion, after age and season were controlled for, showed a borderline significant inverse correlation of WHZ or WAZ, but not HAZ, with lactulose (WHZ correlation with lactulose: $r^2 = -0.269$, $P = 0.13$; WAZ correlation with lactulose: $r^2 = -0.247$, $P = 0.17$) and a significant inverse correlation of mannitol in the AG group (WHZ: $r^2 = -0.386$, $P = 0.027$; WAZ correlation with mannitol: $r^2 = -0.385$, $P = 0.027$) but not in the control G group (WHZ correlation with lactulose: $r^2 = -0.018$, $P = 0.92$; WHZ correlation with mannitol: $r^2 = 0.014$, $P = 0.94$; WAZ correlation with lactulose: $r^2 = -0.109$, $P = 0.56$; WAZ correlation with mannitol: $r^2 = -0.003$, $P = 0.99$).

The results for cumulative changes (final minus initial measurement for the entire study period) in WHZ, WAZ, and HAZ after adjustment for age and season are presented in Table 3. The cumulative changes of growth in

Copyright © 2007 by Lippincott Williams & Wilkins.Unauthorized reproduction of this article is prohibited.

TABLE 1. *Characteristics of children by age, sex, anthropometric measurements, intestinal permeability ratio, and groups at baseline*

Parameters	Study groups	
	Placebo glycine* (n = 56)	Alanyl-glutamine† (n = 51)
Age, mo (mean ± SD)	42.2 ± 18.05	43.1 ± 19.07
Sex		
Male: n (%)	27 (48)	28 (55)
Female: n (%)	29 (52)	23 (45)
Birth weight (% low birth weight)‡	5/43 (12)	3/45 (7)
Nutritional status (mean ± SD)		
WHZ	−0.23 ± 1.089	−0.29 ± 1.297
HAZ	−1.39 ± 1.170	−1.52 ± 0.852
WAZ	−1.06 ± 0.887	−1.21 ± 0.878
Diarrhea		
Day 1	1 (1.8%)	1 (2.0%)
Lactulose:mannitol ratio:§ median (range)	0.0302 (5.5812)	0.0385 (0.8922)
Serum nutrient (normal range)¶	n = 23	n = 21
Glutamine (0.479–0.821 μmol/mL)	0.1699 ± 0.0573	0.1814 ± 0.0547
Arginine (0.120–0.144 μmol/mL)	0.1045 ± 0.0425	0.1305 ± 0.0503

There were no significant ($P > 0.05$) differences in these parameters comparing the AG group with the placebo G group according to the Fisher exact test or the unpaired Student t test. HAZ = height-for-age z-score; WAZ = weight-for-age z-score; WHZ = weight-for-height z-score.

* Placebo glutamine = glycine isonitrogenous amount (25 g/d) was given mixed with whole milk over 10 days starting at day 1 of the study protocol.

† Oral AG (24 g/d) was given mixed with whole milk over 10 days starting at day 1 of the study protocol.

‡ Low birth weight is defined as <2500 g.

§ The median and range values of the lactulose:mannitol ratio are within the confidence interval for healthy children in this community.

¶ The mean serum concentration of glutamine or arginine was below the normal range, except for arginine in the AG group, which was borderline to the minimum normal range concentration.

WHZ and WAZ, but not HAZ, were significantly ($P \leq 0.05$) better in the AG group than in the placebo G group.

Samples for parasitological examination were collected within 3 days after the children's admission to the study protocol. All stool specimens were transported on ice and processed within 4 hours of collection by use of standard methods (15). Stool samples from 92 children (43 in the AG group and 49 in the G control group) were collected for laboratory examination. Six (7%) of 92 children had liquid stools (4 in the AG group and 2 in the G group). At least 1 parasite was found in 37 (40%) children, and 2 or more parasites were found in 9 (10%) children. Thirty (33%) children had *Ascaris lumbricoides*, 8 (9%) had *Trichuris trichiura*, 5 (5%) had *Giardia lamblia*, 2 (2%) had *Strongyloides stercoralis*,

TABLE 2. *Intestinal permeability parameters by time and groups during 10-day follow-up in undernourished children at the Parque Universitário urban community, northeastern Brazil, July 2003–November 2004*

Intestinal permeability measurements by time median (range)	Study groups	
	Placebo glycine* (n = 46)	Alanyl-glutamine† (n = 39)
% Lactulose excretion (at day 1)		
Before	0.258 (0.000–3.336)	0.222 (0.000–4.675)
After	0.161 (0.000–4.107)	0.082 (0.000–2.550)‡
% Mannitol excretion (at day 1)		
Before	5.378 (0.000–26.796)	6.156 (0.000–24.735)
After	4.893 (0.000–24.602)	2.756 (0.000–20.626)‡
Lactulose:mannitol ratio (at day 1)		
Before	0.0379 (0.000–5.581)	0.0423 (0.000–0.228)
After	0.0257 (0.000–0.603)	0.0345 (0.000–0.533)

* Placebo glutamine = glycine isonitrogenous amount (25 g/d) was given mixed with whole milk during 10 days starting at day 1 of the study protocol.

† Oral AG (24 g/d) was given mixed with whole milk over 10 days starting at day 1 of the study protocol.

‡ $P \leq 0.05$ before versus after treatment with AG, but not for placebo G; paired Student t test after log transformation of the data.

Copyright © 2007 by Lippincott Williams & Wilkins.Unauthorized reproduction of this article is prohibited.

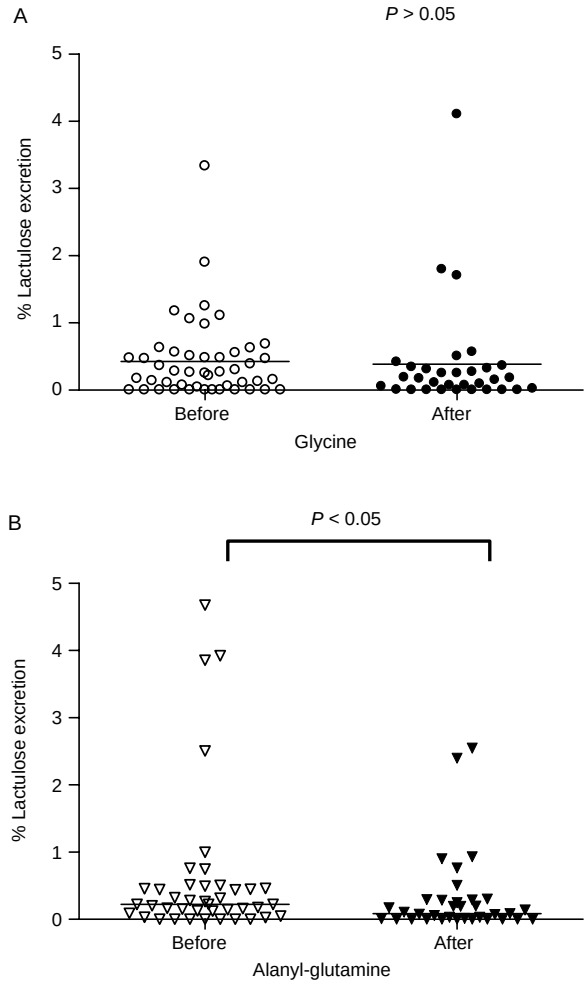


FIG. 3. Scatterplot with median of the percentage of lactulose excretion before and after treatment with placebo G and AG. A, No significant change in the percentage of lactulose excretion in undernourished children treated with placebo G. B, Significant reduction in the percentage of lactulose excretion in undernourished children treated with AG. The data were log-transformed to provide a normal distribution and then analyzed with the paired Student *t* test. $P \leq 0.05$ considered significant.

and 1 (1%) had hookworm. The parasitological examination showed no significant differences between the groups at admission.

The denominator for AEs and SAEs were the total number of children, and no child had more than 1 AE or SAE. A total of 20 (18.7%) AEs and 3 (2.8%) SAEs were observed in the 107 children enrolled in the study. As summarized in Table 4, the total frequency of AEs or SAEs was not significantly different between groups. The predominant vomiting observed in the placebo (glycine) group was caused by nutrient formulation, and this problem was solved without unblinding the study at the beginning of enrollment in the study protocol with increased amounts of milk. The powders, especially glycine, are thin nutrient formulations, and if not diluted well they will create a thin pellicle at the palate and can stimulate the vomiting reflex. No child reported vomiting AE associated with either group after this adjustment on either nutrient formulation.

DISCUSSION

Extensive research for decades has documented the effects of malnutrition on human performance, health, and survival, including physical growth, morbidity, mortality, cognitive development, reproduction, physical work capacity, and risks for several adult-onset chronic diseases (3,7,12). Since the 1980s, selective health and nutrition interventions have become a major component of the policy portfolios of international agencies, national governments, and nongovernmental organizations. Among all of the developmental outcomes such as growth monitoring, oral rehydration, breast-feeding, immunizations, and micronutrient interventions, child health and survival has remained a powerful rationale and motivator for international agencies. Therefore, improvements in the overall nutritional status of a population should be a major policy goal because of the multiple long-term and short-term effects on human and economic development.

The purpose of this study was to determine the short-term and intermediate-term effects of AG supplementation for 10 days on the intestinal barrier function and nutritional status in children living in an urban community in northeast Brazil. We found that AG improved the WHZ *z*-scores (wasting) and WAZ, but not HAZ, in these children; by contrast, the isonitrogenous G placebo did not improve the wasting status of the control children. This effect suggests that AG, but not placebo G, improved the tissue mass and reduced wasting in these children.

Although the vicious circle of diarrheal diseases and malnutrition is well documented, its pathophysiology is poorly understood. Previous data have shown associations of malnutrition with intestinal villus atrophy and disruption of the intestinal barrier function (14,15,43). Recently, 1 report has shown the importance of glutamine in repairing the intestinal barrier function in malnourished children (15). The results presented in this article showed a consistent effect of a glutamine derivative, AG, in improving the mucosal damage in children. Given that the G placebo was isonitrogenous with AG, this suggests that this effect was independent of the amount of nitrogenous nitrogen but probably dependent on the metabolic pathway or modulation by glutamine on gene expression of proteins involved in signal transduction pathways stimulated by cell growth factors (44,45). The repair of leaky tight junctions (barrier function paracellular pathway) in these high-risk children,

Copyright © 2007 by Lippincott Williams & Wilkins.Unauthorized reproduction of this article is prohibited.

TABLE 3. *Cumulative anthropometric z-scores with adjustment for age and season over 120-day follow-up in children at the Parque Universitário urban community in the northeast of Brazil, July 2003 to November 2004*

	Treatments				
	Control glycine*		Alanyl-glutamine†		
Cumulative anthropometric parameters	n	Mean ± SEM	N	Mean ± SEM	*P*
WHZ					
1–120 days	40	0.078 ± 0.077	42	0.298 ± 0.075	0.044
WAZ					
1–120 days	40	−0.094 ± 0.048	42	0.055 ± 0.046	0.029
HAZ					
1–120 days	40	−0.269 ± 0.051	42	−0.316 ± 0.049	0.508

Data are shown as mean ± standard error for cumulative changes (final minus initial measurement for the entire study period) in anthropometric *z*-scores after adjustment for age and season. HAZ = height-for-age *z*-score; WAZ = weight-for-age *z*-score; WHZ = weight-for-height *z*-score.

* Placebo glutamine = glycine isonitrogenous amount (25 g/d) was given mixed with whole milk over 10 days starting at day 1 of the study protocol.

† Oral AG (24 g/d) was given mixed with whole milk over 10 days starting at day 1 of the study protocol.

as seen with decreasing urinary lactulose excretion, allows for improved WHZ and WAZ even with decreased epithelial absorption area (measured by urinary excretion of mannitol), as shown in results from the Pearson correlation analysis after adjustment for age and season. This last effect of AG suggests a process related to dosage, as discussed below. This effect should provide a warning against advocating widespread glutamine supplementation, especially regarding the potential for slight reduction in absorptive epithelium with the high dosage used in this study.

Recent reports are also consistent with glutamine's improving the prognosis of critically ill patients, presumably by maintaining the intestinal physiological barrier and by reducing the frequency of infections (46). In this report the diarrheal disease morbidity sample sizes were too small to enable comparison between these 2 groups. This was because of the cross-section history taken on the last 2 weeks' recall, seasonal variations in morbidity of diarrheal diseases, and the older age groups (including children older than 2 years) in this study. The dosages of glutamine used in the above-mentioned reports were approximately 0.34 $g \cdot kg^{-1} \cdot d^{-1}$, which were much lower than the dosage of AG or glutamine used in this study, approximately 1.79 $g \cdot kg^{-1} \cdot d^{-1}$, or in the earlier report by Lima et al (15), approximately 2.75 $g \cdot kg^{-1} \cdot d^{-1}$. However, these higher dosages, equivalent to more than 2.7 molar concentration dose of glutamine or AG per day, may influence the modulation of the stem cell epithelial turnover, given that we observed a decrease of surface area as measured by the percentage of mannitol excretion in children receiving AG or glutamine but not placebo G. Several cell growth factors influence intestinal epithelial turnover, such as Wnt, R-spondin1 and 2, and glucagon-like growth factor, the genes for which glutamine and its

TABLE 4. *Adverse events (AEs) and serious adverse events (SAEs) by study groups in 107 children at the Parque Universitário urban community, northeastern Brazil, July 2003–November 2004*

	Study groups		
Parameters	Total N = 107 (%)	Placebo (glycine)* n = 56 (%)	Alanyl-glutamine† n = 51 (%)
AEs‡	20 (18.7)	14 (25)	6 (12)
Vomiting	9 (8.4)	9 (16)	0 (0)
Nausea	2 (1.9)	1 (1.8)	1 (2)
Diarrhea	3 (2.8)	2 (3.6)	1 (2)
Respiratory infections	2 (1.9)	1 (1.8)	1 (2)
Asthma	1 (0.9)	0 (0)	1 (2)
Nosebleed	1 (0.9)	0 (0)	1 (2)
Scabies	2 (1.9)	1 (1.8)	1 (2)
SAEs§	3 (2.8)	1 (2)	2 (4)
Diarrhea	2 (1.9)	1 (2)	1 (2)
Asthma	1 (0.9)	0 (0)	1 (2)

* Placebo glutamine = glycine isonitrogenous amount (25 g/d) was given mixed with whole milk during 10 days starting at day 1 of the study protocol.

† Oral AG (24 g/d) was given mixed with whole milk during 10 days starting at day 1 of the study protocol. ‡§$P > 0.05$ AG treatment group versus placebo G, χ^2 or Fisher exact test.

Copyright © 2007 by Lippincott Williams & Wilkins.Unauthorized reproduction of this article is prohibited.

derivatives may downregulate their expression with high dosages (47–49). In fact, in vitro data are consistent with such a dose-dependent effect of glutamine (2–30 mmol/L) on intestinal cell proliferation and may be independent of its effect to decrease intestinal permeability and repair epithelial damage and to increase tissue conductivity and modulation of tight-junction proteins (21,37). Glutamine concentrations above 50 mmol/L did not induce intestinal cell proliferation in in vitro experiments (data not shown). The high dosage of AG used in this study was safe and well tolerated in children living in an urban community, and these results are consistent with those in previous work (15).

In conclusion, we found that AG produced a significant increase in weight-for-height and weight-for-age compared with isonitrogenic G placebo, suggesting that AG improves tissue mass and reduces wasting in children living in an urban community in northeastern Brazil. We also observed that AG supplementation was associated with an improvement in intestinal barrier function, as measured by the decreased percentage of lactulose excretion rate.

Acknowledgments: The authors thank all of the children and their guardians for granting permission for their children to participate in this approval protocol by the Ethical Clinical Research Committee from the Federal University of Ceará and the University of Virginia. They also thank the study team, the field nurse coordinator, the health care workers, and the laboratory technicians for their important work in this study.

REFERENCES

1. Use and interpretation of anthropometric indicators of nutritional status. WHO Working Group. *Bull WHO* 1986; 64:929–41.
2. Murray CJ, Lopez AD. Global mortality, disability, and the contribution of risk factors: Global Burden of Disease Study. *Lancet* 1997;349:1436–42.
3. Pelletier DL, Frongillo EA. Changes in child survival are strongly associated with changes in malnutrition in developing countries. *J Nutr* 2003;133:107–19.
4. Tomkins A. Malnutrition, morbidity and mortality in children and their mothers. *Proc Nutr Soc* 2000;59:135–46.
5. Guerrant RL, Schorling JB, McAuliffe JF, et al. Diarrhea as a cause and an effect of malnutrition: diarrhea prevents catch-up growth and malnutrition increases diarrhea frequency and duration. *Am J Trop Med Hyg* 1992;47 (1 Pt 2):28–35.
6. Lima AAM, Moore SR, Barboza MS Jr et al. Persistent diarrhea signals a critical period of increased diarrhea burdens and nutritional shortfalls: a prospective cohort study among children in northeastern Brazil. *J Infect Dis* 2000;181:1643–51.
7. Guerrant RL, Kosek M, Lima AA, et al. Updating the DALYs for diarrhoeal disease. *Trends Parasitol* 2002;18:191–3.
8. Black RE, Brown KH, Becker S. Malnutrition is a determining factor in diarrhoeal duration, but not incidence, among young children in a longitudinal study in rural Bangladesh. *Am J Clin Nutr* 1984;37:87–94.
9. Schorling JB, McAuliffe JF, de Souza MA, et al. Malnutrition is associated with increased diarrhoea incidence and duration among children in an urban Brazilian slum. *Int J Epidemiol* 1990; 19:728–35.
10. Um mundo para as crianças. UNICEF 2005. Available at: http://www.unicef.org/brazil. Accessed January 18, 2007.
11. IBGE (Fundação Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística), 2003. Síntese de Indicadores Sociais. Available at: http://www.ibge.gov.br. Accessed January 18, 2007.
12. Bryce J, Boschi-Pinto C, Shibuya K, et al. WHO Child Health Epidemiology Reference Group WHO estimates of the causes of death in children. *Lancet* 2005;365:1147–52.
13. Guerrant RL, Oria R, Bushen OY, et al. Global impact of diarrheal diseases that are sampled by travelers: the rest of the hippopotamus. *Clin Infect Dis* 2005;41 (Suppl 8):S524–30.
14. Sullivan PB, Lunn PG, Northrop-Clewes CA, et al. Persistent diarrhoea and malnutrition: the impact of treatment on small bowel structure and permeability. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1992;14:208–15.
15. Lima AA, Brito LF, Ribeiro HB, et al. Intestinal barrier function and weight gain in malnourished children taking glutamine supplemented enteral formula. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2005;40:28–35.
16. Tomkins A, Watson F. Malnutrition and Infection: A Review Geneva: ACC/SCN, World Health Organization; 1989.
17. Mata LJ, Kromal RA, Urrutia JJ. Effect of infection on food intake and the nutritional state. *Am J Clin Nutr* 1977;301:215–27.
18. Behrens R, Lunn PG, Northrop CA, et al. Factors affecting the integrity of the intestinal mucosa of Gambia children. *Am J Clin Nutr* 1987;45:1433–41.
19. Barboza MS Jr, Silva TMJ, Guerrant RGL, et al. Measurement of intestinal permeability using mannitol and lactulose in children with diarrheal diseases. *Braz J Med Biol Res* 1999;32:1499–504.
20. Ford RPK, Menzies IS, Phillips AD, et al. Intestinal sugar permeability: relationship to diarrhoeal disease and small bowel morphology. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1985;4:568–74.
21. Carneiro BA, Fujii J, Brito GA, et al. Caspase and bid involvement in *Clostridium difficile* toxin A-induced apoptosis and modulation of toxin A effects by glutamine and alanyl-glutamine in vivo and in vitro. *Infect Immun* 2006;74:81–7.
22. Windmueller HG, Spaeth AE. Intestinal metabolism of glutamine and glutamate from the lumen as compared to glutamine from blood. *Arch Biochem Biophys* 1975;171:662–72.
23. Windmueller HG, Spaeth AE. Uptake and metabolism of plasma glutamine by the small intestine. *J Biol Chem* 1974;249:5070–9.
24. Windmueller HG. Glutamine utilization by the small intestine [Review]. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* 1982;53:201–37.
25. Souba WW. Glutamine Physiology, Biochemistry, and Nutrition in Critical Illness. Austin, TX: RG Landes; 1992.
26. Newsholme EA, Parry-Billings M. Properties of glutamine release from muscle and its importance for the immune system. *J Parenter Enteral Nutr* 1990;14 (Suppl):67S.
27. Rhoads JM, Keku EO, Bennett LE, et al. Development of L-glutamine-stimulated electroneutral sodium absorption in piglet jejunum. *Am J Physiol* 1990;259 (1 Pt 1):G99–107.
28. Lima AA, Soares AM, Freire JE Jr et al. Cotransport of sodium with glutamine, alanine and glucose in the isolated rabbit ileal mucosa. *Braz J Med Biol Res* 1992;25:637–40.
29. Silva AC, Santos-Neto MS, Soares AM, et al. Efficacy of a glutamine-based oral rehydration solution on the electrolyte and water absorption in a rabbit model of secretory diarrhea induced by cholera toxin. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1998;26:513–9.
30. Duggan C. Glutamine-based oral rehydration solutions: the magic bullet revisited? *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1998;26:533–5.
31. World Health Organisation. WHO Interim Programme Report (Programme for cControl of Diarrhoeal Diseases). Vol 91. Geneva: WHO/CDD; 1990, 36.
32. Punjabi NH, Kumala S, Rasidi C, et al. Glutamine supplemented ORS is superior to standard citrate glucose ORS for the maintenance therapy of adult cholera patients in Jakarta [Abstract 53]. *Am J Trop Med Hyg* 1991;45:114.
33. Ribeiro H Jr, Ribeiro T, Mattos A, et al. Treatment of acute diarrhea with oral rehydration solutions containing glutamine. *J Am Coll Nutr* 1994;13:251–5.

Copyright © 2007 by Lippincott Williams & Wilkins.Unauthorized reproduction of this article is prohibited.

34. Yalcin SS, Yurdakok K, Tezcan I, et al. Effect of glutamine supplementation on diarrhea, interleukin-8 and secretory immunoglobulin A in children with acute diarrhea. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2004;38:494–501.
35. Carneiro-Filho BA, Bushen OY, Brito GA, et al. Glutamine analogues as adjunctive therapy for infectious diarrhea. *Curr Infect Dis Rep* 2003;5:114–9.
36. Brito GA, Alcantara C, Carneiro-Filho BA, et al. Pathophysiology and impact of enteric bacterial and protozoal infections: new approaches to therapy. *Chemotherapy* 2005;51:23S–35S.
37. Brito GA, Carneiro-Filho B, Oria RB, et al. *Clostridium difficile* toxin A induces intestinal epithelial cell apoptosis and damage: role of Gln and Ala-Gln in toxin A effects. *Dig Dis Sci* 2005;50: 1271–8.
38. Lima AA, Carvalho GH, Figueiredo AA, et al. Effects of an alanyl-glutamine-based oral rehydration and nutrition therapy solution on electrolyte and water absorption in a rat model of secretory diarrhea induced by cholera toxin. *Nutrition* 2002;18: 458–62.
39. Blikslager A, Hunt E, Guerrant R, et al. Glutamine transporter in crypts compensates for loss of villus absorption in bovine cryptosporidiosis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001;281 (3):G645–53.
40. Bushen OY, Davenport JA, Lima AB, et al. Diarrhea and reduced levels of antiretroviral drugs: improvement with glutamine or alanyl-glutamine in a randomized controlled trial in northeast Brazil. *Clin Infect Dis* 2004;15 (38):1764–70.
41. Good Clinical Practice Handbook. Bethesda, MD:Division of Microbiology and Infectious Diseases, National Institute of Allergy and Infectious Diseases, National Institutes of Health, Department of Health and Human Services; 2001.
42. Code of Federal Regulations & ICH Guidelines, April 1, 2001, Title 21–Food & Drugs, Good Clinical Practice and ICH as adopted by the Food and Drug Administration.
43. Lunn PG, Northrop-Clewes CA, Downes RM. Recent developments in the nutritional management of diarrhoea: 2. Chronic diarrhoea and malnutrition in the Gambia: studies on intestinal permeability. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1991;85:8–11.
44. Rhoads JM, Argenzio RA, Chen W, et al. L-glutamine stimulates intestinal cell proliferation and activates mitogen-activated protein kinases. *Am J Physiol* 1997;272 (5 Pt 1):G943–53.
45. Xia Y, Wen HY, Young ME, et al. Mammalian target of rapamycin and protein kinase A signaling mediate the cardiac transcriptional response to glutamine. *J Biol Chem* 2003;278:13143–50.
46. De-Souza DA, Greene LJ. Intestinal permeability and systemic infections in critically ill patients: effect of glutamine. *Crit Care Med* 2005;33:1125–35.
47. Kim KA, Kakitani M, Zhao J, et al. Mitogenic influence of human R-spondin1 on the intestinal epithelium. *Science* 2005;309 (5738):1256–9.
48. Kazanskaya O, Glinka A, del Barco Barrantes I, et al. Spondin2 is a secreted activator of Wnt/beta-catenin signaling and is required for Xenopus myogenesis. *Dev Cell* 2004;7:525–34.
49. Gregorieff A, Clevers H. Wnt signaling in the intestinal epithelium: from endoderm to cancer. *Genes Dev* 2005;19:877–90.

Copyright © 2007 by Lippincott Williams & Wilkins.Unauthorized reproduction of this article is prohibited.

JOBNAME: gas 40#1 2005 PAGE: 1 OUTPUT: Tue November 30 21:42:21 2004
lww/gas/84141/MPG155122
Prod #: MPG155122
MS #xxx

Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition
40:28–35 © January 2005 Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia

Intestinal Barrier Function and Weight Gain in Malnourished Children Taking Glutamine Supplemented Enteral Formula

*§Aldo A. M. Lima, †Lúcia F. B. Brito, †Hildênia B. Ribeiro, †Ma Ceci V. Martins, †Amália P. Lustosa, †Edna M. Rocha, *Noélia L. Lima, *Cristina M. G. Monte, and *§Richard L. Guerrant

**Clinical Research Unit & Institute of Biomedicine, Department of Physiology and Pharmacology, Faculty of Medicine, Federal University of Ceara, Fortaleza, CE, Brazil; †Hospital Infantil Albert Sabin, State of Ceara Health Foundation, Fortaleza, CE, Brazil; §Center for Global Health, Division of Infectious Diseases and International Health, University of Virginia, Charlottesville, Virginia*

ABSTRACT

Objective: We examined the effect of standard formula and glutamine or glycine supplemented enteral formula on intestinal permeability and weight gain in children with malnutrition.

Methods: 80 children aged 2 to 60 months with a weight-for-age z-score less than −2 were studied. From December 1996 to April 1999, 27 study patients received nonsupplemented formula. From June 2001 to June 2002 an additional 53 patients were randomly assigned to receive formula supplemented with glutamine or glycine (isosmolar concentrations) for 10 days. Lactulose/mannitol excretion ratio was used as a measure of intestinal permeability and was performed before and after 10 days of nutritional rehabilitation. Weight was measured before and after treatment.

Results: Patients were similar on admission with regard to age, sex, nutritional status and lactulose/mannitol ratio. The lactulose/mannitol ratio significantly improved (decreased) in children receiving formula supplemented with glutamine for 10 days but not in those receiving glycine or non-supplemented formula. Weight gain occurred during therapy in all groups and was not statistically different among groups.

Conclusion: Formula supplemented with glutamine improves intestinal barrier function compared with nonsupplemented formula but does not augment weight gain. ***JPGN 40:28–35, 2005.*** **Key Words:** Malnutrition—Persistent diarrhea—Intestinal permeability—Glutamine—Glycine. © 2005 Lippincott Williams & Wilkins

INTRODUCTION

The relationship between malnutrition and child mortality has been emphasized in many studies (1–7), particularly its role in susceptibility to infection (8–12). There is considerable evidence that malnutrition also affects cognitive development, reproduction, physical work capacity and risks for several chronic diseases of adulthood (13–15).

Most children admitted for hospital treatment of severe malnutrition have a history of acute or chronic diarrhea. Both malnutrition and persistent diarrhea have been associated with disrupted intestinal barrier function, which may contribute to the nutrient deficits of these children (16–19). Intestinal mucosal biopsies of severely malnourished children show variable degrees of villus atrophy, crypt hyperplasia and epithelial lymphocyte infiltration (20). Villus damage may cause a loss of mucosal enzymes required for digestion and absorption and may result in compromise of the small intestinal barrier function with the potential side effect of absorption of intact antigenic macromolecules, which may trigger local and systemic immune or inflammatory processes (21). The lactulose/mannitol intestinal (L/M) permeability test is a measure of paracellular permeability and absorptive surface (22). Some studies have shown that supplemental glutamine dipeptide positively influences nitrogen excretion, immune status, gut integrity, intestinal mucosal functions, morbidity and outcome in subjects with diarrhea (23–27). Furthermore, glutamine or alanyl-glutamine stimulate crypt cell proliferation in normal human ileum and colon (24). In patients with inflammatory bowel disease or neoplasic disease, glycyl-glutamine supplementation has been found to maintain intestinal permeability and villus height (26).

Received March 4, 2004; accepted July 27, 2004.

This research was funded in part by Clinical Research Unit & Institute of Biomedicine, Faculty of Medicine, Federal University of Ceará, Howard Hughes Medical Institute grant 55000645 and in part by National Institutes of Health grant AI26512.

Address correspondence and reprint requests to Aldo A.M. Lima, Clinical Research Unit & Institute of Biomedicine, Av. José Bastos no. 3312, Porangabussu, Fortaleza, Ce, Brazil CEP 60.000–000 (e-mail: aalima@veloxmail.com.br).

JOBNAME: gas 40#1 2005 PAGE: 2 OUTPUT: Tue November 30 21:42:22 2004
lww/gas/84141/MPG155122

We studied the effects of a modified World Health Organization (WHO) formula supplemented with glutamine on intestinal barrier dysfunction and weight gain in malnourished hospitalized children comparing it to glycine supplemented or unsupplemented formula.

METHODS

Study Design

The study was performed at Hospital Infantil Albert Sabin, a 330-bed tertiary medical facility in Fortaleza (population, 2.6 million), in the state of Ceará, Brazil. We studied moderately and severely malnourished hospitalized children between 2 and 60 months of age with or without diarrhea. The weight-for-age z-scores were less than −2 (more than 2 standard deviations below the median for the United States National Center for Health Statistics) (28). Informed consent was obtained from parents for each child's participation. From December 1996 to April 1999, 27 enrolled children received standard formula. From June 1, 2001 to June 30, 2002, 53 patients were randomly assigned to receive in double-blind fashion standard formula supplemented either with glutamine (mw 146 Da; 16.2 g/day) or glycine (mw 75.07 Da; 8.3 g/day) for 10 days. Randomization was achieved by means of computer generated random numbers. Odd or even numbers from this list were used to assign children to receive glutamine or glycine. Randomization was concealed so that the study investigators, physicians, nurses and medical caregiver staff were not aware of the supplement assignments. The individual preparing the glutamine or glycine supplements was not involved in data collection. The daily doses of glutamine or glycine were chosen to equal the molar equivalent of glucose (111 mM) in 1 liter of oral rehydration solution. Glycine was used as a comparison for glutamine because this amino acid is not considered a major metabolic fuel for enterocytes. Isomolar glutamine or glycine was given daily in three divided doses mixed with formula. The primary outcome was intestinal barrier function, measured by the lactulose/mannitol test, and the secondary outcome was weight gain. The protocol was approved by the Clinical Research Ethics Committees of the Federal University of Ceara and the University of Virginia.

After signed parental consent was obtained, we completed a standardized questionnaire recording patient identification number, treatment number, demographic and clinical information, weight and height measurements, results of permeability tests, blood biochemistry test results ordered by hospital physicians and results of stool exams for ova and parasites. The first treatment day started between 7–9 AM the morning after admission and test formula was given for 10 days. The inclusion criteria were as follows: a) age 2–60 months with a history of persistent diarrhea defined as three or more unformed stools/day for ≥14 days or a weight-for-age z-score less than −2; b) agreement to a 10-day hospitalization at Hospital Infantil Albert Sabin; and c) consent of parent or guardian. Children were excluded if they were: a) exclusively breast-fed, preventing adequate assessment of intake; b) intolerant to cow milk; c) participants in any other study within the previous 2 years; d) affected by severe infection or other illness at the time of screening including, but not limited to, shock, meningitis, tuberculosis and varicella; or e) affected by other systemic disease at the time of screening including, but not limited to, tumor and endocrine disorders. Patients discontinued participation for the following reasons: a) patient or guardian requested discontinuation from study; b) patient developed complicating illnesses needing treatment outside of the research unit, such as meningitis, tuberculosis or varicella; c) any unanticipated safety concerns; d) occurrence of serious adverse effects such as vomiting, abdominal distension, watery diarrhea associated with feeding regimen or other unexpected or severe adverse reactions, including death; and e) recurrence of dehydration after initial rehydration.

Standardized Nutritional Support

One group of children received a modified WHO formula standard in our hospital for therapy of malnutrition. The other two groups received formula supplemented with either glutamine or glycine. Formula feeding was started after admission as soon as the child was rehydrated. Supplemented or non-supplemented formula was given every 3 hours. The characteristics of the formulae used are shown in Table 1. We used the following re-feeding program. Children were given 130 ml/kg/day of MF-75 containing 75 kcal per 100 ml until the appetite returned (usually within 2–7 days). If children failed to take at least 80 kcal/kg/day, a nasogastric tube was used. When appetite returned, children were given 130 ml/kg/day of MF-100 containing 100 kcal/100 ml for 2 days, after which feeding volume was increased by 10 ml per feeding to a maximum of 200 ml/kg/day. According to routine practice at Hospital Infantil Albert Sabin, children received a single dose of vitamin A (<6 months, 50,000 IU; 6–12 months, 100,000 IU; and >12 months, 200,000 IU) on the first day. Folic acid, 5 mg on the first day and 1 mg/day thereafter, was also given.

Children without signs or symptoms of infection other than diarrhea were given sulfamethoxazole 25 mg/kg and trimethoprim 5 mg/kg orally in two divided doses daily every 12 hours for 5 days.

Microbiologic Studies

Cups for collecting stool specimens from study participants were distributed to the auxiliary nurses. The team was instructed to collect the first stool passed the day after admission. All stool

TABLE 1. *Composition of diet formulas MF-75 and MF-100*

Composition	Starter formula (MF-75)	Catch up formula (MF-100)
With cereal		
Whole dried milk (g)	35	100
Sugar (g)	70	50
Cereal flour (rice based cereal) (g)	35	35
Vegetable oil (g)	17	20
Electrolyte-mineral solution (ml)	20	20
Water: use to make up final solution to (ml)	1000	1000

Modified formula (MF) from World Health Organization, Geneva, 1999 (Reference 29).

JOBNAME: gas 40#1 2005 PAGE: 3 OUTPUT: Tue November 30 21:42:22 2004
lww/gas/84141/MPG155122

specimens were transported on ice and processed within 4 hours of collection. Bacterial cultures were not performed because all children had received antibiotics as described earlier. All specimens were examined initially by microscopy for ova and parasites and for leukocytes using iodine-stained and methylene blue-stained wet-mount preparations, respectively (30). Reducing substances (modified Clinitest, Bayer Corporation, Elkhart, IN) (31), qualitative fecal fat (32) and fecal occult blood (33) were examined in all stool specimens. Fecal lactoferrin was measured using a Leuko-test kit (Techlab, Blacksburg, Virginia). A fecal parasite concentrator (Evergreen Scientific, Los Angeles, CA) was also used to facilitate parasite examination. A modified acid fast stain was used for detection of *Cryptosporidium* (34).

Blood analyses on the day of admission were performed in the Central Hospital Infantil Albert Sabin Clinical Laboratory and included hemoglobin concentration, hematocrit, serum concentration of albumin, globulins, glucose, urea and creatinine.

Intestinal Permeability Test

After initial hydration, a lactulose/mannitol test was performed by the method of Barboza et al. (35). After a 3-hour fast, children ingested an aqueous solution (2 ml/kg; maximum volume 20 ml) of lactulose (200 mg/ml) and mannitol (50 mg/ml) and were not fed for 1 hour thereafter. Urine was collected for 5 hours in a flask containing 1 ml of chlorhexidine (40 mg/ml; Sigma Chemical, St. Louis, MO). Total 5-hour urine volume was recorded and a 5-ml aliquot was stored at −20°C for sugar determination by high-performance liquid chromatography with pulsed amperometric detection.

A urine sample (50 μl) was mixed with 50 μl of a solution containing melibiose (3.6 mM) diluted in 2.9 ml of twice-distilled and deionized water. After centrifugation 50 μl was used for sugar determination by high-performance liquid chromatography with pulsed amperometric detection. The BioLC carbohydrate analyzer high-performance liquid chromatography system was composed of a Module GPM-2 gradient pump, a Module EDM-II eluent degassing device and a PAD-II pulsed amperometric detector with a gold working electrode (Dionex, Sunnyvale, CA). A CarboPac MA-1 anion-exchange column (250 × 4.0 mm inner diameter, pellicular resin) with an associated guard column was also from Dionex. The sugars were eluted with an isocratic eluent of 480 mM NaOH at a flow-rate of 0.4 ml/min, with the column kept at room temperature. Sugars were determined with a pulsed amperometric detector as previously described (35). The samples were injected automatically (AS40Automated Sampler; Dionex) and the analyses were quantities using a BioAutoIon 450 Data System (Dionex).

The ratio of urinary excretion of lactulose (marker for mucosal damage) divided by urinary excretion of mannitol (marker for mucosal absorptive area) was used as the primary parameter to measure intestinal barrier function.

Anthropometry

Children were weighed daily, without clothes before the first meal, to the nearest 0.01 kg using a calibrated digital scale (Filizola Co., S. Paulo, Brazil). Length was measured supine to the nearest 0.1 cm using a standard anthropometry board at admission and after 10 days on the study protocol. Weight-for-age, height-for-age and weight-for-height Z scores were calculated using EpiNut (World Health Organization, Geneva; Epi Info version 6.0, Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta) (28). Kwashiorkor (protein-calorie malnutrition) was diagnosed if there was a characteristic combination of inadequate growth, loss of muscle tissue, increased susceptibility to infection, edema, dermatitis and sparse hair, with or without dyspigmentation (36). Marasmus (inanition) was diagnosed if there was failure to gain weight with muscle atrophy, hypotonia, loss of skin turgor and loss of subcutaneous fat (wrinkled and loose skin with a wizened face) (36). The secondary nutritional parameter used in the clinical protocol was weight change (in grams) after 10 days of treatment.

Sample Size Calculation

Lactulose/mannitol ratio was selected as the primary outcome variable because it is an objective measurement reflecting overall intestinal barrier function and surface area (19,20,35,37). Based on data from previous studies at Hospital Infantil Albert Sabin (38) we expected that children treated with glutamine-supplemented formula would have 30% reduction in lactulose/mannitol ratio compared to those taking nonsupplemented formula. Using a power of 80% and a two-sided significance level of 5%, a sample size of 23 for each group was considered adequate to detect a difference in the lactulose/mannitol ratio between groups. We assumed a possible loss to follow-up of 10% of subjects and thus estimated 26 children in each treatment group.

Statistical Analysis

The data were doubly entered and validated by cross-checking these two databases using Excel software (version 7.0; Microsoft Corporation, Redmond, WA). Data analyses were done using Statistical Package for Social Sciences software version 10.0 (SPSS, Chicago, IL). All variables were tested for homogeneity before applying statistical tests. We used Student's *t*-test to compare group differences, and categorical variables were tested by χ^2 or Fisher's exact test. The lactulose/mannitol ratio and excretions of lactulose and mannitol were log-transformed to normalize these parameters before applying Student's *t*-test. Linear regression analyses were also done for selected outcomes. All values were two-tailed and P values <0.05 were considered statistically significant.

RESULTS

Twenty-seven children were enrolled in the initial study using standard unsupplemented formula. Sixty children were assessed for eligibility for the supplemented formula trial and 53 (88%) were enrolled. Seven children were not enrolled for the following reasons: two had weight-for-age z-scores greater than −2 and did not meet criteria for at least moderate malnutrition, one was younger than 2 months of age, one had cow milk intolerance, one had low calorie intake, one had hypothyroidism and one had an abdominal tumor. Seventy-seven of 80 (96%) children had weight measurements before and after study. Three children in the nonsupplemented group had incomplete data. Three other children in the nonsupplemented

JOBNAME: gas 40#1 2005 PAGE: 4 OUTPUT: Tue November 30 21:42:22 2004
lww/gas/84141/MPG155122

group were considered dropouts (one discontinued at the mother's request, one became septic and one was transferred to another ward for treatment of anemia). One child in the glutamine-supplemented group was diagnosed with varicella on day 10 of the study. Because this child was transferred to another ward after the 10th day, he was not considered a dropout. Sixty-five children had lactulose/mannitol ratios both before and after 10 days of treatment. Eight children in the nonsupplemented group had incomplete data (five did not have the second lactulose/mannitol ratio and three were dropouts). One child in this group had a very high lactulose/mannitol ratio for unknown reasons and this ratio was excluded from final data analysis. Seven children in the supplemented groups did not have both lactulose/mannitol ratios done. Five (three in the glutamine group and two in the glycine group) had samples destroyed in transit to the Clinical Research Unit laboratory, one had a very low mannitol level (glutamine group) and it was presumed that the test solution had been improperly compounded and one (glutamine group) was not tested because he developed varicella on study day 10. Six children had clinical kwashiorkor or marasmus (one in the nonsupplemented group, two in the glutamine group and three in the glycine group). Three of the 80 children (3.8%) had celiac disease (one in the glutamine and two in the glycine group). One child in the nonsupplemented group had cystic fibrosis.

The clinical characteristics of the study children are shown in Table 2. At the start, was no significant difference among groups in age, sex, lactulose/mannitol ratio, weight-for-age, height-for-age and weight-for-height z-scores. All groups had mean weight-for-age z-scores of less than −3, characteristic of moderate to severe malnutrition. In the supplemented formula groups, three of 53 children (9%) had edema at admission (two in the glutamine group and one in the glycine group). A total of 57 (71%) of 80 had three or more liquid stools in the 24 hours before enrollment, 19 of 27 (70%) in the nonsupplemented group, 19 of 26 (73%) in the glutamine group and 19 of 27 (70%) in the glycine group. Most of the clinical histories of diarrhea suggested that the diarrhea was either recurrent or chronic (>30 days duration).

Table 3 summarizes the number of patients taking MF-75 or MF-100 supplemented diets during the 10 days of treatment in the formula supplemented groups. Twenty-six children received glutamine and 27 received glycine. In the first 2 days of the protocol all children used MF-75. On days 3–6 both MF-75 and MF-100 were used and their proportion was not significantly different between the glutamine and glycine groups. From days 7–10 all children received MF-100.

Caloric intake significant increased during the 10-day period in the glutamine group ($r^2 = 0.972$; $P < 0.001$) and the glycine group ($r^2 = 0.965$; $P < 0.001$). Caloric intake was not significantly different in the supplemented groups on any day of the study. On day 10 the mean caloric intake in the supplemented groups were similar (187 ± 56 and 191 ± 67 kcal/kg/day, respectively).

Figure 1 and Table 4 summarize the lactulose/mannitol ratio and the percent urinary excretion of lactulose and mannitol for all groups. In the glutamine supplemented group, the lactulose/mannitol decreased significantly between day 1 and day 10 (0.3129 ± 0.1025 versus 0.1044 ± 0.0175; $P = 0.01$; n = 21; paired Student's *t*-test after log-transformation to normalized these parameters), indicating a decrease in permeability. The lactulose/mannitol ratio did not change significantly in the nonsupplemented formula group (0.3842 ± 0.0629 versus 0.3610 ± 0.0613; P = not significant; n = 18; paired Student's *t*-test after log-transformation to normalized these parameters) or the group supplemented with glycine (0.3703 ± 0.1041 versus 0.1631 ± 0.0358; P = not significant; n = 25). The post treatment lactulose/mannitol ratio was significantly

TABLE 2. *Characteristics of children at baseline by treatment regimen*

Characteristics	Nonsupplemented formula control (n = 27)	Formula supplemented with glutamine[a] (n = 26)	Formula supplemented with glycine[a] (n = 27)
Age (months) Mean ± SD	11.19 ± 8.67	17.0 ± 12.09	13.77 ± 13.15
Sex			
Male	16 (62)	14 (53.8)	11 (40.7)
Female	10 (38)	12 (46.2)	16 (59.3)
Lactulose/mannitol ratio (Mean ± SEM)	0.3849 ± 0.0595	0.3129 ± 0.1025	0.3703 ± 0.1041
Nutritional status			
Weight-for-age	−3.80 ± 1.16	−3.50 ± 1.04	−3.49 ± 0.87
Height-for-age	−3.01 ± 1.85	−2.99 ± 1.60	−2.88 ± 1.67
Weight-for-height	−1.95 ± 2.64	−2.10 ± 0.96	−1.87 ± 2.71

Supplemented formula modified from World Health Organization (WHO, Geneva, 1999; Reference 29) with glutamine (MW 146; 16.2 g/day) or glycine (MW 75.07; 8.3 g/day).

For "Sex," the data are number of children (%). One child has missing data. The number of children with complete lactulose:mannitol ratio studies were 18, 21 and 25 for nonsupplemented formula control, glutamine group and glycine, respectively.

For "Nutritional Status," data are means ± SD of z-score of the US National Center for Health Statistics median reference (NCHS, 1997; Reference 28).

The characteristics of children were not significant different ($P > 0.05$) between groups.

JOBNAME: gas 40#1 2005 PAGE: 5 OUTPUT: Tue November 30 21:42:23 2004
lww/gas/84141/MPG155122

TABLE 3. *Children per day of the study protocol on modified World Health Organization liquid diet with MF-75 and MF-100*

	Formula supplemented with glutamine (n = 26)		Formula supplemented with glycine (n = 27)	
Day	MF-75	MF-100	MF-75	MF-100
1	26	–	27	–
2	26	–	27	–
3	14	12	10	17
4	11	15	8	19
5	4	22	5	22
6	1	25	1	26
7	–	26	–	27
8	–	26	–	27
9	–	26	–	27
10	–	26	–	27

MF-75 is a modified supplemented formula (see Table 1). MF-100 is a modified supplemented formula (see Table 1.).

The data show the number of children in each group and specific diet. The proportion of children of each specific diet did not show significant difference between groups ($P > 0.05$ by Chi square test or Fisher's exact test).

lower in both supplemented groups (Glutamine group $P < 0.001$; Glycine group $P = 0.023$; unpaired Student's t-test after log-transformation to normalized these parameters) compared to the nonsupplemented group. The percent urinary excretion of lactulose and mannitol were not significantly different when compared before and after 10 days treatment in any group.

All groups gained weight during nutritional therapy for 10 days. Mean total weight gain in the 24 unsupplemented children with complete weight data was 142 g (initial weight 5131 ± 449 g; end weight 5273 ± 472 g). The mean total weight gain of the 26 glutamine supplemented patients was 213 g (initial weight 6668 ± 535 g; end weight 6881 ± 535 g). The mean weight gain of the 27 glycine supplemented patients was 252 g (initial weight 5673 ± 512 g; end weight 5925 ± 529 g). There was no statistical difference among these mean weight gains although there was a trend toward higher mean weight gains in both supplemented groups. These results did not change when we excluded from the data analyses the children with edema, kwashiorkor or marasmus. These results were also similar when we included only children taking MF-100. We did not observe a significant change in weight-for-age z-scores after treatment in any group.

Stool samples from 60 children (19 in the glutamine group and 17 in the glycine group) were collected on study day 1 for laboratory examination. Twenty-seven of 60 (45%) had liquid stools (13 nonsupplemented, five glutamine and nine glycine) had liquid stools. Occult blood testing was positive in three of 24 children in the nonsupplemented group and was negative in all other patients. Reducing substances were found in two samples (one nonsupplemented and one glutamine). White blood

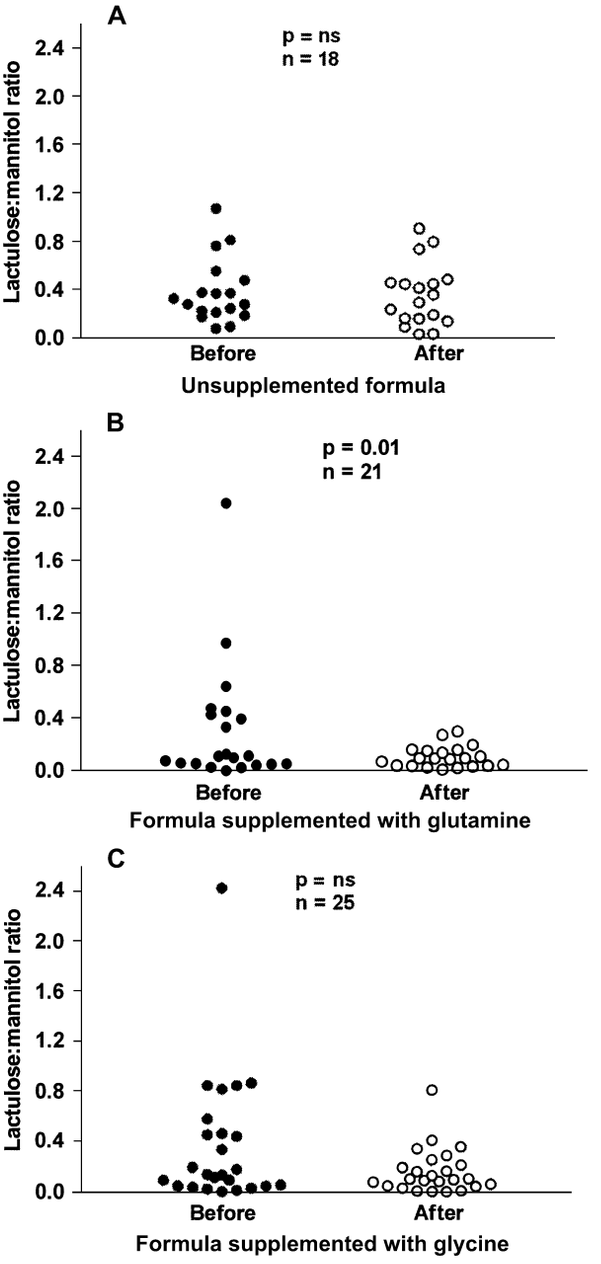


FIG. 1. The lactulose/mannitol ratio is shown before and after treatment with nonsupplemented formula control and with formula supplemented with glutamine or glycine. Panel **A** shows an insignificant change in the lactulose:mannitol ratio with nonsupplemented formula control. Panel **B** shows a significant decrease of the lactulose:mannitol ratio after treatment with formula supplemented with glutamine. Panel **C** shows an insignificant change in the lactulose:mannitol ratio with formula supplemented with glycine. The data were log-transformed to provide a normal distribution, and then analyzed using the paired Student's t-test. Values of $P < 0.05$ were considered significant. NS = not significant.

JOBNAME: gas 40#1 2005 PAGE: 6 OUTPUT: Tue November 30 21:42:25 2004
lww/gas/84141/MPG155122

TABLE 4. *Intestinal permeability parameters in children treated with nonsupplemented formula control, formula supplemented with glutamine or glycine*

Intestinal permeability test	Nonsupplemented formula control (n = 18)	Formula supplemented with glutamine (n = 21)	Formula supplemented with glycine (n = 25)
% Lactulose before	1.0470 ± 0.4571	0.9736 ± 0.4570	0.7835 ± 0.4020
% Lactulose after	1.3664 ± 0.5660	0.4695 ± 0.1293	0.4750 ± 0.1263
% Mannitol before	2.3805 ± 0.6670	3.4239 ± 0.6386	2.3816 ± 0.5406
% Mannitol after	4.2582 ± 1.1268	4.9184 ± 0.9481	3.8225 ± 0.9143
Lactulose/mannitol ratio before	0.3842 ± 0.0629	0.3129 ± 0.1025	0.3703 ± 0.1041
Lactulose/mannitol ratio after	0.3610 ± 0.0613	0.1044 ± 0.0175*	0.1631 ± 0.0358

The intestinal permeability parameters are as % urinary excretion of lactulose, mannitol and lactulose:mannitol ratio before and after 10 days treatment with glutamine or glycine control.

The data are shown as mean and standard error of mean; the data were log-transformed and applied paired Student's t-test before versus after treatment with nonsupplemented formula control, formula supplemented with glutamine or glycine.

*P = 0.01.

cells were seen in seven samples (six nonsupplemented and one glutamine). Lactoferrin was positive in 32 stool samples (12 nonsupplemented, 12 glutamine and eight glycine). White blood cells were found significantly more often in stools of nonsupplemented children (25%; $P < 0.05$) than in those given formula supplemented with glycine. Parasites were found in six children. Four nonsupplemented children had *T. trichiuris* (n = 1) and *Cryptosporidium* spp. (n = 3). One child given glycine supplement had *Entamoeba coli* and *Ascaris lumbricoides* and one child given glutamine had *Giardia lamblia*. Children with *T. trichuris*, *A. lumbricoides* or *Giardia* were treated with mebendazole or metronidazole, respectively. The parasitologic exam showed no significant differences between the groups at admission.

The mean duration (±SD) of diarrhea not significantly different between the glutamine (n = 19) and glycine (n = 18) groups (9 ± 0.07 days and 8 ± 3.03 days, respectively). Mean hemoglobin and hematocrit were below normal in glutamine group and normal in the glycine group. Mean total serum protein and albumin were below the normal range in both groups. Mean serum globulin concentration was normal in both groups. Serum urea was above the normal range and creatinine was normal in both groups. There were no significant differences between glutamine and glycine groups for any laboratory blood tests. One glutamine supplemented patient was human immunodeficiency virus positive by ELISA test. Nine of 26 (35%) in the glutamine group had abnormal chest radiographs, as did four of 27 (15%) in glycine group (P = not significant). Two patients had pneumonia on admission, one in the glutamine group and one in glycine group.

DISCUSSION

Although glutamine is considered a nonessential amino acid, its synthesis may not keep up with requirements during times of deprivation or stress, thus making it conditionally essential (39). In children with persistent diarrhea and malnutrition there is a theoretical rationale for supplementation with glutamine or its derivatives, although its clinical utility and biologic significance in children with diarrhea has not been proved. Malnourished children with diarrhea have decreased plasma glutamine concentration, and they often have complicating infections that increase the utilization of glutamine (25,34,38).

Several studies of malnutrition (16,19) and of acute and persistent diarrhea (17,18) have demonstrated a negative impact of these conditions on intestinal mucosal absorptive and barrier function. Ford et al. (40) studied 39 children with diarrhea and 28 control children undergoing duodenal biopsy and found that abnormal intestinal permeability was associated with diarrhea and with mucosal damage. Ford et al.'s report strongly suggested that the dual sugar permeability testing was a reliable and useful index of mucosal integrity and a measure of intestinal mucosal absorptive and barrier function. Lunn et al. (16) studied chronic diarrhea and malnutrition in Gambian children and found evidence of impaired intestinal mucosal absorption and barrier function in these children. Several studies have confirmed these findings and have documented the ability of the dual sugar permeability test to assess intestinal mucosal absorptive and barrier function (19,35,37,41–43). The permeability test is noninvasive, making it a valuable tool for clinical studies evaluating the impact of various therapies in the management of persistent diarrhea and malnutrition.

This study evaluates the effect of nonsupplemented formula and formula supplemented with glutamine or glycine on intestinal barrier function and weight gain in children with severe malnutrition. The children studied were similar in age, gender, initial intestinal permeability studies and nutritional status. Our study is in agreement with other reports (26,45) in which glutamine prevented diminution of intestinal mucosal barrier function in

JOBNAME: gas 40#1 2005 PAGE: 7 OUTPUT: Tue November 30 21:42:26 2004
lww/gas/84141/MPG155122

patients on total parenteral nutrition. Yalçin et al. (44) recently conducted a placebo-controlled double-blind, randomized trial of children 6 to 24 months old with acute diarrhea and found a significant decrease in duration of diarrhea in those supplemented with glutamine. This study suggested that the beneficial impact of glutamine was through effects on gastrointestinal mucosal function rather than effects on host immune responses. Ribeiro et al. (46) studied an oral rehydration solution containing 90 mM glutamine and compared its efficacy to standard WHO oral rehydration solution in infants 1 month to 1 year of age with acute noncholera diarrhea and dehydration. We chose our supplement based on the dose of glutamine, the amount of solution intake and safety information from this study. We chose an amount of glutamine (or glycine) equivalent to the molar amount of glucose (111 mM) in 1 liter of standard WHO oral rehydration solution. The concentration of glutamine or glycine in our modified supplemented formula was isosmolar, thus avoiding any effects of osmolality on the permeability test or on diarrheal symptoms (37,47). However, the glutamine and glycine consumed per day contained different amounts of nitrogen, 3.1 g and 1.6 g, respectively. The extra amide nitrogen present in glutamine might be physiologically significant in the synthesis of purines, pyrimidines and glucosamine (48).

The optimal duration of glutamine supplementation is uncertain. Our pilot data suggested that treatment with a smaller dose of glutamine added to regular hospital diet for 5 days prevented barrier function damage (38). Hence we decided to test a longer treatment regimen with an increased amount of glutamine. In both studies glutamine was given enterally. The advantage of enteral supplementation is that glutamine is delivered directly to the intestine (49,50). In in vitro studies in which glutamine was applied to Caco-2 cell monolayers, less bacterial translocation occurred when glutamine was applied to the apical versus the basolateral cell surface (51), suggesting that mucosal administration is the most efficacious route for supplementation. Rhoads et al. (52) found that when rat crypt cells (IEC-6) or piglet enterocytes (IPEC-J2) were cultured in glutamine-free medium and then exposed to glutamine for 24 hours, ^{3}H-thymidine incorporation in DNA increased by more than 20-fold. Exposure of intestinal cells to glutamine appears to activate a signaling pathway mediated by mitogen activated protein kinases within minutes; these include both extracellular signal related kinases and the nuclear kinase c-Jun (53). Although the mechanisms of glutamine effects in clinical studies are poorly understood, we postulate that glutamine may promote enterocyte proliferation.

The results of the current study are consistent with previous work (38,46,54) suggesting that enteral glutamine is safe and well tolerated in malnourished children with or without persistent diarrhea. In this study there were no dropouts as a result of unexpected safety concerns. Our previous work has not shown any abnormal renal or liver function after glutamine and no serious adverse events (38). There were no deaths in this study.

We added enteral glutamine or glycine supplements to a liquid diet based on the milk formulas F-75 and F-100 and given according to the WHO guidelines for the treatment of malnourished children (29). The study groups did not differ in the proportion of days receiving either MF-75 or MF-100. The mean caloric intakes were not significantly different among the groups throughout the study. Both supplemented and unsupplemented groups had a significant improvement in caloric intake as expected during the study. Results of stool examinations were not significantly different between groups; thus we believe that parasitic infection did not bias our results.

In conclusion, we found that enteral formula supplemented with glutamine was associated with an improvement in intestinal barrier function as measured by the lactose/mannitol ratio. We did not observe that supplementation with glutamine or glycine was associated with better weight gains than observed in patients treated with the standard WHO formula and protocol for malnourished children. Our study did not allow any conclusion regarding the impact of enteral supplements of glycine or glutamine on diarrhea.

Acknowledgments: We would like to acknowledge all children and their guardians for their permission to allow their children to participate in this approved protocol by our Ethical Clinical Research Committee. We also acknowledge all participating physicians, nurses, medical caregivers and laboratory technicians for their important work support on this study protocol.

REFERENCES

1. Ahmad OB, Lopez AD, Inoue M. The decline in child mortality: a reappraisal. *Bull World Health Organ* 2000;78:1175–91.
2. WHO. The world health report 2002: reducing risks, promoting healthy life. Geneva: World Health Organization, 2002.
3. Kosek M, Bern C, Guerrant RL. The Global Burden of Diarrhoeal Disease, as estimated from Studies Published 1992–2000. *Bull World Health Organ* 2003;81:197–204.
4. Pellletier DL, Frongillo EA, Habicht J-P. Epidemiologic evidence for a potentiating effect of malnutrition on child mortality. *Am J Public Health* 1993;83:1130–3.
5. Pelletier DL. The relationship between child anthropometry and mortality in developing countries: implications for policy, programs and future research. *J Nutr* 1994;124:2047S–81.
6. Pellletier DL, Frongillo EA, Schoroeder DG, Habicht J-P. A methodology for estimating the contribution of malnutrition to child mortality in developing countries. *J Nutr* 1994;124:2106S–22.
7. Yonn PW, Black RE, Moulton LH, Becker S. The effect of malnutrition on the risk of diarrheal and respiratory mortality in children <2 y of age in Cebu, Philippines. *Am J Clin Nutr* 1997;65: 1070–7.
8. Scrimshaw NS, Taylor CE, Gordon JE. Interactions of nutrition and infection. *Monogr World Health Organ* 1968;57:3–329.
9. Scrimshaw NS. Historical concepts of interactions, synergism and antagonism between nutrition and infection. *J Nutr* 2003;133: 316S–21.

JOBNAME: gas 40#1 2005 PAGE: 8 OUTPUT: Tue November 30 21:42:26 2004
lww/gas/84141/MPG155122

10. Keusch GT. The history of nutrition: malnutrition, infection and immunity. *J Nutr* 2003;133:336S–40.
11. Chandra RK. Nutrition and the immune system: an introduction. *Am J Clin Nutr* 1997;66:460S–3.
12. Scrimshaw NS, San Giovanni JP. Synergism of nutrition, infection and immunity: an overview. *Am J Clin Nutr* 1997;464S–77.
13. Guerrant DI, Moore SR, Lima AAM, Patrick P, Schorling JB, Guerrant RL. Association of early childhood diarrhea and cryptosporidiosis with impaired physical fitness and cognitive function four–seven years later in a poor urban community in Northeast Brazil. *Am J Trop Med Hyg* 1999;61:707–13.
14. Niehaus MD, Moore SR, Patrick PD, et al. Early childhood diarrhea is associated with diminished cognitive function 4–7 years later in children in a northeast Brazilian shantytown. *Am J Trop Med Hyg* 2002;66:590–3.
15. Guerrant RL, Kosek M, Lima AAM, Lorntz L, Guyatt H. Updating the DALYs for diarrhoeal disease. *Trends in Parasitology* 2002;18: 191–3.
16. Lunn PG, Northrop-Clewes CA, Downes RM. Intestinal permeability, mucosal injury, and growth faltering in Gambian infants. *Lancet* 1991;338:907–10.
17. Sullivan PB, Lunn PG, Northrop-Clewes C, et al. Persistent diarrhea and malnutrition: the impact of treatment on small bowel structure and permeability. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1992;14: 208–15.
18. Sullivan PB. Studies of the small intestine in persistent diarrhea and malnutrition: the Gambian experience. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2002;34:S11-13.
19. Campbell DI, Elia M, Lunn PG. Growth faltering in rural Gambian infants is associated with impaired small intestinal barrier function, leading to endotoxemia and systemic inflammation. *J Nutr* 2003; 133:1332–8.
20. Sullivan PB, Marsh MN, Mirakian R, et al. Chronic diarrhoea and malnutrition: histology of the intestinal mucosa lesion. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1991;12:195–203.
21. Lunn PG. The impact of infection and nutrition on gut function and growth in childhood. *Proc Nutr Soc* 2000;59:147–54.
22. Menzies IS, Laker MF, Pounder R. Abnormal permeability to sugars in villous atrophy. *Lancet* 1979;8152:1107–9.
23. Fürst P, Pogan K, Sthele P. Glutamine dipeptides in clinical nutrition. *Nutrition* 1997;13:731–7.
24. Scheppach W, Loges C, Bartram P, et al. Effect of free glutamine and alanyl-glutamine dipeptide on mucosal proliferation of the human ileum and colon. *Gastroenterol* 1994;107:430–4.
25. Carneiro-Filho BA, Bushen OY, Brito GA, et al. Glutamine analogues as adjunctive therapy for infectious diarrhea. *Curr Infect Dis Rep* 2003;5:114–9.
26. Van Der Hulst RRWJ, Van Kreel BK, Von Meyenfeldt MF, et al. Glutamine and the preservation of gut integrity. *Lancet* 1993;341: 1363–5.
27. Calder PC. Glutamine and immune system. *Clin Nutr* 1994;13:2–8.
28. National Center for Health Statistic. Growth curves for children birth–18 years. Washington, D.C.: United States Department of Health Education and Welfare, Vital and Health Statistics 1977; Series 11, number 165.
29. World Health Organization. Management of severe malnutrition: a manual for physicians and other senior health workers. Geneva: World Health Organization, 1999.
30. Harris JC, Dupont HL, Hornick BR. Leukocytes in diarrheal illness. *Ann Intern Med* 1972;76:697–703.
31. McAuliffe MILT. Prevalencia de enteropatogenos em pacientes infectados pelo virus da imunodeficiencia humana: enfoque na *Escherichia coli* enteroagregativa. Dissertação de mestrado, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, 1998.
32. Ghosh SK, Littlewood JM, Goddard D, Steel AE. Stool microscopy in screening for steatorrhoea. *J Clin Pathol* 1977;30:749–53.
33. Simon JB. Fecal occult blood testing: clinical value and limitations. *Gastroenterologist* 1998;6:66–78.
34. Lima AAM, Moore SR, Barboza MS, et al. Persistent diarrhea signals a critical period of increased diarrhea burdens and nutritional shortfalls: a prospective cohort study among children in Northeastern Brazil. *J Infect Dis* 2000;181:1643–51.
35. Barbosa Jr MS, Silva TMJ, Guerrant RL, et al. Measurement of intestinal permeability using mannitol and lactulose in children with diarrheal diseases. *Braz J Medical Biol Res* 1999;32:1499–4.
36. Nelson WE, Behrman RE, Kliegman RM, Arvin AM. *Textbook of Pediatrics: Nutritional Disorders*, 15th ed. Philadelphia: WB Saunders, 1996:166–84.
37. Lima AAM. Glutamina e alanil-glutaminil-glutamina: síntese química, efeito no transporte de água, eletrólitos e permeabilidade intestinal. Tese de Titular em Farmacologia, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, 1998.
38. Lustosa AMP. Efeito da glutamina na permeabilidade intestinal, evolução clínica e toxicidade renal em crianças com diarréia persistent e desnutrição. Dissertação de Mestrado em Farmacologia, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, 2001.
39. Lacey JM, Wilmore DW. Is glutamine a conditionally essential amino acid? *Nutr Rev* 1990;48:297–9.
40. Ford RPK, Menzies IS, Phillips AD, et al. Intestinal sugar permeability: relationship to diarrhoeal disease and small bowel morphology. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1985;4:568–74.
41. Bao Y, Silva TMJ, Guerrant RL, et al. Direct analysis of mannitol, lactulose and glucose in urine samples by high performance anion-exchange chromatograph with pulse amperometric detection: clinical evaluation of intestinal permeability in human immunodeficiency virus infection. *J Chromatog B Biomedical Appl* 1996;685:105–12.
42. Lima AAM, Silva TM, Gifoni AM, et al. Mucosal injury and disruption of intestinal barrier function in HIV-infected individuals with and without diarrhea and cryptosporidiosis in northeast Brazil. *Am J Gastroenterol* 1997;92:1861–6.
43. Cummins AG, Thompson FM, Butler RN, et al. Improvement in intestinal permeability precedes morphometric recovery of the small intestine in coeliac disease. *Clin Sci* 2001:379–86.
44. Yalçin SS, Yurdakok K, Tezcan I, et al. Effect of glutamine supplementation on diarrhea, interleukin-8 and secretory immunoglobulin A in children with acute diarrhea. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2004;38:494–501.
45. Li J, Langkamp-Henken B, Suzuki K, et al. Glutamine prevents parenteral nutrition-induced increase in intestinal permeability. *J Paenteral Enteral Nutr* 1994;18:303–7.
46. Ribeiro H, Ribeiro T, Mattos A, et al. Treatment of acute diarrhea with oral rehydration solution containing glutamine. *J Am Coll Nutr* 1994;13:251–5.
47. Travis S, Menzies I. Intestinal permeability: functional assessment and significance. *Clin Sci* 1992;82:471–88.
48. Neu J, Auestad N, DeMarco VG. Glutamina metabolism in the fetus and critically ill low birth weight neonate. *Adv Pediatr* 2002;49: 203–26.
49. Windmueller HG, Spaeth AE. Intestinal metabolism of glutamine and glutamate from the lumen as compared to glutamine from blood. *Arch Biochem Biophys* 1975;171:662–72.
50. Pinkus LM, Windmueller HG. Phosphate-dependent glutaminase of small intestine and localization and role in intestinal glutamine metabolism. *Arch Biochem Biophys* 1977;182:506–17.
51. Panigraphi P, Gewolb IH, Bamford P, et al. Role of glutamine in bacterial transcytosis and epithelial cell injury. *J Parenter Enteral Nutr* 1997;21:75–80.
52. Rhoads JM, Argenzio RA, Chen W, et al. L-Glutamine stimulates intestinal cell proliferation and activates mitogen-activated protein kinases. *Am J Physiol* 1997;35:G943–53.
53. Rhoads JM, Argenzio RA, Chen W, et al. Glutamine metabolism stimulates intestinal cell MAPKs by a cAMP-inhibitable, Raf-independent mechanism. *Gastroenterology* 2000;118:90–100.
54. Thompson SW, McClure BG, Tubman TRJ. A randomized, controlled trial of parenteral glutamine in ill, very low birth-weight neonates. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2003;37:550–3.

JOBNAME: gas 40#1 2005 PAGE: 1 OUTPUT: Fri December 10 17:08:18 2004
lww/gas/84141/MPG155730
Prod #: MPG155730
MS #xxx

Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition
40:24–25 © January 2005 Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia

Editorial

Glutamine for Childhood Malnutrition: Probably Not Needed

Judith M. Sondheimer

Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition, University of Colorado Health Sciences Center, Denver, Colorado, U.S.A.

A great deal has been written about glutamine and the gut (1), its role as an intestinal fuel, its impact on electrolyte and fluid transport and its impact on diarrhea. It is reasonable to ask whether glutamine might benefit malnourished children who often have diarrhea and who are said to have immunodeficiency, increased intestinal permeability to macromolecules and impaired digestive and absorptive functions. In this issue of *The Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, Lima et al. evaluated the impact of enteral glutamine in childhood malnutrition (2). They studied 80 malnourished, hospitalized Brazilian infants using two outcome measures: weight gain and change in intestinal permeability, measured by the ratio of intestinal lactulose and mannitol absorption (L/M ratio). First, the authors obtained control data from 27 malnourished children from 2 to 60 months of age. They obtained L/M ratios on the children before study. They then fed the infants according to a standard WHO re-feeding protocol for moderate to severe malnutrition, weighing the patients daily. After 10 days they repeated the L/M ratio. Two years later, they enrolled another group containing 53 patients of the same age and degree of malnutrition. They used the same feeding protocol (double blind, random assignment), but they added glutamine or glycine to the formula in equimolar amounts. They monitored weight and obtained L/M ratios before and after 10 days of therapy. Thus, there were two controls for the glutamine supplemented group: an unsupplemented group and a group supplemented with glycine, an amino acid not felt to be conditionally essential in hyper metabolic states or to play a role as an intestinal fuel.

The authors found that weight gain in the three groups was statistically similar. Calorie intake was also similar. There was a statistically significant decrease in L/M ratio after re-nutrition in the glutamine-supplemented group compared with the unsupplemented and the glycine-supplemented control groups. A decrease in L/M ratio is felt to reflect an improvement in the permeability barrier function of the intestine. Since about 70% of the study children had diarrhea on enrollment, the authors looked at the responses of these children separately. They found no difference in weight gain or duration of diarrhea between children receiving glycine and glutamine supplementation. Amount of stool output was not measured.

There are a number of criticisms that can be made of this study. Two very simple measurements and a very short therapeutic intervention were used to study a complex problem. Only 65 of the 80 children had pre- and post-treatment L/M ratios. Two years separated the study of the non-supplemented control group from the supplemented groups. Although the authors stated that they excluded children with serious underlying disease, they included 3 children with celiac disease, one with cystic fibrosis and one who developed varicella on the last day of the intervention. The conditions in these 5 children would very likely have had an impact on weight gain and permeability measurements. Since these 5 children account for 8% of the children with complete L/M ratio data, their inclusion leaves questions about significance of the conclusions about the impact of glutamine on permeability.

Although many writers, including the authors of this paper, refer to the L/M ratio as a measure of intestinal function, an association between the L/M ratio and the most important intestinal function, the digestion and absorption of fat, carbohydrate and protein is uncertain. For example, does the percentage of fat excretion on a quantitative 3-day collection vary directly with the L/M ratio? Does the amount of intact protein absorbed from the intestine vary directly with the L/M ratio? No one has put questions like these to the test. In this study, was the magnitude of the change in the L/M ratio in the glutamine-supplemented children associated with any clinically important aspect of their malnourished state or their recovery there from? This study does not suggest that it was, but more careful assessment of other abnormalities associated with malnutrition besides weight

Address correspondence and reprint requests to Dr. Judith M. Sondheimer, University of Colorado Health Sciences Center, Denver, Colorado, U.S.A. (e-mail: sondheimer.judith@tchden.org).

JOBNAME: gas 40#1 2005 PAGE: 2 OUTPUT: Fri December 10 17:08:19 2004
lww/gas/84141/MPG155730

will be needed to answer this question. One thing is clear from this paper. It is premature to consider using glutamine as adjunct therapy in malnourished infants because of its impact on the L/M ratio.

The L/M ratio is often discussed in ways that suggest it is a good measure of global intestinal health or integrity. This is an overstatement. We need specifics on what this easy-to-use measure really reveals about the digestive, absorptive, secretory and permeability functions of the intestine. In the past, the xylose absorption test was similarly said to be a measure of ''intestinal function'' or ''intestinal surface area.'' It was soon apparent that intestinal function and the disorders causing damage to the intestine were too varied and complex to be confirmed or quantitated by this simple test, and more disease-specific tests were needed. The same criticism applies to the L/M ratio. Does a particular L/M ratio really translate into a quantifiable and predictable pathologic absorption of toxic or immunogenic macromolecules, with a predictable loss of electrolyte and water per cm of intestine, with predictable and consistent abnormalities of immune function, with a particular level of bacterial translocation, or other important intestinal functions? Or is the L/M ratio an overly sensitive test that is likely to be abnormal in whatever disease state you choose to name? Certainly the list of disorders reported to be associated with abnormal L/M ratio is large and includes head injury, cirrhosis, autism, intestinal surgery, infection, malnutrition, intestinal allergy and celiac disease (3–7). Research needs to identify the common thread among these disorders that leads to abnormal test results.

This study asked an important question about a controversial subject and concluded that glutamine supplementation did not improve on the standard WHO re-feeding program for moderate to severe malnutrition in either early weight gain or caloric intake. Although the numbers were small, another important negative finding was that glutamine supplementation did not produce a reduction in duration of diarrhea. This important information, negative though it is, refocuses attention on the fact that the WHO guidelines for re-nutrition of moderately and severely malnourished children without the use of expensive supplements are still appropriate for initial therapy. The authors of this study are to be congratulated for reporting what they saw. Treatment of malnutrition may not be changed by this study, but an important question has been answered about glutamine supplementation, and an attractive sounding, but probably unnecessary, therapy can be confidently avoided.

REFERENCES

1. Rhoads M. Glutamine is the gas pedal but not the Ferrari. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2004;38:479–83.
2. Lima AA, Brito LFB, Ribeiro HB, et al. Intestinal barrier function and weight gain in malnourished children taking glutamine supplemented enteral formula. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2005; 40:28–35.
3. Matejovic M, Krouzecky A, Rokyta R, et al. Effects of intestinal surgery on pulmonary, glomerular, and intestinal permeability and its relation to the hemodynamics and oxidative stress. *Surg Today* 2004;34:24–31.
4. Arvola T, Moilanen E, Vuento R, Isolauri E. Weaning to hypoallergenic formula improves gut barrier function in breast-fed infants with atopic eczema. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2004; 38:92–6.
5. Hang CH, Shi JXZ, Li JS, Wu W, Yin HX. Alterations of intestinal mucosa structure and barrier function following traumatic brain injury in rats. *World J Gastroenterol* 2003;9:2776–81.
6. Pascual S, Such J, Esteban A, et al. Intestinal permeability is increased in patients with advanced cirrhosis. *Hepatogastroenterology* 2003;50:1482–6.
7. D'Eufimia P, Celli M, Finocchiara R, et al. Abnormal intestinal permeability in children with autism. *Acta Pediatrr* 1996;8: 1076–9.

Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition
40:526–527 © April 2005 Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia

Letters to the Editor

Glutamine for Childhood Malnutrition: Is It Needed?

To the Editor: First we would like to acknowledge the editorial by Sondheimer (1) on our article published in January 2005 by the *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* (2), which raised several criticisms and questions that deserve further comment. We agree that the vicious cycle of diarrheal disease and malnutrition is a complex problem and that very little is known about its physiopathology, prevention and effective treatment. However, we think that it is also premature to conclude from our article that glutamine can be ''confidently avoided'' in the treatment of childhood malnutrition or diarrheal disease. After almost three decades working with these problems in the community, the hospital and at the laboratory bench, we still think that nutrients and diet-derived compounds (including glutamine, arginine, glutamate, glycine, glutathione, vitamin A, zinc and specific lipids) deserve further study to define their potential therapeutic roles in this complex and vicious cycle of malnutrition and diarrheal diseases (3).

Clinical trials of children with moderate to severe malnutrition and diarrheal diseases are difficult to conduct because these children have a high risk of complications (2) such as sepsis, pneumonia and other systemic infections, as noted in our article. These systemic infections may be caused by bacterial translocation from the gut, as suggested by other studies (4). Recent studies on barrier function, protein structure and co-regulation show evidence of the participation of these nutrients and diet-derived compounds, including glutamine (5). Data using mannitol and lactulose as molecular probes to measure intestinal barrier functions *in vitro* and *in vivo* have been very consistent and well accepted in the literature (5,6). The specificity of the permeability test related to diseases, on the other hand, is an issue that indeed deserves further study. Consistent with this work is the recent paper by Seth et al. (5) showing that glutamine induced a rapid increase in the tyrosine phosphorylation of epidermal growth factor receptor and this was the key to preventing acetaldehyde-induced disruption of the tight junction and increasing the paracellular permeability in the Caco-2 cell monolayer. In addition to the proliferation effect of glutamine, other specific mechanisms may also be possible. The proliferation effect itself has stimulated several additional studies to address these questions. Further clinical studies are needed to examine how glutamine or other nutrients and micronutrients may be used to repair intestinal damage and prevent the bacterial translocation and infection complications often seen in childhood malnutrition and diarrheal diseases.

In our study, weight gain was considered a secondary parameter because the study's sample size was not calculated for it. If one does look at weight gain, however, the trend is for it to increase with the diet supplemented with glutamine or glycine compared with the non-supplemented diet. Furthermore, as shown by Amadi et al. (7), demonstrating the effects of optimal nutritional management likely requires longer than our 5 days of in-hospital treatment. In addition, there is the potential intestinal trophic effect of glycine, which, along with other amino acids such as glutamate and cysteine, is a precursor for intestinal synthesis of glutathione and functions as gut protection (8). This is also consistent with the decreasing intestinal permeability seen with glycine, as shown in our study but not seen with the non-supplemented diet.

Regarding diarrheal disease duration, the sample size was not designed to judge this parameter. We now think that glycine is not a good control for glutamine because both have a trophic effect on intestinal mucosa. Further studies of malnutrition and diarrheal diseases are needed with a good control, sample size and longer durations of treatment and follow-up to address these questions. Yalçin, et al. (9) recently reported that glutamine shortens the duration of diarrhea but they used a better sample size and glucose as control, which makes more scientific sense for that purpose.

Regarding the possible influence of underlying diseases, celiac disease, cystic fibrosis and varicella on the permeability test results, when we excluded the children with these diseases there was no change in the permeability effect seen with the diet supplemented with glutamine. Those diseases were detected and diagnosed after the children entered the study protocol. Because we were using intent-to-treat analyses, we kept these children in our original analysis.

In conclusion, we appreciate Dr. Sondheimer's comments but do not agree that this or similar approaches should be ''confidently avoided'' or ''probably not needed'' to treat childhood malnutrition or diarrheal diseases but rather that optimal cost-effective approaches must be developed to avoid this devastating cycle that has lasting effects on the world's poorest children.

Aldo A. M. Lima
Richard L. Guerrant
Clinical Research Unit & Institute of Biomedicine/Center for Global Health, Faculty of Medicine, Federal University of Ceará, Fortaleza, CE, Brazil and Center for Global Health, University of Virginia, Charlottesville, Virginia

REFERENCES

1. Sondheimer JM. Glutamine for childhood malnutrition: probably not needed. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2005;40:24–5.
2. Lima AAM, Brito LFB, Ribeiro HB, et al. Intestinal barrier function and weight gain in malnourished children taking glutamine supplemented enteral formula. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2005;40:28–35.
3. Ziegler TR, Evans ME, Fernández-Estívariz C, et al. Trophic and cytoprotective nutrition for intestinal adaptation, mucosal repair, and barrier function. *Annu Rev Nutr* 2003;23:229–61.
4. Furst P, Pogan K, Sthele P. Glutamine dipeptides in clinical nutrition. *Nutrition* 1997;13:731–7.
5. Seth A, Basuroy S, Sheth P, et al. L-Glutamine ameliorates acetaldehyde-induced increase in paracellular permeability in Caco-2

cell monolayer. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2004;287: G510–7.
6. Bruewer M, Hopkins AM, Hobert ME, et al. RhoA, Rac1, and Cdc42 exert distinct effects on epithelial barrier via selective structural and biochemical modulation of junctional proteins and F-actin. *Am J Physiol Cell Physiol* 2004;287:C327–35.
7. Amadi B, Mwiya M, Chomba E, et al. Improved nutritional recovery on an elemental diet in Zambian children with persistent diarrhoea and malnutrition. *J Trop Pediatr* 2004 Dec 15; [Epub ahead of print].
8. Duggan C, Gannon J, Walker WA. Protective nutrients and functional foods for the gastrointestinal tract. *Am J Clin Nutr* 2002;75:789–808.
9. Yalçin SS, Yurdakok K, Tezcan I, et al. Effect of glutamine supplementation on diarrhea, interleukin-8 and secretory immunoglobulin A in children with acute diarrhea. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2004;38:494–501.

UFC
10TH TROPICAL MEDICINE
RESEARCH CENTER
& INTERNATIONAL COLLABORATION
IN INFECTIOUS DISEASES RESEARCH
IV INTERNATIONAL
SYMPOSIUM IN
BIOMEDICINE
March 09th – 13th, 2006 Fortaleza, Ceará, Brazil

TRMC 10th Annual Meeting Coordinator
Dr.Aldo A.M. Lima

Executive Committee
Dr. Aldo A.M. Lima
Dr. Reinaldo B. Oriá
Dr. Luis Carlos Rey
Dr. Mônica O. B. Oriá
Dr. Mônica C. Façanha.
Dr. Noélia L. Lima
Dr. Anastácio Queiroz de Sousa

Scientific Program Committee
Dr. Edgar M. Carvalho
Dr. Selma M. B. Jerônimo
Dr. Aldina Barral
Dr. Aldo A. M. Lima
Dr. Reinaldo B. Oriá
Dr. Amélia de Jesus Almeida
Dr. Richard L. Guerrant
Dr. Warren Johnson
Dr. Lee W. Riley
Dr Albert Ko

Publication, Marketing & Design Committee
Dr. Alberto Melo Soares
Dr. Reinaldo B. Oriá
Mr. Francisco Sousa Junior
Dr. Mônica O. B. Oriá

Social Committee
Dr. Noélia L. Lima
Dr. Mônica O. B. Oriá
Mr. José Amadeus Souza
Mrs. Fabiana M. da Silva Nascimento

Glutamine alone and combination with zinc and retinol on intestinal barrier function, diarrheal diseases morbidity and growth in undernourished children in the northeast of Brazil

Lima AAM[1,2], Soares A[1], Lima NL[1], Mota RMS[1], Oriá RB[1], Pinkerton R[2] Guerrant RL[1,2]

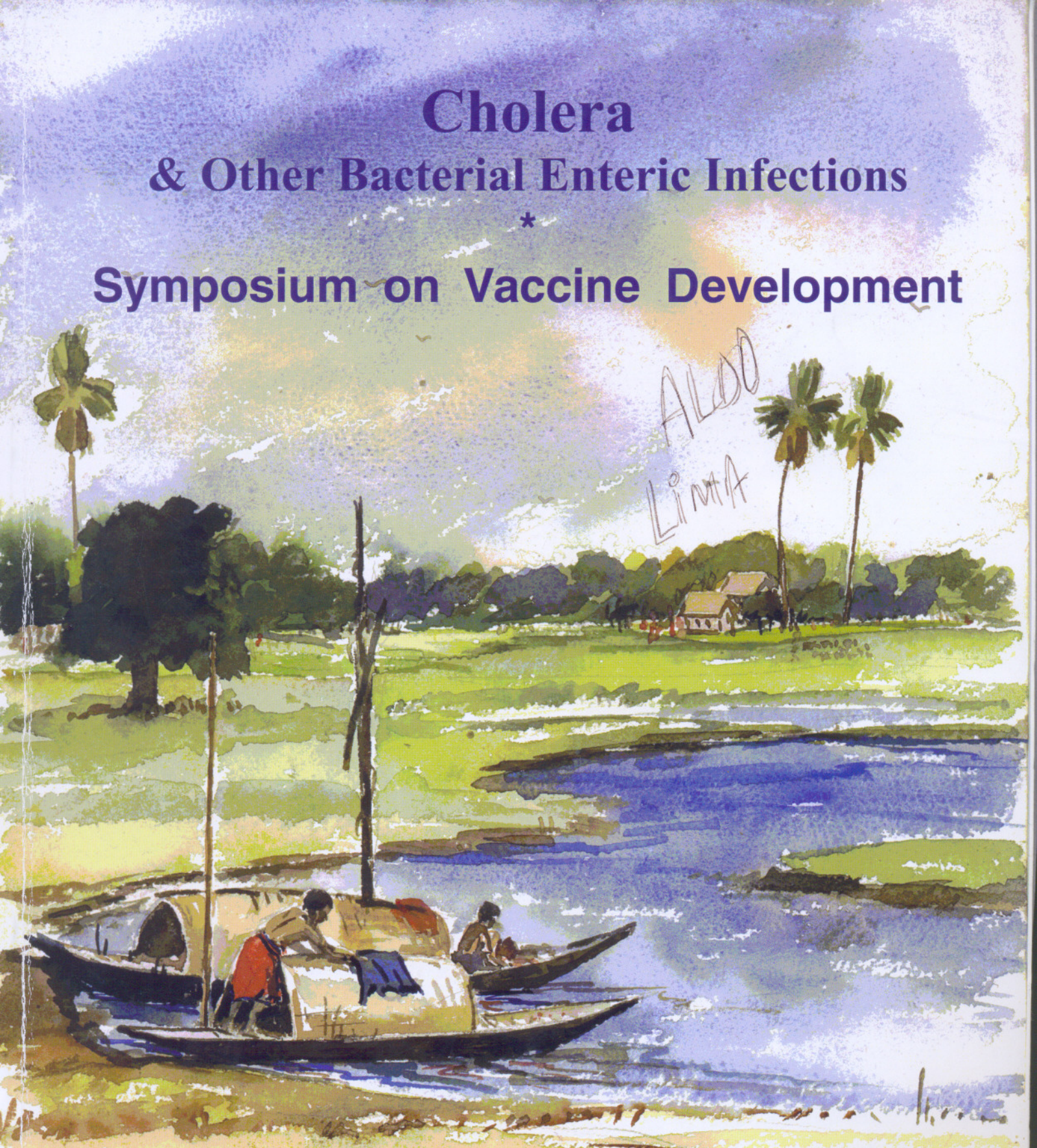
1 Federal University of Ceará, Fortaleza, CE, Brazil
2 University of Virginia, Charlottesville, VA. USA

Objective: The major objective was to investigate the impact of glutamine, zinc, and retinol alone or the combinations of glutamine plus zinc, glutamine plus retinol, zinc plus retinol or glutamine plus zinc plus retinol on intestinal barrier function, diarrheal diseases morbidity and growth in undernourished children in an urban community in the northeast of Brazil.
Methods: Children aged 2 months to 8 years with a height-for-age z-score less than the median -0.06 were studied after signed the consent form. From June 2000 to October 2005, 278 studied children received either zinc (40 mg twice weekly for 12 months) or zinc placebo (zinc vehicle, tangerine juice, twice weekly for 12 months), retinol (100,000 IU for children under 12 months old or 200,000 IU for children at least 12 months old each four months at day 1 , 4 and 8 months) or placebo vitamin A (tocopherol 40 IU at day 1, 4 and 8 months), glutamine (16.2 g/day for ten days, start at 1 mo.) or placebo glutamine (glycine 8.3 g/day for ten days, start at 1 mo.). Diarrhea morbidity was recorded daily from a twice weekly active surveillance system for 12 months. Lactulose:mannitol excretion ratio was used as a measure of intestinal permeability and it was performed at day 1, 1 mo., 1.5 mos. and 4 mos. of the study protocol. Age, sex, weight and height were collected on day 1, 1mo., 1.5 mos., 4 mos., 8 mos. and 12 mos. of the study protocol.
Results: Patients were similar on admission with regard to age, sex, nutritional status (except for HAZ on one group) and lactulose:mannitol ratio. Glutamine or zinc alone significantly improved (decreased) percent lactulose excretion up to four and one and a half month follow-up period, respectively. Zinc plus retinol improved lactulose excretion at long-term follow-up 4 months. Glutamine alone significantly reduced excretion of mannitol during the whole follow-up period and retinol alone reduced percent mannitol excretion at long-term evaluation (4 months). Zinc alone or any other combinations of micronutrients did not change percent mannitol excretion. Glutamine plus retinol significantly improved (decreased) lactulose:mannitol ratio the whole follow-up periods. Glutamine plus zinc also improved lactulose:mannitol ratio at long-term follow-up 4 months. Placebos control, glutamine, zinc alone, glutamine plus zinc or zinc plus retinol reduced significantly HAZ z-score during follow-up periods. However, glutamine plus retinol increased significantly HAZ z-score at 1.5 and 4 months periods of time. Glutamine, zinc, retinol alone or glutamine plus zinc had a significantly improvement on WHZ z-score during the follow-up periods.

The proportion of diarrhea reduced significantly only in the glutamine combined with zinc and retinol.

Conclusions: Glutamine, zinc, glutamine plus retinol or zinc plus retinol supplemented diet repaired intestinal lesion in undernourished children. Glutamine, zinc and retinol alone or glutamine plus zinc prevented and decreased wasting in undernourished children. Glutamine plus retinol, but not other micronutrients alone or combinations, prevented and decreased significantly stunting in undernourished children. The combination of glutamine, zinc, and retinol decreased diarrheal diseases morbidity in undernourished children in the northeast of Brazil.

Cholera
& Other Bacterial Enteric Infections
*
Symposium on Vaccine Development



40th Annual Panel Meeting
United States - Japan
Cooperative Medical Science Program
Boston, Massachusetts
November 30 - December 2, 2005

Alanyl-glutamine improves intestinal barrier function and weight gain in malnourished children with a high risk for diarrheal diseases

Lima NL, Mota RMS, Lima BL, Monteiro, HSA, Guerrant RL, Lima AAM.

Federal University of Ceara, Fortaleza, CE, Brazil and University of Virginia, CHO., VA.

alima@baydenet.com.br

OBJECTIVE: We examined the effect of alanyl-glutamine (AG) or glycine (G) diet supplement on intestinal barrier function and weight gain in children with a high risk for diarrheal disease at urban community in the Northeast of Brazil.

METHODS: 107 children aged 7.9 to 82.2 months with a weight-for-age, height-for–age or weight-for-height z-score less than -1 were studied. From July 2003 to November 2004, 51 study patients received 24g/d AG and 56 received G control (isonitrogenous amount, 25g/d) for 10 days. Lactulose/mannitol excretion ratio was used as a measure of intestinal barrier function and was performed on days 0 and 10 of nutritional supplementation. Weight and height were measured on days 0, 10, 30 and 120 of the protocol.

RESULTS: Patients were similar on admission with regard to age, sex, nutritional status and lactulose/mannitol ratio. The % lactulose urinary excretion significantly improved (decreased) in children receiving AG for 10 days but not in controls receiving glycine. In both groups weight-for-height z-score were significantly improved over time 0 on days 10, 30 and 120, but weight-for-age z-scores showed further improvements at day 120 over days 10 and 30 only for AG.

CONCLUSION: Diet supplemented with AG improves intestinal barrier function compared with glycine control and it augments weight-for-height z-scores over longer-term growth evaluations in children with a high risk for diarrheal diseases.

International Centers for Tropical Disease Research Network

14TH ANNUAL MEETING 2005

RESEARCH BEYOND BOUNDARIES

NIAID

Poster #06

ACUTE PHASE EVALUATION OF VITAMIN A, ZINC AND GLUTAMINE SUPPLEMENTATION ON INTESTINAL EPITHELIAL INTEGRITY, LINEAR GROWTH AND DIARRHEA DISEASES IN CHILDREN FROM NORTHEAST OF BRAZIL

Aldo A.M. Lima[1,3], Alberto M. Soares[1], Milena M. Vieira[1], Noélia L. Lima[1], Reinaldo B. Oriá[1], Mary V. Gamble[2], William S. Blanner[2], Richard L. Guerrant[1,3]

[1] Federal University of Ceará, Fortaleza, CE, Brazil; [2] Columbia University, New York, NY, USA; [3] University of Virginia, Charlottesville, VA, USA

Background: Micronutrient deficiencies are common in children with diarrhea and enteric infections in developing areas. As vitamin A, zinc, glutamine, and arginine may synergistically enhance intestinal injury repair, micronutrient replacement with zinc, vitamin A, glutamine or arginine may be critical for the host to repair adequately the barrier disruption from intestinal infections.

Objective: We evaluated the effects of vitamin A, zinc and glutamine therapy on short and intermediate recovery from disrupted bowel function, linear growth and diarrhea burden on higher risk children for diarrheal diseases and malnutrition.

Design and Methods: The study was a double-blind, controlled clinical trial on children from two months to eight years who lived in an urban community in Fortaleza, CE. Children who experienced any episode of persistent diarrhea or who had HAZ <-0.06, the median value from children in this local population, were eligible for the study protocol. The study interventions were vitamin A (or vitamin E placebo), zinc (or taste-matched vehicle placebo) and vitamin A plus zinc for 16 weeks (acute phase intervention), with the nested study to include glutamine (or equimolar glycine) for 10 days (starting at week four). Study agent, administration and duration were as follow: vitamin A for <12 months 100,000 IU, ≥12 months of age 200,000 IU, given at 0 and 16 weeks; zinc 40 mg twice/week; and oral glycine 8.3gm/d for 10 days, and oral glutamine 16.2gm/d for 10 days. Diarrhea burden, nutritional practices, fecal and blood samples were collected using a prospective twice weekly surveillance system. Anthropometric measurements (height and weight) and intestinal permeability tests were done at zero, one month, one and a half months and four months.

Results: Preliminary results on 102 children are reported. In all serum retinol measured none were severe deficient (≤0.35μM), 2.9% (3/102) had moderate (0.36-0.70μM), 20.6% (21/102) had mild (0.71–1.05μM) and 76.5% (78/102) had sufficient (>1.05μM) vitamin A serum levels. Fifty one percent (50/97) of the lactulose:mannitol (L/M) ratios were below the mean from healthy children in the same geographic area. Carotenoids, lutein ($p=0.001$), β-cryptoxanthin ($p=0.016$) and β-carotene ($p=0.009$), were significantly inverse correlations with L/M ratio. Acute phase proteins, C-reactive protein (CRP) and α_1-acid glycoprotein (AGP), were significantly inversely correlated with retinol ($R^2=0.363$, $p=0.001$, $N=80$ and $R^2=0.358$, $p=0.002$, $N=72$, respectively). Retinol was significantly correlated with retinol binding protein (RBP: $R^2=0.447$, $p<0.001$, $N=99$) and transthyretin (TTR: $R^2=0.453$, $p<0.001$, $N=96$).

Conclusions: Low serum levels of carotenoids are correlated with disruption of intestinal barrier function. In addition, Serum retinol is functional correlated with RBP and TTR and inversely correlated with AGP and CRP (acute phase proteins), measured in the serum of these children. RBP and TTR were good surrogate measures for serum retinol in this population with a low prevalence of vitamin A deficiency.

International Centers for Tropical Disease Research Network

13TH ANNUAL MEETING 2004

RESEARCH BEYOND BOUNDARIES

NIAID

GLUTAMINE AND ALANYL-GLUTAMINE ENHANCE ABSORPTIVE FUNCTION IN MALNOURISHED CHILDREN AND HIV$^+$ PATIENTS

Lima, Aldo A. M. [1,3], Brito, Lúcia F. B. [1], Leite, Robério D.[1], Lima, Noélia L. [1], Kushiba, Ângela [2], Bushen, Oluma Y. [3], Dillingham, Rebecca D. [3], Guerrant, Richard L. [1,3]

[1] Federal University of Ceara, Fortaleza, CE, Brazil, [2] University of North Carolina, Chapell Hill, N.C., and [3] University of Virginia, Charlottesville, VA

Background: Diarrhea and wasting syndromes are common in malnourished children and HIV$^+$ patients. Glutamine is the major energy source for the enterocytes and a key stimulatant for immune function. **Objectives**: This study has two objectives: (a) to determine the effects of enteral glutamine supplement on repair of damaged intestinal barrier function in malnourished children; and (b) to evaluate the absorptive function, antiretroviral drug malabsorption and the effects of enteral alanyl-glutamine on impaired absorptive function in HIV infected patients. **Methods**: For the first objective, children were admitted to the study protocol from June, 2001 to June, 2002. After parental consent, children ages 2 to 36 months with a weight-for-age z-score less than -2 were enrolled in the study protocol. Children were randomized to receive isomolar concentrations of either glutamine or glycine, mixed with liquid diet formula for ten days. In the second objective, the study was prospective outpatient, randomized, double blinded, and placebo-controlled. The intestinal barrier function was evaluated using the lactulose: mannitol test and these two sugars were measured using high performance liquid chromatography (HPLC) before and after ten days of the study protocol. The weight and height were also evaluated before and after the use of alanyl-glutamine (AG; 24g/day) or isonitrogenous doses of glycine (G; 25 g/day). Antiretroviral (ARV) drug levels were measured using HPLC. Total CD4 and viral load were available before and at least four weeks after the ten days of the study treatment protocol. Stool samples were examined before treatment for leukocytes, reducing substances, fecal fat, lactoferrin, helminths and protozoa. **Results**: A total of 60 children were eligible to the study protocol and 53 (88%) children's parents consented for enrollment in the study. Forty six children had their both lactulose:mannitol ratios (before and after ten day treatment) completed. Patient characteristics such as age, sex, nutritional status and intestinal barrier function were similar in both groups at admission. The intestinal lactulose:mannitol ratio before and after ten days by treatment regimen showed a significant improvement (decrease) in the glutamine group (0.3129 ± 0.1025 vs. 0.1044 ± 0.0175; $p=0.01$; $N=21$), but not in the glycine controls (0.3703 ± 0.1041 vs. 0.1631 ± 0.0358; $p=0.09$; $N=25$). When we compared weight gains after ten days treatment with glutamine ($6{,}668 \pm 0{,}5347$ versus $6{,}881 \pm 0.5353$ g; $p < 0.01$; $N = 26$) or glycine control ($5{,}673 \pm 0{,}5117$ versus $5{,}925 \pm 0{,}5293$ g; $p < 0.01$; $N = 27$), both showed a significant increase in their weights. Fifty two patients were enrolled in the study of HIV$^+$ patients. Thirty nine (75%) were male and 13 (25%) female. The age range was between 1–60 years old (means = 33 y.o.). The CD4 count ranged from 7–2000 /mm^3 (mean=490/mm^3). The viral load ranged

Volume 7 • Supplement 1 • August 2003

The Brazilian Journal of Infectious Diseases

An Official Publication of the Brazilian Society of Infectious Diseases

Published by CONTEXTO

ISSN 1413-8670

P127

FUNÇÃO INTESTINAL, PERMEABILIDADE, HISTOPATOLOGIA JEJUNAL E EFEITO DE ALANIL-GLUTAMINA EM PACIENTES INFECTADOS PELO VÍRUS DO HIV EM FORTALEZA

Leite, Robério D.[1], Luiz, Roberta S.S.[2], Leite, Christiane A. C.[1], Lima, Noélia L.[1], Viana, Joseval R.[2], Barbosa, Ma. Joire, V.[2], Guerra, Éder J.[2], Guerrant, Richard L.[3], Lima, Aldo A.M.[1] [1]Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Ce, [2]Hospital São José, Fortaleza, Ce, [3]University of Virginia, Va. Suporte financeiro: Ministério da Saúde DST/AIDS.

Introdução: Diarréia crônica e a síndrome da perda de peso estão entre as principais manifestações da infecção pelo HIV. Glutamina constitui a principal fonte de energia e estimula a proliferação do enterócito. **Objetivos:** Avaliar o efeito da alanil-glutamina (AG) na permeabilidade intestinal e ganho de peso em pacientes HIV+/AIDS. **Materiais e Métodos:** Estudo duplo cego, aleatório, de AG ou glicina (G; placebo) em pacientes HIV+/AIDS. A capacidade absortiva intestinal foi aferida pelo teste de absorção de lactulose e manitol, avaliado por dosagem dos dois açúcares na urina pelo método de cromatografia líquida de alta performance (HPLC) antes e após os 10 dias de inclusão no estudo. O estado nutricional foi avaliado por peso e estatura antes e após uso de AG (24g/dia) ou G (25g/dia) por 10 dias. Amostras de fezes foram colhidas para realização de exame parasitológico, coprocultura e teste de lactoferrina (marcador de inflamação). **Resultados:** Cinquenta e dois pacientes entraram no estudo. 39 (75%) eram do sexo masculino e 13 (25%) do sexo feminino. A idade dos pacientes variou de 1 a 60 anos (média=33 anos), células CD4 variaram entre 7-2000/mm^3 (média=490/ mm^3), carga viral entre 0-6,6 log (média=3,7). Dez (19,2%) pacientes tiveram diarréia nos 14 dias antes da entrada no estudo. Os grupos AG e G foram semelhantes quanto às características clínico-laboratoriais avaliadas. O parâmetro de absorção de manitol aumentou significativamente no grupo AG (15,6 ± 1,22% vs. 28,6 ± 6,47%; N = 18; p = 0.027). As taxas de lactulose/manitol e excreção de lactulose não alteraram significativamente nos dois grupos. Os índices de massa corpórea (IMC) e taxa de ganho de peso (TGP; g/kg/dia) antes e após o tratamento, foram observadas aumentos consistentes mas não significativos no grupo AG: Grupo AG – IMCantes=20,8 e IMCapós=21,96 e TGP=0,3697; Grupo G – IMCantes=22,55, IMCapós=23 e TGP= -0,3566. **Conclusão:** Os resultados demonstram uma significativa melhora na área de absorção intestinal no grupo AG, a qual é consistente com a melhora aguda no IMC e ganho de peso.

P128

ÚLCERAS GÁSTRICAS EM PACIENTES COM SIDA

BRAGA, Carla F.; CORTELETTI, Fábia R.; DOSSIN, Teresinha J.; FREITAS, Isabela O.; ROCHA, Marineide M. (Grupo Hospitalar Conceição – Hospital Nossa Senhora da Conceição/ Porto Alegre/ RS).

Introdução: As doenças gástricas em pacientes com infecção pelo HIV podem ser oportunistas ou não relacionadas com a imunodeficiência. Úlceras gástricas podem ser freqüentemente causadas por Citomegalovírus e *Micobecterium tuberculosis*. Dentre as causas menos comuns estão as infecções por *Histoplasma capsulatum* e Linfoma Gástrico. **Objetivos:** Os autores relatam três diferentes causas de úlceras gástricas em pacientes com infecção pelo HIV, internados no Hospital Nossa Senhora da Conceição. **Material e Métodos:** Os casos relatados referem-se a pacientes com SIDA que se apresentaram à internação com sintomas comuns como dor epigástrica, emagrecimento, vômitos e queda do estado geral, com evolução de aproximadamente dois meses. Através de exames endoscópicos, foram obtidos fragmentos das úlceras gástricas, cujos exames anátomo-patológicos mostraram diferentes diagnósticos: histoplasmose disseminada, linfoma gástrico e estrongiloidíase. **Resultados:** O paciente com diagnóstico de úlcera gástrica por Histoplasmose foi tratado com Anfotericina-B com boa evolução clínica. Já o paciente com Linfoma Gástrico teve progressão da doença apesar de instituído tratamento quimioterápico adequado. No caso da estrongiloidíase sistêmica ulcerada, o paciente foi tratado com Tiabendazol em altas doses com lenta regressão das úlceras e dos sintomas clínicos. **Conclusão:** Pacientes com infecção por HIV podem ter problemas gastrintestinais exacerbados pelo avanço da doença sistêmica. Ao mesmo tempo em que se apresentam com quadro clínico semelhante, as etiologias podem ser as mais diversas.

P129

BIÓPSIA PULMONAR A CÉU ABERTO EM PACIENTES COM SIDA SOB CUIDADOS DE TERAPIA INTENSIVA

Dalmônico, Ana C.; Lippi, Glauce; Melo,Luíz H.; Oliveira, Thaíse P.; Ramirez, Tenille A; Volpato, Dalton E.; Westphal, Glauco; Zimmerman, Ricardo D.

Introdução: O anseio da obtenção de um diagnóstico definitivo para otimizar o tratamento médico tem aumentado a demanda por procedimentos de investigação mais precoces, invasivos e com custos mais elevados. A biópsia pulmonar a céu aberto é considerada como padrão ouro para o diagnóstico de infiltrados pulmonares, e vários estudos têm demonstrado o seu uso em uma população específica de pacientes. Este procedimento é utilizado em uma pequena parcela de pacientes infectados com HIV com doença pulmonar difusa ou multifocal não diagnosticada, tendo uma expectativa de diagnóstico garantido em aproximadamente 70%. **Objetivo:** Demonstrar a utilidade da biópsia a céu aberto em pacientes admitidos em uma Unidade de Terapia Intensiva (UTI) portadores de SIDA. **Materiais e Métodos:** Foi realizado um estudo retrospectivo envolvendo 9 pacientes internados nas unidades de terapia intensiva do Hospital Municipal São José (HMSJ) e Hospital Regional Hans Dieter Schimidt na cidade de Joinville.Foram investigados os prontuários do período de 1996 a 2000. Quando admitidos, receberam um diagnóstico clínico-radiológico inicial, e posteriormente, devido a piora na evolução, foram submetidos a biópsia pulmonar a céu aberto. Uma vez obtido o diagnóstico histológico houve uma comparação com o diagnóstico inicialmente realizado. **Resultados:** Dos nove diagnósticos inicialmente atribuídos houve discordância, em sete pacientes, entre o diagnóstico clínico e o posterior ao procedimento. As principais patologias diagnosticadas histologicamente foram SARA e pneumocistose. Devido ao diagnóstico da biópsia houve mudança na conduta em 78% dos pacientes. Nenhuma morte foi relacionada ao pós-operatório imediato. Conclusão: Com este estudo, a utilidade da biópsia pulmonar a céu aberto em pacientes com SIDA sob cuidados de terapia intensiva foi comprovada, pois possibilitou a mudança de conduta terapêutica na maioria dos pacientes. **daltonvolpato@hotmail.com**

P232 OSTEOMIELITE VERTEBRAL PIOGÊNICA EM PACIENTE COM INSUFICIÊNCIA RENAL CRÔNICA: A RESPEITO DE UM CASO

PESSOA-JÚNIOR, Vicente P.*; OLIVEIRA, Wagner C*; RODRIGUES, Luciana L.C.*; PINTO, Poliana P.*; OLIVEIRA, Tulio C.*; BERTOCCHI, Ana P. F.*; GOMES, Andréia P.*; SIQUEIRA-BATISTA, Rodrigo*.**. *Faculdade de Medicina de Teresópolis, Fundação Educacional Serra dos Órgãos, Teresópolis, RJ **Hospital Universitário Clementino Fraga Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ.

Introdução: A hemodiálise representa um risco aumentado de infecções hematogênicas, sobretudo por *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis.* **Objetivo:** Relatar um caso de osteomielite vertebral por disseminação hematogênica em paciente com insuficiência renal crônica (IRC) submetida à hemodiálise. **Relato de caso:** AAJ, 61 anos, feminina, negra, aposentada, residente em Mauá-RJ. Procurou o Hospital de Clínicas de Teresópolis Costantino Ottaviano (HCTCO), hospital-escola da Faculdade de Medicina de Teresópolis-RJ, com quadro iniciado cerca de 20 dias antes, caracterizado por dor em região cervical posterior — que melhorava com uso de analgésicos comuns e piorava com a movimentação —, a qual se seguiu paresia e parestesia de membros inferiores. Negada história de febre. A enferma é portadora de IRC por hipertensão arterial sistêmica, em hemodiálise há dois anos. Exames iniciais com discreta leucocitose e aumento da velocidade de hemossedimentação (120 mm/1ª hora). Radiografia e tomografia computadorizada de coluna lombar normais. No terceiro dia de hospitalização surgiram parestesia e paresia de membros superiores. No quarto dia apresentou febre alta (39,0 ºC) e piora da dor cervical. Radiografia e ressonância magnética de coluna cervical mostraram imagem compatível com coleção líquida perivertebral — quinta, sexta e sétima vértebras cervicais —, compressão de discos vertebrais correspondentes e destruição do platô vertebral de C7. Iniciada oxacilina após coleta de hemoculturas. No sexto dia, submetida à neurocirurgia com visualização de coleção purulenta e destruição vertebral. Realizada corpectomia de C5, C6 e C7, discectomia de C5/C6, C6/C7 e C7/D1 e fixação por *cage* com enxerto inorgânico e placa via anterior, e coleta de material para cultura. As hemoculturas permaneceram negativas, sendo mantido esquema antimicrobiano. No décimo dia de pós-operatório houve crescimento de *S. aureus* sensível à oxacilina no material obtido na cirurgia; este fármaco foi trocado por vancomicina pela facilidade posológica (dose única semanal durante a hemodiálise). O tratamento foi mantido por cinco semanas, havendo melhora significativa da dor cervical e dos sintomas neurológicos de membros superiores, mantendo, entretanto, a paresia e a parestesia em membros inferiores. **Discussão:** O presente caso atenta para a importância da hemodiálise como porta de entrada para infecções de disseminação hematogênica. A investigação dos casos de osteomielite baseada no provável agente causal, na via de disseminação, na duração e na localização anatômica da infecção fornece arcabouço útil para a avaliação do paciente e o planejamento terapêutico.

vicentim78@yahoo.com

P233

MARCADORES DE VIRULÊNCIA DE EAEC ASSOCIADOS A DIARRÉIA AGUDA E PERSISTENTE EM CRIANÇAS NO DISTRITO FEDERAL

PEREIRA, Alex L.[1];PARACHIN, Nádia S[1]. FERRAZ, Lúcia R.[2]; NASCIMENTO, Regina S.[2] GIUGLIANO, Loreny G.[1] [1]Universidade de Brasília, [2]Laboratório Central de Saúde Pública do Distrito Federal.

Escherichia coli enteroagregativa (EAEC) é definida por apresentar o característico padrão de adesão agregativa em associação com cultura de células. Esta aderência pode ser mediada pelas fímbrias AAF/I e AAF/II, codificadas por plasmídeo (pAA). Este plasmídeo, também, está relacionado com a expressão de duas citotoxinas denominadas EAST1 e Pet; uma outra exotoxina denominada Pic é codificada pelo cromossomo. EAEC é considerado um patógeno emergente relacionado com diarréias persistentes, no entanto, alguns estudos têm associado esta categoria à diarréia aguda em crianças. Desenvolvemos um estudo do tipo caso-controle realizado com 249 amostras fecais, sendo 122 casos e 127 controles, coletados de crianças, menores de cinco anos de idade, atendidas em hospitais do Distrito Federal. As amostras foram submetidas a análise para a identificação dos possíveis patógenos bacterianos, sendo isoladas, geralmente, 5 cepas de *E. coli* por amostra. Ensaios de PCR foram realizados para diagnosticar cepas que albergam marcadores de virulência de EAEC; foram utilizando *primers* específicos para AAF/I, AAF/II, EAST1, Pet, Pic; a presença do plasmídeo pAA foi determinada utilizando o *primer* pCVD432. Do total de casos estudados 24 (17,77%) foram classificados com persistentes. 1194 cepas de *E. coli*, sendo 574 de casos e 620 de controles, foram utilizadas nos estudos de associação dos fatores de virulência de EAEC com diarréia. Cepas EAST1$^+$ foram detectadas em 12,02% dos isolados de caso e em 4,38% dos controles ($p < 0,001$); cepas pCVD432$^+$EAST1$^+$ também apresentaram associação com diarréia ($p < 0,05$). Isolados pCVD432$^+$ relacionaram-se com quadros persistentes e as cepas EAST1$^+$ com os quadros agudos; os isolados pCVD432$^+$EAST1$^+$ foram detectados em 5,61% dos casos persistentes e em apenas 0,32% dos controles ($p < 0,001$). Nos menores de 6 meses os isolados pCVD432$^+$ eram 11,92% das cepas dos casos e 3,38% dos controles ($p < 0,05$); nesta faixa etária cepas Pic$^+$ também foram associadas com diarréia. Cepas EAST1$^+$ apresentaram associação apenas com casos agudos e em crianças maiores de 6 meses. Este estudo demonstra que os marcadores de virulência de EAEC, em diferentes combinações, associam-se com quadros diarreicos distintos em padrões dependentes da idade.

giuglian@unb.br

P234

DIARRÉIA PERSISTENTE E NUTRIÇÃO INFANTIL: EFEITO DA GLUTAMINA NA PERMEABILIDADE INTESTINAL E GANHO DE PESO CORPORAL

Brito, Lúcia FR[1], Martins, Maria Ceci V[1], Ribeiro, Hildênia B, Lustosa[1], Amália P, Rocha[1], Edna M[1], Monte, Cristina MG[2], Lima, Noélia L[2], Guerrant, Richard L[3] Lima, Aldo AM[2]. [1]Hospital Infantil Albert Sabin, [2]Universidade Federal Ceará – Fortaleza –CE [3]University of Virginia, Va, USA.

Introdução: Diarréia persistente e desnutrição são considerados fatores de risco significantes para a mortalidade infantil associados com doenças infecciosas na infância. Ambos estão associados também com alteração na função da barreira intestinal, o que contribui para o ciclo vicioso de diarréia e desnutrição. A glutamina tem um papel importante na proliferação celular e constitui a principal fonte de energia para o enterócito. Postulamos que a dieta recomendada pela OMS para crianças desnutridas acrescida de glutamina pode induzir uma rápida recuperação da mucosa intestinal e um aumento ponderal em crianças com diarréia persistente e desnutrição. **Objetivos:** Neste estudo avaliamos o efeito da administração por via oral da glutamina na recuperação da função da barreira intestinal e do ganho de peso em crianças com diarréia persistente e desnutrição. **Métodos:** Cinqüenta e três crianças com desnutrição (peso-por-idade < -2 DP) ou diarréia persistente (duração ≥14 dias) e com idade entre 2 – 60 meses foram admitidas no estudo após consentimento dos responsáveis. O estudo clínico experimental foi aleatório, duplo-cego, usando glutamina (Gln; 16.2g/dia) ou glicina (Gli; 8.3g/dia) por via oral durante 10 dias. A dieta utilizada nos grupos experimentais foi a recomendada pela OMS para crianças desnutridas. Os parâmetros principais analisados foram ganho de peso, avaliado diariamente, e recuperação da função da barreira intestinal utilizando o teste de lactulose / manitol, antes e após os tratamentos. **Resultados:** As crianças em ambos os grupos tratados apresentaram características semelhantes quanto ao sexo, faixa etária, e estado nutricional na admissão do estudo. As crianças no grupo Gln apresentaram ganho de peso significante ($R^2 = 0,4984$; $p = 0.03$; n=26) durante os dez dias do estudo, enquanto no grupo Gli não houve diferença significativa ($R^2 = 0,0425$; $p = 0,595$; n=27). O teste de lactulose / manitol mostrou redução significativa ($p=0.01$; n=21) no grupo Gln e no grupo com Gli não houve diferença significativa ($p>0.05$; n= 25). **Conclusões:** Estes resultados demonstram um melhor ganho de peso corporal e rápida recuperação da barreira funcional intestinal nos pacientes tratados com glutamina via oral em comparação com os controles tratados com glicina.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ

FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA
UNIDADE DE PESQUISAS CLÍNICAS & INSTITUTO DE BIOMEDICINA

25th YEAR CELEBRATION OF UFC&UVA INTERNATIONAL COLLABORATIVE PROGRAM

7th TROPICAL MEDICINE RESEARCH CENTER & INTERNATIONAL COLLABORATION IN INFECTIOUS DISEASES RESEARCH

ABSTRACTS

FEBRUARY 12th – 14th, 2003
FORTALEZA, CEARA BRAZIL

Small Bowel Repair of Intestinal Barrier Function and Weight Gain in Persistent Diarrhea and Child Nutrition: Role of Glutamine and Alanyl-Glutamine

[1]AAM Lima, [1]AM Soares, [1]GAC Brito, [1]EAT Silva, [1]NL Lima, [1]CMG Monte, [1]LFR Brito, [1]MCV Martins, [2]RL Guerrant. [1] Federal University of Ceará & Hospital Infantil Albert Sabin and [2] University of Virginia

Oral rehydration salts solution (ORS) (recently with reduced osmolarity – 75 mmol/l sodium, 20 mmol/l potassium, and 75 mmol/l glucose) reduces stool output, the duration of diarrhea, and the need for intravenous fluids. However, repair of damaged, malabsorbing mucosa as well as rehydration might be accomplished with an oral rehydration and nutrition therapy (ORNT) to treat dehydration and enhance repair of the intestinal mucosal injury seen with persistent diarrhea and severely malnourished child. We postulate that glutamine (Gln) or alanyl-glutamine (AG) in a new ORNT solution or as a supplemental micronutrient would improve intestinal electrolyte and water absorption, and early repair the intestinal barrier function in persistent diarrhea and malnourished child. We evaluate the effect of Gln and AG on water and electrolytes transport, and intestinal barrier function. Glutamine is unstable in acidic conditions, which make it difficult to use for treatment of diarrhea and malnutrition. The addition of alanine (Ala) to the molecule of Gln completely prevents its degradation in acidic conditions (pH – 1) when incubated for 375 h. Gln and Ala were more efficient than glucose (Glu) in the intestinal co transport of sodium, measured in isolated ileum mounted in Ussing chambers (**Lima et al., BJMBR 25:637, 1992; Lima's Titular Thesis 1998; Silva's PhD Thesis 2002**). In the same model, AG induced a significant increase in the electrogenic transport. These substrates caused also a significant increase in the water and electrolyte transport, using the *in vivo* intestinal perfusion. The oral rehydration solution with Gln or AG (Gln-ORS; AG-ORS) completely reversed the intestinal secretion of water and electrolytes in the secretory model induced by choleratoxin (CT = 84 kDa; 1 mcg/ml) (**Silva et al., 26:513, 1998; Lima et al., 18:458, 2002**). Gln and AG increased intestinal cell (T-84) proliferation, migration and reduced apoptosis (**Brito et al., TMRC Abstract 2002**).

Children and Adults with persistent diarrhea and malnutrition had a significant increase in the lactulose / mannitol ratio permeability test (IP test), resultant from decreased intestinal absorptive area and intestinal damage (**Barboza et al., BJMBR 32:1499, 1999; Guerrant et al. Adv Exp Med Biol 473:103, 1999; Lima et al., AJG 92:1861, 1997**). After consent, randomly chosen children with persistent diarrhea or moderate to severely malnutrition underwent IP testing before and after study treatments. The children were randomized in a double-blind fashion to received placebo (glycine; 8 g/day; 10 days) or glutamine (13 g/day; 10 day) in addition to the standard treatment protocol. Anthropometrics measurements were taken before and after treatments. Sixty patients entered in the study protocol and 3 dropouts for the following reasons: one had benign neoplasm; one was less than 2 mos. old; one did not reach the energy intake requirement. The results showed a significant decrease of IP test in Gln group (L/M = 0.2994 ± 0.0879 vs 0.1102 ± 0.01941; p = 0.003) and no change in the glycine group. This Gln effect was due to the consistent increase in the absorptive area and decrease intestinal damage. The weight gain was improved earlier in Gln group compared to glycine control.

These results demonstrated that Gln and Ala had a better efficacy than Glu in the intestinal sodium co-transport. The Gln-ORS was more efficient than control-ORS in the secretory diarrhea induced by choleratoxin. AG was stable in acidic conditions and was able to increase intestinal water and electrolyte transport. Glutamine in addition to the standard

treatment protocol for persistent diarrhea and malnourished child is necessary to improve the repair of intestinal barrier function and weight gain.

International Centers for Tropical Disease Research Network

11TH ANNUAL MEETING 2002

RESEARCH BEYOND BOUNDARIES

N I A I D

ENVIRONMENTAL EFFECTS, FAMILIAL PREDISPOSITION, AND PATHOPHYSIOLOGY OF DIARRHEA AND MALNUTRITION

AAM Lima[1,2], AM Soares[1], SR Moore[2], NL Lima[1], S Williams-Blangero[3], and RL Guerrant[1,2]

[1] Federal University of Ceará, Fortaleza, CE, Brazil, [2] University of Virginia, Charlottesville, VA and [3] Southwest Foundation for Biomedical Research, San Antonio, TX

University of Virginia/Brazil ICIDR

The interactions between diarrheal diseases and nutritional status are complex and synergistic. Despite intensive field-based and laboratory studies, many questions remain unanswered about environmental effects, familial aggregation and pathophysiology of this vicious cycle "diarrhea-malnutrition." Our hypothesis is that environmental and genetic factors and micronutrient deficiency are each critical in the diarrhea-malnutrition cycle. The aims of our work are: (a) to determine the environmental effects on diarrheal diseases morbidity and nutritional status of children in an urban community in Fortaleza; and (b) to evaluate familial aggregation of diarrheal diseases. In order to determine diarrheal diseases morbidity and nutritional status we conducted an active surveillance system, 2 times weekly, in an urban community located in Fortaleza, CE, Brazil. After obtaining consent, the team recorded diarrheal illnesses, dietary information, and the length and weight of all children were measured at 3-months intervals. Data from the Gonçalves Dias community was collected to construct large and complex pedigrees that will be required for detailed genetic analyses and ultimately a genome scan.

Between March 20, 1999 and March 19, 2001, a total of 163 pregnancies were followed in the cohort. 160 children were born into the study and 43 children entered in the study at a later time, giving a total of 203 which were followed for a total of 67,362 observation days. The mean length of follow-up per child was 332 days. These children had 3.31 episodes of diarrhea per child-year, spending an average of 12 days a year with diarrhea . The average of acute episodes per child-year was 3.26 and for persistent episodes was 0.05 episodes per child-year. Persistent diarrheal (PD $\geq$ 14 days duration) accounted for 1.5% (9/601) of all episodes and 6.4% (141/2188) of all days spent with diarrhea. Total and acute episodes peaked at 6-12 months and PD episodes peaked at 3-6 months. ANOVA analysis of mean Z-scores across age groups (0-3; 3-6; 6-9; 9-12 mos) revealed differences that were statistically significant ($p<0.005$ for HAZ, WAZ, and WHZ). Moderate decreases in WAZ and WHZ (markers of wasting and acute malnutrition), followed later by decreases in HAZ (a marker of stunting and chronic malnutrition), suggests progressive weight faltering after the age of 3 months and a subsequent height faltering at 12 months. An analysis of nutritional status, by age group and socio-economic characteristics, showed several risk factors (crowding in the home, absence of piped city water, mother education, and days of non-breastfeeding before 1 yo) for poorer nutritional status in the cohort. The proportion of

PROJETOS

BOLSAS DE PESQUISA

10. PROJETOS/BOLSAS DE PESQUISA

10.1 **Título do projeto:** Long-term impact and intervention for diarrhea in Brazil. **Fonte financiadora:** ICIDR Program, National Institute of Health, Bethesda, MA – 2U01 AI-98-009. **Período:** 1999-2005. **Função:** Pesquisadora.

10.2 **Título do projeto:** Long-term impact and intervention for diarrhea in Brazil. **Fonte financiadora:** ICIDR Program, National Institute of Health, Bethesda, MA – 2U01 AI0265512-17. **Período:** 2006- 2011. **Função:** Pesquisadora.

10.3 **Título do projeto:** Use of glutamine and its stable derivatives in intestinal function and mucosal barrier repair. **Fonte financiadora:** Howard Hughes Medical Institute, Bethesda, MA–Grant Number 55000645. **Período:** 2000 – 2005. **Função:** Pesquisadora.

10.4 **Título do projeto:** Função intestinal, permeabilidade, histopatologia jejunal e efeito de alanil-glutamina em pacientes infectados com o vírus de imunodeficiência humana em Fortaleza. **Fonte financiadora**: Ministério da Saúde, Secretaria de Políticas de Saúde, Coordenação Nacional de DST e AIDS. **Período:** 2002– 2003. **Função:** Pesquisadora.

10.5 **Título do projeto:** Educação em Ações Básicas de Saúde Infantil em uma Creche Municipal de Fortaleza. **Fonte financiadora:** Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico. **Período:** 2002-2003. **Função:** Pesquisadora.

10.6 Bolsa de Doutorado**. Fonte Financiadora :** Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico - FUNCAP. **Período:** 2003-2004.

Livros Grátis

(http://www.livrosgratis.com.br)

Milhares de Livros para Download:

Baixar livros de Administração
Baixar livros de Agronomia
Baixar livros de Arquitetura
Baixar livros de Artes
Baixar livros de Astronomia
Baixar livros de Biologia Geral
Baixar livros de Ciência da Computação
Baixar livros de Ciência da Informação
Baixar livros de Ciência Política
Baixar livros de Ciências da Saúde
Baixar livros de Comunicação
Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE
Baixar livros de Defesa civil
Baixar livros de Direito
Baixar livros de Direitos humanos
Baixar livros de Economia
Baixar livros de Economia Doméstica
Baixar livros de Educação
Baixar livros de Educação - Trânsito
Baixar livros de Educação Física
Baixar livros de Engenharia Aeroespacial
Baixar livros de Farmácia
Baixar livros de Filosofia
Baixar livros de Física
Baixar livros de Geociências
Baixar livros de Geografia
Baixar livros de História
Baixar livros de Línguas

Baixar livros de Literatura
Baixar livros de Literatura de Cordel
Baixar livros de Literatura Infantil
Baixar livros de Matemática
Baixar livros de Medicina
Baixar livros de Medicina Veterinária
Baixar livros de Meio Ambiente
Baixar livros de Meteorologia
Baixar Monografias e TCC
Baixar livros Multidisciplinar
Baixar livros de Música
Baixar livros de Psicologia
Baixar livros de Química
Baixar livros de Saúde Coletiva
Baixar livros de Serviço Social
Baixar livros de Sociologia
Baixar livros de Teologia
Baixar livros de Trabalho
Baixar livros de Turismo