

Paulo Jorge Coimbra Martins

**Relação da glutamina com a redução da
infecção nosocomial em doentes de
Medicina Intensiva – sua interacção
com as populações e sub-populações
linfocitárias**

Coimbra

2012

Dissertação de Doutoramento
apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra em 2012

**A Faculdade de Medicina de Coimbra não aceita qualquer responsabilidade em relação à doutrina e à forma desta dissertação
(Regimento da Faculdade de Medicina de Coimbra, 1931, art.108, único)**

“Não é um notável talento o que se exige para assegurar o êxito em qualquer empreendimento, mas sim um firme propósito”

Thomas Atkinson (1799-1861)

PREFÁCIO

Desde que me conheço que desejei ser médico, por isso sinto-me completamente realizado quando, embrenhado nas minhas tarefas hospitalares, contribuo para minorar o sofrimento de outros seres consumidos pelas doenças.

Assim, a opção da minha formação pós-graduada em Medicina Interna surgiu de forma natural. Tive o privilégio de a realizar num local (Serviço de Medicina Interna do Hospital Distrital da Figueira da Foz) em que se valorizava a observação global do doente e se privilegiava o contínuo debate de ideias, que foram fundamentais para a minha educação clínica.

Numa altura em que se pretende diluir a importância dos Serviços Hospitalares, retirando valor ao fervilhar de ideias e ao confronto de opiniões por eles promovida, é importante perceber que eles constituem pontos de referência necessários para a vida hospitalar.

Após obter o título de especialista em Medicina Interna completei a minha formação como especialista em Medicina Intensiva no Serviço de Medicina Intensiva dos Hospitais da Universidade de Coimbra, onde tenho desempenhado a minha actividade clínica nestes últimos anos. Foi aqui que despertou o meu interesse pela nutrição clínica hospitalar, que se viu reforçado pelo estímulo que sempre encontrei quer dentro quer fora do Serviço. Saliento a influência exercida pela Professora Doutora Ermelinda Camilo e pelo Professor Doutor Rogério Gonzaga que, com os seus conselhos e estímulo, orientaram os meus primeiros passos no universo da imunonutrição.

A glutamina constituía então o imunonutriente de eleição para a população de doentes críticos, motivo pelo qual orientei o meu estudo inicial para este aminoácido, realizando diversos trabalhos apresentados em reuniões nacionais e internacionais.

O meu objectivo não era ser Professor, o caminho para o doutoramento surgiu de forma natural no meu percurso de clínico inquieto, procurando respostas a múltiplas questões.

Aquilo em que nos tornamos é consequência de uma intrincada teia de influências exercidas ao longo das nossas vidas. Somos continuamente

tocados por experiências marcantes, de grande impacto, e por outras menos grandiosas mas com influência idêntica mercê de variadas circunstâncias.

Não teria, por isso, sido possível apresentar-vos esta dissertação científica sem o apoio de muitos outros a quem quero agradecer:

Antes de todos à família, porto de abrigo seguro, sem a ajuda da qual não teria alcançado esta hercúlea tarefa. Aos meus pais, que me traçaram os horizontes morais que regeram toda a minha vida. À minha mulher e aos meus filhos, que ao longo destes anos me ajudaram e mantiveram com os pés bem assentes no chão, calando tantas vezes as longas horas de ausência, ouvindo as minhas angústias e dando-me apoio, carinho e alento para continuar. Sem eles nada disto teria sido possível, e por isso eles são verdadeiros co-autores desta tese.

Aos amigos, o apoio incondicional e a crença nas minhas capacidades quando eu próprio delas duvidava.

Aos meus tutores, Professores Doutores José Manuel Nascimento Costa e Manuel Santos Rosa a quem devo a orientação científica, os conselhos amigos e o contínuo alento para levar a cabo esta tarefa.

Aos meus mestres e colegas, que me ensinaram e me fizeram crescer em conhecimento e prática da vida. Todos me transmitiram conhecimentos, me ensinaram gestos e moldaram as minhas atitudes fundamentais no contacto com o doente ao longo de toda a minha vida.

Aos meus colegas do Serviço de Medicina Intensiva, Professor Doutor Jorge Pimentel pelo estímulo gratificante, Dr. João Pedro Baptista com o qual debati, longas horas, muitos dos aspectos desta tese e a quem devo grande parte do trabalho estatístico, aos Drs. Armindo Rebelo, Júlio Souto Gonçalves, João Janeiro da Costa, Vítor Fernandes, João Paulo Almeida e Sousa, Armindo Simões, Paula Casanova, Nuno Deveza e Eduardo Sousa, que foram os grandes responsáveis pela motivação e verdadeiros cúmplices deste projecto.

À Dra. Lisete Lemos, responsável farmacêutica pelo sector de nutrição, que garantiu o suporte nutricional dos doentes incluídos neste estudo.

À Dra. Vera Alves do Serviço de Imunologia da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, que teve a árdua tarefa da identificação e leitura das diversas populações e sub-populações linfocitárias que constituem uma das bases deste trabalho. O seu apoio e disponibilidade contínua para discutir os

diversos aspectos imunológicos, foram fundamentais para a concretização desta tese.

À Dra. Bárbara Oliveiros do Departamento de Biomatemáticas do IBILI, agradeço o apoio para a análise estatística desta tese.

Sinto-me bafejado pela sorte porque encontrei sempre uma grande abertura dos responsáveis pelos diversos Serviços necessários para a concretização deste trabalho.

Para terminar foi importante perceber que, para além da perspectiva de investigação visando um confronto contínuo entre a questão colocada e os dados recolhidos, que com metodologia científica própria pretendem sustentar a questão teórica inicial, uma tese de doutoramento constitui, sobretudo um exercício de disciplina e de humildade pessoal exercida a diversos níveis.

Foi esta a principal lição que aprendi.

ÍNDICE:

1. INTRODUÇÃO	5
2. ENQUADRAMENTO TEÓRICO	7
2.1. DEFESA FACE À AGRESSÃO	7
2.1.1. DEFINIÇÕES.....	7
2.1.2. CARACTERIZAÇÃO do SISTEMA IMUNOLÓGICO	9
2.1.2.1. IMUNIDADE INATA.....	10
a) RECONHECIMENTO de agentes agressores.....	11
b) MIGRAÇÃO para os locais de inflamação.....	13
c) As CÉLULAS da imunidade inata	15
d) FAGOCITOSE e processamento antigénico	19
2.1.2.2. ACTIVAÇÃO IMUNIDADE CELULAR	21
a) Células T efectoras da imunidade celular	22
b) Reconhecimento Antigénico - Receptores de células T e moléculas de co-estimulação	22
c) Activação Linfocitária.....	27
d) Diferenciação de linfócitos T.....	28
d1) Linfócitos T CD4.....	28
d2) Linfócitos TCD8.....	34
d3) Células T de memória.....	38
d4) Células T reguladoras (Treg).....	39
2.1.3. CITOQUINAS	43
2.1.4. ANTICORPOS MONOCLONAIS.....	51
2.2. GLUTAMINA	53
2.2.1. BREVE HISTÓRIA da GLUTAMINA.....	53
2.2.2. METABOLISMO DA GLUTAMINA	56
2.2.2.1. Entrada de Glutamina nas células	56
2.2.2.2. Síntese e degradação	58
2.2.3. FUNÇÕES FISIOLÓGICAS da GLUTAMINA	64
2.2.3.1. Fornecedora de energia/transportadora de valências azotadas.....	64
2.2.3.2. Glutamina precursora de macromoléculas.....	67
2.2.3.3. Participação da glutamina nos mecanismos de protecção celular e de defesa orgânica	67
a) Manutenção da integridade funcional das diversas células orgânicas – papel da glutamina na preservação das Heat Shock Proteins (HSP).....	68
b) Manutenção da integridade funcional das diversas células orgânicas – papel da glutamina na defesa anti-oxidante.....	70
c) Manutenção da integridade funcional das diversas células orgânicas – papel da glutamina na redução da apoptose	72
d) Papel da glutamina na preservação da integridade da função imunitária	73
2.2.4. METABOLISMO da GLUTAMINA em SITUAÇÕES de STRESS	75
2.2.5. EFEITOS da DEPLEÇÃO de GLUTAMINA	81
2.2.5.1. Limitador da velocidade de síntese proteica.....	81
2.2.5.2. Efeitos sobre a manutenção da integridade celular.....	82
2.2.5.3. Efeitos sobre os sistemas de defesa orgânica.....	83
2.2.6. IMPORTÂNCIA da GLUTAMINA na PRESERVAÇÃO da CAPACIDADE FUNCIONAL da PAREDE INTESTINAL	85
2.2.7. NUTRIÇÃO PARENTÉRICA com GLUTAMINA em DOENTES CRÍTICOS - resultado dos ensaios clínicos	92

3. CONTRIBUIÇÃO PESSOAL	96
3.1. FUNDAMENTAÇÃO do ESTUDO	96
3.2. OBJECTIVOS.....	98
3.3. MATERIAL e MÉTODOS.....	99
3.3.1. Tipo de estudo	99
3.3.2. Critérios de inclusão e de exclusão	99
3.3.3. Desenho do estudo.....	99
3.3.4. Caracterização Geral da População	103
3.3.4.1. Grupos e Categorias de Diagnóstico à Admissão.....	103
3.3.4.2. Índices de Gravidade	103
3.3.4.3. Avaliação do Grau de Disfunção Orgânica.....	103
3.3.4.4. Caracterização Nutricional	104
3.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA	105
3.5. RESULTADOS	107
3.5.1. Características gerais da população.....	107
3.5.2. Incidência da Infecção Nosocomial	111
3.5.3. Marcadores de Infecção.....	115
3.5.4. Avaliação do estado nutricional e evolução metabólica.....	120
3.5.5. Avaliação da Falência Multiorgânica - SOFA.....	123
3.5.6. Tempo de Internamento.....	127
3.5.7. Mortalidade.....	127
3.5.8. Estudo das Populações e Sub-populações Linfocitárias	129
3.5.9 Análise Estatística Multivariada e Métodos Exploração Multidimensionais ...	186
4. DISCUSSÃO	190
4.1. CARACTERÍSTICAS GERAIS da POPULAÇÃO ESTUDADA	190
4.2. RESPOSTA CLÍNICA à TERAPÊUTICA INSTITUÍDA	193
4.2.1. Equilíbrio Nutricional	193
4.2.2. Resposta à Infecção	195
4.2.3. Resposta Imunológica.....	199
4.2.3.1. Resposta Linfocitária T.....	200
4.2.3.2. Activação e Estimulação Linfocitária T.....	204
4.2.3.3. Activação de Monócitos	207
4.2.3.4. Apoptose e Actividade T reguladora.....	211
4.2.3.5. Células NK.....	216
4.2.3.6. Quimiocinas	218
4.2.4. SOFA eTempo de Internamento	219
4.2.5. Mortalidade.....	221
5. COMENTÁRIOS FINAIS e CONCLUSÕES.....	223
Referências Bibliográficas	230

Lista de abreviaturas

SIRS *Sistemic Inflammatory Response Syndrome*
CARS – *Compensatory Anti-inflammatory Response Syndrome*
MODS – *Multiple Organ Dysfunction Syndrome*
IFN γ - *Inferferon Gama*
TNF α - *Tumor Necrotizing Factor alfa*
PAF – *Platelet Activating Factor*
ICAM-1 – *Intercellular Adhesion Mollecule 1*
PMAP – *Padrão Molecular Associado a Agentes Patogénicos*
TLR – *Toll Like Receptors*
PCR – *Proteína C reactiva*
IRAK – *Interleucine Receptor –Associated Kinase*
Células NK – *Células Natural Killer*
CD – *Clusters of Differentiation*
NOD – *Nucleotide Binding Oligomerization Domain*
CARD – *Caspase Activation Recruitment Domain*
MHC – *Major Histocompability Complex*
HMGB-1 – *High Mobility Group Box 1 Protein*
HLA – *Human Leucocyte Antigen*
VCAM -1 – *Vascular Cell Adhesion Mollecule 1*
APC – *Antigen Presenting Cell*
RCT – *Receptor de célula T*
CTLA-4 – *Cytotoxic T Lymphocyte Associated antigen-4*
PD – *Programed Death Factor*
Fas L – *Ligante do Fas*
STAT – *Signal Transducers and Activators of Transcription*
TGF β - *Transforming Growth Factor β*
Fab – *Fragment antigen ligand*
LFA-1 – *Leucocyte Function Associated antigen1*
LAG-3 – *Lymphocyte Activated Gene 3*
NFkB – *Nuclear transcription Factor kB*
AP-1 – *Activator Protein 1*
TRADD – *TNF Receptor Associated Death Domain*

FADD – Fas Associated Death Domain
LPS – Lipopolisacarídeo
GLN - Glutamina
ALA-GLN Alanina-Glutamina
GLY-GLN – Glicina -Glutamina
HSP – Heat Shock Proteins
HSF – Heat Shock Factor
GSH - Glutatioão
JAK – Janus Kinase
MAPK – Mitogen Activated Protein Kinase
SAPK – Stress Activated Protein Kinase
Kir – Killer cell immunoglobulin-like receptor
TRAP – Transmembrane Adapter Proteins
Foxp3 – Fork head box p3
ALI – Acute Lung Injuri
ARDS – Acute Respiratory Distress Syndrome
mTOR – mammalian Target of Rapamycin
ERK – Extracellular Signal Regulated Kinase
GALT – Gut Associated Lymphoid Tissue
SOFA – Sequential Organ Failure Assessment
APACHE II – Acute Physiology and Chronic Health Evaluation II
SAPS – Simplified Acute Physiology Score
LCT-MCT – Long Chain Triglycerides – Medium Chain Triglycerides
IMC – Índice de Massa Corporal
PB – Perímetro Braquial
LAK – Lymphokine Activated Killer
ROS – Reactive Oxygen Species

1. INTRODUÇÃO

As regras que hoje usamos, quando fazemos investigação, assentam na racionalidade científica que afirma que a única forma de atingir o verdadeiro conhecimento é a que decorre da aplicação de princípios epistemológicos e de regras de metodologia próprias, [1] contrapondo-se ao modelo aristotélico que privilegiava unicamente o senso comum. A formulação do saber tem pois um percurso próprio que assenta na elaboração de teorias, na sua demonstração, experimentação e prova [2].

O conhecimento científico assim obtido, deverá ser verdadeiro e objectivo, servindo-se para isso de instrumentos de análise matemática que garantam esse rigor.

Quando em investigação clínica avaliamos os resultados finais da nossa intervenção, assumimos que os grupos em estudo foram sujeitos a estímulos idênticos, sendo a única variável a intervenção que acabámos de realizar e, sobre ela pesará a diferença dos resultados encontrados. Do ponto de vista teórico ou em situações controladas em ambiente laboratorial este modelo é óptimo, mas em cenários clínicos em que existem variáveis que não controlamos, os resultados nem sempre são os esperados, idênticos aos previamente publicados na literatura com base na investigação experimental que não raras vezes assenta em modelos animais nem sempre extrapoláveis para o homem.

Assim, quando a investigação científica é feita em ambiente clínico, o cuidado terá que ser redobrado porque o nosso modelo é alvo de múltiplas acções às quais nem sempre responde de forma uniforme.

A preparação do projecto deve procurar minimizá-las, estudando uma população o mais uniforme possível, que foi randomizada garantindo dessa forma a distribuição aleatória da amostra que vamos estudar; usando critérios de exclusão que pretendem eliminar factores de contaminação; procurando fazer a análise da população randomizada que tivemos intenção de tratar e não aquela que seleccionámos após a randomização; estabelecendo critérios rigorosos de definição para as variáveis que pretendemos estudar e por fim aos resultados obtidos aplicamos uma análise matemática, tentando perceber a

distribuição da amostra e a força da intervenção ou da ausência dela na análise dos resultados finais.

A investigação dos benefícios clínicos da glutamina numa população de doentes graves não foge a estas regras básicas.

Não é fácil justificar porque é que um único aminoácido que se associa ao suporte nutricional habitual pode alterar a evolução de doentes tão complexos como aqueles que estão internados em Serviços de Medicina Intensiva.

Essa dificuldade decorre das características da glutamina que exerce a sua acção multifactorial através de um complexo sistema metabólico.

É esta capacidade de interferir nas diversas vias metabólicas necessárias para a manutenção da funcionalidade e, também da integridade das diversas células face à agressão, que torna a sua investigação aliciante e, faz da glutamina o aminoácido mais estudado destas últimas décadas.

Foi com relativa facilidade que percebemos em ambiente de laboratório como funcionavam as diversas vias metabólicas em que se encontrava envolvida. Foi depois mais difícil encontrar modelos que simulassem as mesmas acções em situações de stress. De seguida, quando tentámos extrapolar os dados dessas investigações aplicando-os ao homem começaram a surgir os resultados discrepantes, uns por incompatibilidade dos modelos usados, outros pela intrincada rede metabólica que responde de forma diferente em função da espécie, outros ainda por variações de resposta imunitária individual a qual é determinada geneticamente fazendo com que perante um mesmo estímulo a resposta seja diferente.

Por isso, não existe ainda uma conclusão final universalmente aceite dos seus benefícios clínicos.

Foi este o desafio que abraçámos, com base na metodologia antes apontada, procurámos estabelecer os benefícios da utilização de glutamina na redução da morbilidade infecciosa numa população heterogénea de doentes críticos, tentando compreender os resultados obtidos através da modulação da resposta imunológica.

2. ENQUADRAMENTO TEÓRICO

2.1. DEFESA FACE À AGRESSÃO

O organismo face a uma agressão, infecciosa ou outra, desencadeia uma série de respostas imunomediadas, com o objectivo de eliminar o agressor e restaurar o equilíbrio homeostático.

2.1.1. DEFINIÇÕES

Parece-me importante neste capítulo inicial de dissertação de uma tese dedicada ao papel da glutamina na resposta imunológica e na redução da infecção numa população de doentes críticos, salientar uma série de definições e conceitos que, não sendo novos, permitirão dar uma linha homogénea à linguagem escrita nos capítulos seguintes.

A Conferência de Consenso do “American College of Chest Physicians” em conjunto com a “American Society of Critical Care Medicine” [3-5] estabeleceram uma série de definições:

* SIRS (systemic inflammatory response syndrome) como a resposta do sistema de defesa orgânica à agressão [6] Caracterizada como modificação aguda de parâmetros fisiológicos e laboratoriais: a) temperatura superior a 38°C ou inferior a 36°C, b) frequência cardíaca superior a 90 batimentos por minuto, c) frequência respiratória superior a 20 ciclos/minuto ou PaCO₂ inferior a 32 mmHg, d) leucócitos superiores a 12000/mm³, inferiores a 4000/mm³ ou presença de mais de 10% de formas imaturas de granulócitos em circulação. Para definirmos SIRS serão necessários dois destes quatro critérios.

* Sépsis - caracterizada como uma resposta SIRS num contexto infeccioso.

* Sépsis Grave - como sépsis associada a disfunção orgânica, hipotensão ou hipoperfusão (acidose láctica, modificações súbitas do estado de consciência ou oligúria).

* Choque Séptico – como sépsis com hipoperfusão ou choque que persiste, apesar do correcto preenchimento vascular com fluidos.

* MODS (multiple organ dysfunction syndrome) – disfunção de múltiplos órgãos num contexto de SIRS, caracterizado por um conjunto de sinais clínicos e laboratoriais de compromisso gradual dos diversos órgãos, traduzindo essa mesma disfunção.

Algumas destas definições encerravam conceitos bastante próximos da realidade clínica mas eram revolucionários para esta altura. Atente-se na SIRS, resposta imunológica à agressão independentemente da causa, cuja magnitude não é exclusiva da gravidade desta, mas sobretudo da resposta do hospedeiro em função da capacidade de activação e mobilização do seu sistema imunológico. Nem sempre a coordenação entre as células de defesa orgânica e o sistema endotelial ficam no domínio do fisiológico, de forma a limitar a lesão do hospedeiro e voltar à homeostasia. Por vezes, uma resposta imune exagerada ou prolongada no tempo, pode prejudicar a perfusão/oxigenação de órgãos e condicionar o aparecimento de MODS.

Estas definições tiveram igualmente uma utilidade prática, permitindo não só homogeneizar a linguagem científica, caracterizando os diversos grupos a incluir em ensaios clínicos mas, sobretudo, identificar precocemente populações em risco de desenvolverem falências multiorgânicas e sobre elas exercer diversas actuações terapêuticas, avaliando a resposta a essas acções. Imediatamente após a agressão, há libertação de grande quantidade de mediadores pró-inflamatórios, que culminarão na SIRS com o objectivo de activar o sistema imunológico contra o potencial agressor. Esta resposta pró-inflamatória, em particular se for de grande magnitude, é responsável pela hipoperfusão e pela disfunção orgânica inicial.

Devemos a Jonh Skillman [7] um dos primeiros relatos de disfunção orgânica com falência ventilatória, hemodinâmica e hepática, complicada com sépsis e morte por hemorragia de úlcera gástrica de stress.

Outros estudos vieram demonstrar a estreita associação entre o número de órgãos em falência e a elevada taxa de mortalidade [8].

Depressa se compreendeu que este conceito lato e abrangente de SIRS não é uma entidade per si, mas que está subjacente a uma resposta inflamatória, sendo por isso um conceito dinâmico com rápida evolução temporal que, numa perspectiva de resposta imunológica celular, encerra uma resposta linfocitária T

inicialmente pró-inflamatória (fenótipo Th1 – produzindo IFN- γ e TNF) e depois “anti-inflamatória” (fenótipo Th2 – produzindo IL4 e IL10).

Concomitante com a resposta pró-inflamatória o organismo desenvolve mecanismos compensatórios anti-inflamatórios (CARS), caracterizados pela presença de citocinas reguladoras IL-10 e IFN- β , tendo como objectivo a resolução de todo o processo e regresso à homeostasia.

Contudo, a persistência de um estado anti-inflamatório limita a capacidade de defesa e predispõem a mais infecções.

Nestes últimos anos melhorámos a sobrevivência dos doentes nas fases iniciais de SIRS, graças a uma terapêutica precoce e agressiva, dirigida ao controlo do foco séptico e à estabilização do choque e da hipoperfusão celular. Contudo muitos destes doentes vêm a falecer mais tarde por infecções secundárias ao estado de imunossupressão característico do CARS.

Integrando estes conceitos no objectivo central da tese, que pretende avaliar de que forma a glutamina influencia a resposta imune orgânica e reduz a morbidade infecciosa, é importante compreendermos os mecanismos de defesa imunológica face à agressão e a modulação que a glutamina exerce sobre eles.

2.1.2. CARACTERIZAÇÃO do SISTEMA IMUNOLÓGICO

A maioria dos organismos multicelulares tem um mecanismo de defesa inato contra agentes agressores exógenos. Este é filogeneticamente o sistema mais antigo de defesa orgânica, pois até mesmo os organismos invertebrados tem capacidade de reconhecer, fagocitar e destruir os agentes agressores, num processo mediado por moléculas e células que actuam de forma idêntica aos mecanismos efectores da imunidade inata dos organismos superiores.

Mas, o desenvolvimento do sistema imune acompanhou a evolução das espécies, e assim só os vertebrados possuem um sistema de imunidade celular especializado, assente na capacidade de reconhecer de forma específica (especificidade) e reagir contra um sem número de agressores, aumentando a sua capacidade de resposta em contactos posteriores com o mesmo agente agressor (memória). Tal sistema de imunidade adquirida é mediado por linfócitos e por proteínas por eles secretadas, os anticorpos (Ac).

Estes dois sistemas colaboram entre si para manter a integridade orgânica, garantindo as defesas contra os agressores bacterianos ou outros.

2.1.2.1. IMUNIDADE INATA

Apesar das bactérias terem sido identificadas pela primeira vez no século XVII por Hooke e Laewenhoeck, a sua ligação à doença só foi estabelecida dois séculos mais tarde com os trabalhos de Pasteur e Koch. No entanto o conceito de que uma bactéria é responsável por uma doença específica só surge muito mais tarde.

No início do século 20 estabelecem-se os princípios da imunidade inata e, a meio do século, com a descoberta do papel funcional dos linfócitos aparece o conceito de imunidade celular.

Se o agente agressor ultrapassa as barreiras físicas, químicas ou biológicas da linha de defesa inicial, terá que ser contido pela primeira linha de defesa imunológica, que se encontra em alerta permanente e é geneticamente preparada para deter um lote variado de agentes patogénicos. Esta resposta imunitária inata é caracterizada funcionalmente por células fagocitárias, com capacidade para reconhecer e destruir o agente agressor, amplificada por factores endoteliais e tecidulares num mecanismo designado como processo inflamatório, cujo objectivo primário é a contenção da agressão e regresso à homeostasia. Esta resposta é sempre igual, independentemente da agressão ou do agressor.

As células fagocitárias tem origem medular, podendo derivar da série mieloide (neutrófilos, monócitos macrófagos e células dendríticas) ou linfóide (células NK), que sendo lançadas em circulação migrarão depois para os tecidos.

Um dos passos iniciais da resposta orgânica a qualquer processo inflamatório é a adesão de neutrófilos e de monócitos (percursores de macrófagos) ao endotélio vascular por aumento da expressão de moléculas de adesão e quimiocinas, em resposta à libertação de mediadores inflamatórios (IL-6, TNF α) e à presença de produtos de degradação celular (neutrófilos e componentes patogénicos). Segue-se o processo de migração, através do endotélio vascular em direcção ao interstício, designado por diapedese, com o objectivo de conter o agente agressor.

As células fagocitárias quando activadas segregam citocinas capazes de promoverem a migração de leucócitos para os locais da agressão, induzindo processos inflamatórios locais e sistémicos com síntese de proteínas de fase aguda.

As citocinas são mensageiros intracelulares capazes de amplificar e perpetuar a resposta inflamatória tanto local quanto sistémica. Têm múltiplos alvos, actuando de forma pleiotrófica, dos quais saliento alguns dos mais importantes: O $TNF\alpha$ que aumenta a produção de óxido nítrico, activa as cicloxigenases, amplifica a produção de tromboxano, prostaglandinas e PAF (*platelet activating factor*), promovendo um estado pró-coagulante.

Aumentam a expressão e libertação de moléculas ICAM 1 e E-selectina responsáveis pela alteração da permeabilidade endotelial [9, 10].

A IL-6, produzida por diferentes tipos de células (macrófagos, neutrófilos, células endoteliais, células B e T). É um regulador da resposta inflamatória aguda com aumento da PCR, pró-calcitonina e complemento. Regula o crescimento e a diferenciação de linfócitos. Activa neutrófilos e células NK.

A IL-10, sintetizada por linfócitos e monócitos, inibe a produção de citocinas pró-inflamatórias (IL-6, IL-8 e TNF) por monócitos e macrófagos. A sua elevação associa-se a um aumento da sobrevida [11] enquanto o bloqueio com Ac anti IL-10 aumenta a mortalidade [12].

a) RECONHECIMENTO de agentes agressores

Todos os microrganismos têm uma configuração molecular típica designada por PMAP (*padrão molecular associado a agentes patogénicos*) dos quais os mais conhecidos são os lipopolisacarídeos presentes nas bactérias Gram negativas, o ácido lipopteicoico das bactérias Gram positivas e os manans das paredes dos fungos.

Estes padrões moleculares estão ausentes nas células do hospedeiro, sendo esta uma forma de reconhecimento entre o próprio (*self*) e o estranho (*not self*). Os PMAP podem ser proteínas, lípidos, hidratos de carbono ou ácidos nucleicos, isolados ou em combinação, expressos à superfície de bactérias ou vírus. Muitos destes produtos são estruturais para a sobrevivência bacteriana, não podendo ser eliminados, o que facilita o seu reconhecimento pelas células da imunidade inata

As moléculas orgânicas que reconhecem estes padrões típicos designam-se por receptores de reconhecimento padrão, salientando-se o Complemento e os *toll-like receptors*. Podem estar ligadas às células fagocitárias (quer à sua superfície, quer em vesículas endosómicas ou no citoplasma de neutrófilos, macrófagos, células dendríticas, células endoteliais, epiteliais e mesmo em linfócitos) ou serem solúveis, livres em circulação.

O Complemento é caracterizado por um conjunto de proteínas activadas em cascata, por componentes da superfície microbiana (via alternativa) ou por anticorpos (via clássica), constituindo diferentes vias de activação para uma proteína sérica comum (C3) que quando estimulada pode eleger diferentes caminhos:

1. transformar-se em C3b, fixa-se à superfície dos agentes patogénicos sendo reconhecida por receptores das células fagocitárias (opsonização).
2. activar outras proteínas do complemento que se fixam de forma sequencial à superfície da membrana bacteriana, promovendo a lise e morte desta.
3. promover uma resposta inflamatória (directamente C3a ou mediada C5a) por ligação aos mastócitos.

À superfície das células fagocitárias existem um conjunto de receptores, TLR (*toll-like receptors*), receptores de resgate e opsoninas, capazes de fixarem as bactérias, facilitarem a sua fagocitose ou activarem geneticamente a produção de citocinas que ampliam a resposta inflamatória e constituem factores quimiotáticos para as células leucocitárias.

No homem foram identificados 11 TLR's. Presentes nas membranas celulares, são receptores de sinalização para PAMP, constituídos por um componente extra-celular (rico em cisteína e leucina) que possui uma cauda citoplasmática ligada a um domínio TIR (*Toll/IL-1 receptor*).

Após reconhecimento de agentes agressores há activação de vias de sinalização intra-celulares, iniciadas nos terminais TIR com recrutamento e activação de diversas cinases proteicas das famílias IRAK, activadoras de factores de transcrição (NFkB e AP-1) necessários à expressão de diversos genes promotores de citocinas inflamatórias (TNF, IL-1, IL-12), quimiocinas (IL-8, CCL2), moléculas de adesão endotelial (E-selectina), moléculas co-estimuladoras (CD80 e CD86) e IFN α e β , promovendo desta forma a resposta da imunidade inata contra agressores bacterianos ou virusais.

Existem outros receptores de padrões de reconhecimento microbiológico (lectinas tipo C, receptores de resgate de lipoproteínas oxidadas, NLR's – *nucleotide-binding oligomerization domain*, CARD - *caspase activation recruitment domain*), expressos à superfície das células que integram o sistema de defesa inato. Alguns destes receptores actuam como os TLR's, ligados a vias de transdução intracelular de sinal que activam a produção de moléculas promotoras de inflamação que, quando estimulados originam uma série de acções que pretendem destruir os micorganismos e activar as células do sistema imune, promovendo respostas inflamatórias e destruindo agentes infecciosos [13]. Outros actuam fagocitando bactérias.

O sistema imune é ainda estimulado por substâncias produzidas pelos tecidos lesados (trauma, queimados) ou em sofrimento celular (hemorragia e isquémia), designadas por alarminas e que incluem produtos da morte celular, HMGB-1 (*high mobility group box-1 protein*), HSP (*heath shock proteins*), aumento relação ADP/ATP, adenosina e fibrinogénio.

Por vezes, alguns vírus que colonizam as células do hospedeiro reduzem a expressão de HLA I à superfície das células infectadas, pretendendo iludir o sistema de reconhecimento imunológico. As células infectadas tentam alertar o sistema imune para esta situação, através da expressão de sinalizadores de stress à sua superfície, como as *heat shock proteins*, as MICA e as MICB (*MHC Class I Chain related*), estas últimas moléculas do complexo major de histocompatibilidade, expressas na superfície de células epiteliais do tracto gastro-intestinal, células endoteliais e fibroblastos. Estes sinais serão detectados por TLR à superfície células de defesa circulante e por KAR (*Killer Activator Receptor*) à superfície das células NK.

b) MIGRAÇÃO para os locais de inflamação

Os neutrófilos e monócitos são recrutados do sangue periférico para os locais de infecção, ligando-se a moléculas de adesão à superfície das células endoteliais, selectinas P e E, produzidas após estimulação sobre as células do endotélio por produtos de origem bacteriana ou por acção de citocinas (TNF, IL-1). A ligação das selectinas endoteliais às células fagocitárias é feita por receptores de selectinas presentes à superfície das extremidades vilositárias de granulócitos, monócitos, alguns linfócitos T efectores e células T de

memória. Esta ligação é de baixa afinidade, quebrando-se com facilidade, permitindo o rolar dos fagócitos sobre a superfície endotelial.

A adesão das células de defesa a outras células ou a espaços extra-celulares é uma componente fundamental da migração e reconhecimento celular, estando na base dos processos imunes e inflamatórios.

A presença de moléculas de adesão à superfície dos leucócitos, designadas por integrinas, é promovida por citocinas (TNF e IL-1) libertadas por neutrófilos e macrófagos activados. Estas citocinas pró-inflamatórias aumentam de igual forma a expressão endotelial de ligands das integrinas - VCAM-1 (*vascular cell adhesion molecule 1*) e ICAM-1 (*intercellular adhesion molecule 1*), glicoproteínas presentes nas membranas de diversas células hematopoiéticas (linfócitos B e T, macrófagos e células dendríticas) e não hematopoiéticas (células endoteliais e fibroblastos). O seu papel é de fixarem os leucócitos ao endotélio vascular, reorganizando o seu citoesqueleto e permitindo a sua migração através da parede dos vasos em direcção aos locais de infecção.

A avidéz da ligação das integrinas aos seus ligands é favorecida por sinais intracelulares activados pela ligação do antigénio com o seu receptor, amplificada pela activação de quimiocinas.

As quimiocinas são polipeptídeos produzidos por leucócitos, células endoteliais, epiteliais e fibroblastos, induzidas por bactérias e activadas por TLR ou outras citocinas (IFN e IL-1).

As quimiocinas ligam-se ao sulfato heparan dos proteoglicanos à superfície das células endoteliais, interagindo com receptores das membranas dos leucócitos, activando uma variedade de enzimas celulares que modulam a configuração do citoesqueleto proteico promovendo o “rolling” dos leucócitos sobre o endotélio e estimulando alternadamente a polimerização e a despolimerização dos filamentos de actina, permitem a migração leucocitária. A sua actividade é rapidamente “*down-regulated*” pós activação, terminando a sua acção.

As quimiocinas podem ser produzidas nos órgãos linfóides sem estímulo inflamatório prévio, optimizando a circulação de linfócitos (células B, T e dendríticas) entre os diversos órgãos linfóides, e algumas delas regulam mesmo a migração de linfócitos T efectores (de memória) para os tecidos não linfóides (pele e mucosas).

No fundo enquanto a IL-1 e o TNF expressam ligands para as integrinas da superfície endotelial, as quimiocinas facilitam a adesão e aumentam a transmigração de leucócitos para os locais de inflamação.

A presença de neutrófilos ou monócitos nos locais de infecção variará consoante a expressão de várias combinações de moléculas de adesão e de receptores de quimiocinas à superfície destas células.

As várias citocinas actuam em diferentes células coordenando diversos tipos de moléculas de adesão e desta forma, controlando a infiltração inflamatória.

.

c) As CÉLULAS da imunidade inata

As células fagocitárias responsáveis pela imunidade inata (células dendríticas, mononucleares e células foliculares) especializaram-se em capturar antígenos e agentes infecciosos “apresentando-os” aos linfócitos e activando sinais que estimulam a proliferação e diferenciação linfocitárias.

Os macrófagos e as células dendríticas possuem *toll-like receptors* que, quando activados pelos micróbios, aumentam a expressão de moléculas HLA e de co-estimulação, contribuindo para ampliarem a eficácia da apresentação antigénica e a produção de citocinas estimuladoras da resposta linfocitária T.

1 - As células dendríticas com origem em percursoros celulares da série monocítica são células de apresentação antigénica, capazes de segregarem um conjunto de citocinas (IL-6, IL-12, IL-18, TNF, IFN- γ e IFN- β) que não só ampliam a resposta inflamatória inicial, mas sobretudo activam a resposta celular mediada pela estimulação de linfócitos TCD4 naife e de TCD8.

Estão estrategicamente colocadas nos locais de entrada de germes, existentes nos órgãos linfóides, epitélios cutâneo, gastrointestinal e respiratório bem como no interstício dos órgãos parenquimatosos. Expressam *toll-like receptors* de superfície que reconhecem padrões moleculares associados a agentes patogénicos, que transferem sinais de activação para o interior das células. Captam componentes do meio extra-celular por pinocitose, endocitose e fagocitose, através de longas projecções citoplasmáticas.

As células dendríticas activadas perdem a sua aderência aos tecidos epiteliais, e expressam receptores de citocinas CCR7 específicos para as quimiocinas produzidas pelas células dos gânglios linfáticos onde residem os linfócitos T.

As células T naife circulantes em busca de antígenos agressores, expressam também CCR7, migrando para a mesma zona dos gânglios linfáticos onde se encontram as células dendríticas.

A maturação, que decorre no trajecto até aos gânglios linfáticos, converte as células dendríticas captoras de antígenos em células que expressam elevados níveis de HLA II ligados a peptídeos e moléculas co-estimuladoras, capazes de activarem os linfócitos T.

As células dendríticas podem fagocitar células invadidas por tumor ou infectadas por vírus e apresentá-los ligados a HLA I (apresentação cruzada) – indicando que um tipo de células dendríticas pode apresentar antígenos de outras células (p. ex. infectadas vírus) às células T CD8 (específicas para estes antígenos).

As células dendríticas foliculares não derivam de precursoros medulares, nem estão relacionadas com as células dendríticas apresentadoras de antígenos às células T. Aparecem misturadas com conjuntos de células B activadas nos centros germinativos dos folículos linfóides dos gânglios, baço e tecido linfóide das mucosas. Capturam antígenos ligados a anticorpos ou complemento e apresentam-nos à superfície das células para reconhecimento pelas células B.

2 - Os monócitos circulantes migram para os locais de infecção, transformando-se em macrófagos. Para além dos clássicos padrões PAMP's, os macrófagos são capazes de reconhecerem também frações Fc dos anticorpos e receptores da fração C3b do complemento que fixaram antígenos e os transportaram às células fagocitárias.

A maioria dos macrófagos que apresentam antígenos às células T CD4 diferenciadas, expressam HLA II e moléculas de co-estimulação induzida pelo interferon gama ($IFN\gamma$) o que amplia a apresentação antigénica e a activação T. Monócitos e macrófagos estão amplamente distribuídos pelos territórios infectados onde têm um papel relevante no combate a bactérias, vírus e fungos [14], produzindo citocinas reguladoras da actividade inflamatória e da resposta imunológica [15].

3 - As células NK – são células linfóides da imunidade inata.

São muito menos restrictivas e mais rápidas no reconhecimento do agente agressor do que os linfócitos T, mediadores da imunidade adquirida. A ausência de receptores específicos T à superfície das suas membranas, torna-os “assassinos” naturais ou inatos, em contraste com o “assasínio” dirigido mediado pelo reconhecimento específico pelas células T citotóxicas (CD8) determinantes da imunidade adquirida.

As células NK, são identificadas por quimiocinas, presentes no endotélio dos tecidos inflamados que as recrutam para locais de inflamação, onde interagem com outras células da imunidade inata (ex. células dendríticas imaturas) através de mecanismos de contacto celular (receptores/ligands) e activação de factores solúveis (citocinas e quimiocinas).

A estimulação e citotoxicidade das células NK é altamente influenciada pelo tipo de citocinas libertado pelas células da imune inata que com elas contactaram [16].

O aumento da citotoxicidade pode também ser mediado pelo IFN γ segregado pelas células dendríticas plasmocitárias ou pelos mastócitos [17, 18].

Nas agressões infecciosas podem lisar células agressoras ou células invadidas por microrganismos patogénicos (reconhecidos pela ausência de HLA I ou HLA modificados por infecção viral ou agressão tumoral à sua superfície). As células NK libertam grânulos contendo enzimas (perforinas e granzinas) contribuindo para a indução da apoptose e morte intracelular de agentes patogénicos pelas granulolisinas [19-21]. A actividade citotóxica destas células é ampliada pelo IFN- γ e pela IL-12 produzidos pelas células dendríticas e macrófagos, induzidos por vírus e bactérias.

Podem ainda estimular citoquinas fagocitárias (IL-12 e 18) indutoras da libertação de IFN- γ activadores da fagocitose de microrganismos intracelulares.

4- As células B efectoras têm a capacidade de produzir moléculas (Acs) capazes de eliminarem agentes agressores (Ag). Alguns linfócitos B são identificados morfológicamente como plasmócitos (grande núcleo, citoplasma abundante e denso, povoado por retículo endoplasmático e complexos de Golgi perinucleares, elementos necessários à síntese de anticorpos). Estes células

desenvolvem-se nos órgãos linfóides secundários e migram para a medula onde algumas sobreviverão por longos períodos.

Os linfócitos B “amadurecem” parcialmente na medula óssea, entram na circulação e preenchem os órgãos linfóides periféricos onde irão completar a sua maturação.

O re-arranjo do gene das imunoglobulinas (Igs - designação comum para anticorpos) é feito precocemente nas fases iniciais de diferenciação, antes da exposição antigénica. O novo DNA daí resultante é transcrito sob a forma de mRNA que irá produzir as imunoglobulinas presentes à superfície dos linfócitos e as imunoglobulinas lançadas em circulação.

As imunoglobulinas formadas pela associação de cadeias leves/pesadas são específicas para um determinado epítotope.

Na resposta imunitária humoral os linfócitos B fagocitam antígenos solúveis, para os quais tem afinidade, processam-nos e apresentam os peptídeos fagocitados aos linfócitos T helper que, por sua vez, aumentam a produção de anticorpos. Após estimulação, as células B podem produzir imunoglobulinas de diferentes isotipos (região variável das imunoglobulinas), mas mantêm a especificidade do seu epítotope. Naturalmente que isto influencia a natureza da resposta humoral. Os isotipos determinam se o anticorpo activa o complemento, é segregado no lúmen, secretado à superfície das mucosas ou imobilizado por certos tecidos corporais.

A IgM é o isotipo de anticorpo que é produzido pelos linfócitos B logo após o contacto com um epítotope.

5 - A actividade destruidora do sistema de imunidade inata pode ser adjuvada por uma série de moléculas solúveis:

Interferons tipo I – produzidos após estimulação de receptores de superfície de células dendríticas ($IFN\alpha$) e de fibroblastos ($IFN\beta$) que contactaram com PMAPs à superfície de células infectadas por vírus. O IFN activa genes das células sobre os quais actua, levando-as a produzir proteínas anti-virais que interferem com a tradução do mRNA viral, impedindo desta forma a replicação do vírus. Estas actividades são mediadas por proteino-cinases e polimerases do oligonucleotídeo (2',5" oligoadenilo-sintetase). Induzem ainda a

expressão de HLA à superfície das células apresentadoras de antígenos e estimulam a actividade dos linfócitos T.

Moléculas com actividade bactericida – como as defensinas α e β que são peptídeos ricos em cisteína, segregados por células epiteliais e células de defesa orgânica (macrófagos e neutrófilos), presentes na pele e mucosas. Estes peptídeos formam canais na parede das bactérias, permitindo a sua destruição por sobrecarga osmótica e exercem acção quimiotática para granulócitos e monócitos, facilitando a fagocitose do agente agressor.

Existem ainda enzimas produzidas pelas células epiteliais da pele (lisozimas, RNases e DNAases) e das mucosas (lisozimas) capazes de inibir ou destruir bactérias agressoras.

d) FAGOCITOSE e processamento antigénico

Após a fagocitose as proteínas antigénicas são degradadas em fagosomas ou fagolisosomas por proteases (catepsinas), sendo transformadas enzimaticamente em peptídeos capazes de se ligarem a locais específicos das moléculas de HLA, que migrarão para a superfície da célula fagocitária onde serão reconhecidas pelos linfócitos.

Os antígenos proteicos de proveniência extra-celular são fagocitados e processados dentro de vesículas, nas células apresentadoras de antígenos, formando peptídeos que se ligam a moléculas HLA II reconhecidos depois pelos linfócitos T CD4.

A maioria dos peptídeos ligados a moléculas HLA I tem origem em proteínas citoplasmáticas sintetizadas pelas células nucleadas (produto de vírus ou de outros micróbios intracelulares infectantes das células). Também a mutação ou a hiperexpressão genética das células tumorais podem produzir antígenos proteicos ligados a HLA I que serão reconhecidos por linfócitos T citotóxicos (CD8).

Alguns peptídeos ligados ao HLA I podem ter origem em antígenos dos fagosomas que por destruição destes estão presentes no citoplasma das células (ex. *listeria monocytogenes*).

A degradação de proteínas livres citoplasmáticas é feita em proteosomas que são grandes complexos enzimáticos multiproteicos com largo espectro de actividade proteolítica. Há duas grandes sub-unidades catalíticas presentes na

maioria dos proteosomas – LMP-2 e LMP-7 – codificadas por genes HLA e têm particular importância na formação de peptídeos que se ligam ao HLA I.

O IFN- γ aumenta a transcrição e síntese de LMP-2, LMP-7, TAP 1 e TAP 2 proteínas de transporte associadas a processamento de antígenos (canalizam o transporte de proteínas do citoplasma para o retículo endoplasmático, onde se ligam a HLA I).

Habitualmente, as células apresentadoras de antígenos (APC's), estão continuamente a apresentar antígenos que encontram aos linfócitos T. A maioria destes são peptídeos do próprio organismo (as APC's não tem capacidade de os distinguir entre *self e not self*), ao contrário das células T que são altamente específicas, pois sofreram uma seleção durante a sua formação que permitiu eliminar aquelas que reagiam com Ag do próprio organismo.

Esta especificidade, torna as células T muito sensíveis, só reconhecendo uma ínfima parte (0,1%) dos complexos HLA que lhes são continuamente apresentados.

Serão, pois, as moléculas HLA a conduzir a resposta celular T de forma a activar o tipo de células que melhor consiga erradicar o agressor.

Há uma excepção à regra de que os linfócitos T só são activados por peptídeos. Assim, uma subpopulação T-NK reconhece antígenos lipídicos e glicolipídicos. Este sub-grupo tem marcadores característicos dos linfócitos T e NK, reconhecendo Ag lipídicos ligados a moléculas HLA I like (CD1).

A molécula CD1 capta os lipídeos das membranas celulares e transporta-os para a superfície das células. Estes complexos são depois fagocitados por lisosomas ou endosomas que contêm antígenos lipídicos fagocitados, formando complexos com CD1 que retorna à superfície da membrana celular.

2.1.2.2. ACTIVACÃO da IMUNIDADE CELULAR

A activação das células efectoras da imunidade celular é feita após contacto com células infectadas ou células fagocitárias que lhes apresentam os antigénios.

Por vezes, para chegarem ao contacto com os agentes agressores, têm que aumentar o seu número (através da expansão clonal de linfócitos T naife nos órgãos linfóides secundários), entrarem em circulação como células T efectoras e migrarem para os locais da agressão com activação de citocinas destinadas a destruírem micróbios (directa ou indirectamente) no interior das células infectadas.

A resposta da imunidade celular a micróbios fagocitados pelas células de defesa da imunidade inata é feita através dos linfócitos TCD4/Th1 que reconhecem os antigénios microbianos, activando as células fagocitárias para os destruir.

A destruição de agentes microbianos que infectam e se replicam no citoplasma de várias células não fagocitárias é mediado pelos linfócitos TCD8 citotóxicos que eliminam as células infectadas.

Os linfócitos T citotóxicos destroem também microrganismos fagocitados pelas células de defesa mas que escaparam dos fagossomas para o citoplasma da célula, pois neste contexto as células fagocitárias são incapazes de destruírem o microrganismo agressor.

A imunidade celular para parasitas é mediada pelas TCD4/Th2 que estimula a produção de IgE, activa basófilos e mastócitos para destruírem os parasitas. Esta reacção imunitária caracteriza-se por um infiltrado inflamatório eosinófilo.

A comunicação entre os sistemas de defesa imunitária é feita através do contacto celular ou por mensageiros químicos, dentre estes, os principais são moléculas proteicas conhecidas como citocinas que regulam a actividade celular e a produção de citocinas por outras células.

Cada citocina exerce múltiplas actividades, ligando-se à superfície das células e promovendo alterações no crescimento, desenvolvimento ou actividade das células-alvo.

a) Células T efectoras da imunidade celular

A migração das células transportadoras de antígenos para os órgãos linfóides ricos em células T tem como objectivo não só encontrar as células T específicas para aquele antígeno mas também, através da produção de citocinas pelas células dendríticas, ajudarem a recrutar as células T naífe para estas zonas de contacto [22].

Ao contrário das células B efectoras da imunidade humoral capazes de reconhecerem antígenos proteicos e não proteicos (polisacarídeos, lípidos e ácidos nucleicos), a maioria das células T só reconhecem antígenos peptídicos, quando estes lhe são apresentados por moléculas HLA do próprio indivíduo (esta restrição ao próprio HLA é consequência de um processo de selecção tímico durante a maturação das células T).

A resposta celular T é altamente regulada através da activação antigénica específica dos seus receptores, adjuvada pela interacção com moléculas de co-estimulação expressas nas células transportadoras de antígenos.

Serão os produtos microbianos e/ou sinais celulares de perigo a regular a activação de co-estimuladores, orientando a resposta T no sentido da activação ou no sentido da tolerância imunológica.

A estes sinais liga-se a acção de citocinas influenciadas por mediadores intrínsecos/extrínsecos com origem no hospedeiro, que em conjunto modularão a resposta imunitária [23].

b) Reconhecimento Antigénico - Receptores de células T e moléculas de co-estimulação

O contacto e identificação dos antígenos agressores pelos linfócitos T faz-se nos receptores de células T (RCT).

Estes são heterodímeros, constituídos por duas cadeias polipeptídicas α e β ligadas por pontes dissulfito, com um componente extra-celular estruturalmente idêntico aos fragmentos Fab de uma imunoglobulina fixadora de antígenos, constituída por uma região variável e outra constante de cadeias leves e pesadas.

É na região variável das cadeias α e β , constituída por diferentes aminoácidos, que reside a especificidade do RCT em reconhecer determinado antígeno peptídeo ligado ao complexo HLA. Nesta zona existe uma pequena região

hipervariável que não participa no reconhecimento antigénico mas é o local de ligação a produtos microbianos designados por super antigénios.

Esta especificidade das cadeias α e β é codificada geneticamente por recombinação de DNA durante a maturação das células, e exclusiva daquele clone que detêm a capacidade de identificar antigénios ligados ao HLA.

As possibilidades de recombinação somática aleatória dão origem a milhares de diferentes receptores, traduzindo-se num extenso repertório de especificidades antigénicas para diferentes clones linfocitários. É esta garantia de diversidade que permite aos diferentes clones de células T responderem a múltiplas agressões antigénicas.

Embora constitua função do RCT o reconhecimento antigénico e a especificidade da resposta, a transmissão de sinais bioquímicos para activação celular T é feita através da associação com proteínas de sinalização não variáveis CD3 e cadeia ζ (ligadas de forma não covalente aquele receptor), que contêm grandes caudas citoplasmáticas constituídas por sequências de resíduos de tirosina (ITAM - *immunoreceptor tyrosine-based activation motif*) que quando fosforilados por cinases citoplasmáticas (ex. Lck e Fyn da família Src) iniciam a transdução de sinais com recrutamento de enzimas e activação de vias de sinalização citoplasmática (Ras-MAP, PKC-proteína cinases) e factores de transcrição nuclear que estimulam a expressão de vários genes responsáveis pela acção funcional das células linfocitárias com aumento da produção de citocinas (ex NfKB e IL-2).

A afinidade do RCT pelo complexo antigénico é baixa, com uma constante de dissociação que varia entre 10^{-5} e 10^{-7} M. Para estabilizar esta ligação são necessárias proteínas de membrana que não reconhecem o antigénio mas têm um papel facilitador da sinalização pelo receptor T e transmissão do estímulo celular, sendo por isso chamadas moléculas acessórias, de sinalização e de adesão, que conferem estabilidade à associação entre APC's e células T, garantindo uma correcta transmissão de sinais. Algumas das moléculas de adesão regulam igualmente a migração de células T para os locais de resposta antigénica [24].

É primordial o papel destas moléculas de co-estimulação após contacto do RCT das células T naife com o antigénio, pois são elas que promovem a

diferenciação e expansão clonal sem as quais as células T estimuladas morrem em apoptose ou tornam-se anérgicas.

A descoberta das moléculas co-estimuladoras fundamentais para activarem as células T naífe e garantirem a funcionalidade da imunidade celular, assenta na tecnologia de Acs monoclonais específicos para estas moléculas. A descoberta inicial de co-estimuladores da família B7-1 (CD80) e a posterior clonagem de genes codificadores destas moléculas, permitiram descobrir proteínas idênticas envolvidas na co-estimulação, identificando moléculas das classes B7-2 (CD86) à superfície das células apresentadoras de antígenos (células dendríticas, macrófagos e células B).

Estas, são proteínas transmembrana com domínios extra-celulares Igs-like. A sua principal função é ligarem-se a recetores da família CD28 presentes à superfície das células linfocitárias e estimularem sinais de transdução celular activadores das células T.

A expressão de co-estimuladores B7 à superfície das APC's (células apresentadoras de antígenos) é favorecida pelo aumento de produtos microbianos ligados a TLR e pela subida dos níveis de citocinas (IFN- γ) produzidas pela interacção entre micróbios e células da imunidade inata.

As células T activadas aumentam a expressão CD40L que se ligam aos CD40 à superfície das APC's e activam sinais amplificadores da expressão co-estimuladora B7 nas células APC's, particularmente nas células dendríticas tornando-as nos mais potentes co-estimuladores das naífe.

Caracterizando as várias moléculas co-estimuladoras à superfície das células de defesa, responsáveis pela modulação da resposta celular, salientamos:

- B7-1 (CD80) só aparecendo quando as APC's são estimuladas. Liga-se à molécula CD28 na superfície das células T exercendo uma acção co-estimuladora das células T naífe e um papel na formação das células T reguladoras. Expressos em 90% dos linfócitos TCD4+ e em 50% dos linfócitos TCD8+, a sua activação induz a expressão de proteínas anti-apoptóticas, estimula a produção de factores de crescimento e de outras citocinas, promovendo a estimulação e diferenciação das células T.
- B7-2 (CD86), habitualmente expressa em níveis baixos à superfície das APC's que aumentam após a activação das APC's. Ligam-se a receptores CTLA-4 (CD152) à superfície das células T exercendo sobre

estas uma regulação negativa da resposta imune, bloqueando os sinais estimuladores emitidos pelos RCT e CD28, encontrando-se envolvida nos fenómenos de auto-imunidade. Não se sabe que factores determinam a ligação entre os receptores B7 e o CD28 ou CTLA-4, pensa-se que o CTLA-4 tem uma maior afinidade pelo receptor B7 do que o CD28, e por isso as APC's com fraca expressão B7 ligam-se preferencialmente aos CTLA-4, promovendo uma regulação negativa da resposta imunológica [25].

- ICOS (inducible co-estimulator) estruturalmente parecido com o CD28 mas, ao contrário deste, não está presente à superfície das T naife, só aparecendo após estimulação linfocitária T. O ligand ICOS é homólogo das proteínas B7 1 e 2 (ao contrário do CD28). É um importante estimulador de linfócitos T diferenciados, produzindo IFN- γ , IL-10 e IL-4, tendo por isso um papel imunoregulador.
- Os ligantes PD-1 (*programmed death factor 1*) e PD-2 (*programmed death factor 2*) homólogos das moléculas B7-1 unem-se a um inibidor da família CD28 (PD-1) induzido nas células T, monócitos e células B após activação. A cauda citoplasmática PD-1 contém uma sequência ITIM (*immunoreceptor tyrosine based inhibitory switch motif*) e ITSM (*immunoreceptor tyrosine based switch motif*), permitindo a ligação de fosfatases citoplasmáticas SHP (*SH-domain containing Protein Tyrosine Phosphatase*) com desfosforilação de proteínas sinalizadoras envolvidas na transmissão de sinais intra-celulares, tendo por isso um papel regulador negativo.

A estimulação antigénica sobre as células T, com activação de CD28 traduz-se em maior sobrevivência e diferenciação de células T naife em células efectoras e de memória resultante de um duplo mecanismo, aumento da produção de citocinas (IL-2) e da expressão proteína Bcl- α (anti-apoptótico).

O aumento da produção autócrina desta citocina pelas células T resulta de uma melhor transcrição e estabilização do mRNA da IL-2.

As células T previamente activadas e as células T de memória são menos dependentes da co-estimulação B7/CD28 do que as células T naife,

permitindo-lhes responder nos territórios periféricos (longe dos tecidos linfóides) a células APC's com baixos níveis de B7.

As moléculas CD4 e CD8, que identificam as duas grandes populações linfocitárias T, são glicoproteínas transmembrana presentes à superfície destas células que se ligam a regiões não polimórficas das moléculas HLA, facilitando a ligação do complexo ligado aos RCT durante a activação linfocitária. É esta interação molecular entre o domínio D1 da molécula CD4 com a região $\beta 2$ da molécula HLA II, e do domínio Ig da cadeia $CD8\alpha$ com a região $\alpha 3$ da molécula HLA I, que explica a restrição da apresentação Ag por moléculas HLA I e II respectivamente aos linfócitos T CD8 e T CD4.

Constituem, por isso, co-receptores dos linfócitos T, intervindo na especificidade da identificação antigénica e na posterior activação celular, através de uma cinase da tirosina intra-celular (Lck).

Cerca de 65% dos linfócitos T α/β circulantes expressam CD4 e só 35% expressam CD8.

O reconhecimento antigénico por receptores linfocitários mobiliza moléculas de sinalização para as sinapses de reconhecimento, iniciando uma sequência de transmissão de sinais bioquímicos com activação de genes de transcrição molecular e activação funcional de células linfocitárias.

Há linfócitos T CD4 e CD8 com capacidade de reconhecerem antigénios lipídicos ligados a molécula CD1 expressa nas células apresentadoras de antigénios e nas células epiteliais.

Há um sub-grupo T que expressa marcadores NK e tem capacidade de reconhecerem Ag lipídicos e glicolipídeos ligados a CD1.

Receptores antigénicos de células T (γ e δ)

São heterodímeros constituídos por cadeias δ e γ , ligadas por pontes dissulfeto, expressas numa pequena população de células T (5%). Estruturalmente são semelhantes aos heterodímeros α e β . A sua expressão está aumentada em linfócitos T epiteliais, cerca de 10% dos linfócitos T do intestino apresentam esta funcionalidade.

As células T δ e γ não precisam do complexo Ag/HLA para reconhecimento antigénico. Assim, são estimuladas por pequenas moléculas alkil aminas ou

lipídicas, encontradas em micobactérias ou noutros micróbios. Reconhecem antígenos proteicos e não proteicos que não precisam de ser processados pelas células APC's para lhes serem apresentados.

Este espectro limitado de Ag, muitos deles predominando nas membranas epiteliais torna este tipo de linfócitos a primeira linha de defesa inata contra agentes agressores, activada muito antes do recrutamento específico das células T α/β .

A importância real deste subgrupo de células T está ainda por demonstrar: estudos em modelos animais com *deficits* de células T γ/δ , não tem imunodeficiência apresentando apenas um discreto aumento das infecções por bactérias intra-celulares.

Receptores Ag NK-T

Há uma pequena população de células T que expressam marcadores também existentes nas células NK, daí a designação NK-T. São células com RCT que reconhecem lípidos ligados a moléculas HLA I (moléculas CD1) que, quando estimuladas, aumentam a produção de IL-4 e IFN γ .

c) Activação Linfocitária

Na resposta imune celular, os linfócitos naife são activados por antígenos nos órgãos linfóides secundários, passando por uma fase de expansão clonal (proliferação) e diferenciação em linfócitos B e T efectores, de memória e supressores, com funcionalidades diferentes.

Estudos *in vitro* mostram que a IL-2 segregada de forma autócrita pelos linfócitos activados, é a principal citocina responsável pela proliferação linfocitária. Esta ubiquidade não é confirmada por estudos *in vivo*, que parecem sugerir a acção de outras citocinas ou factores de estimulação.

A esta fase inicial de proliferação segue-se outra caracterizada pela modificação da expressão dos receptores de superfície das células T naife, com redução das moléculas co-estimuladoras, predomínio dos estímulos inibidores e dos marcadores de apoptose (CD95L), responsáveis pelo desaparecimento da maior parte dos linfócitos T naife, enquanto os restantes se diferenciam em linfócitos T efectores ou de memória.

A resposta celular T é altamente regulada através da activação antigénica dos receptores das células T e da activação de moléculas de co-estimulação pelas células apresentadoras de antígenos. Serão os produtos microbianos e/ou sinais celulares de perigo que regulam a acção de co-estimuladores que orientarão a resposta T no sentido da activação ou da tolerância imunológica. A estes sinais liga-se a actividade de citocinas, influenciadas por mediadores intrínsecos/extrínsecos com origem no hospedeiro.

d) Diferenciação de linfócitos T

Alguns linfócitos sofrem processos de maturação ao longo dos quais adquirem características fenotípicas das células maduras e expressam receptores de antígenos à superfície das suas membranas celulares.

Os linfócitos T amadurecem completamente no timo, entram em circulação e populam tecidos linfóides periféricos.

O seu fenótipo vai-se modificando, com aumento da expressão de receptores de estimulação para citocinas e factores de crescimento, como por exemplo o CD25 (cadeia α para o receptor IL-2).

No homem, a maioria dos linfócitos T naife expressam CD45RA, isoforma de CD45 que contém um segmento codificado por um exon designado A, que lhe permite ser reconhecido por Ac específicos para o segmento codificado A e daí a designação (*restricted A*).

As células T activadas expressam uma isoforma do CD45 na qual o exon A RNA desapareceu, designando-se então como CD45RO.

Esta “marcação” para distinguir as células T naife das activadas não é perfeita estando documentada na literatura a interconversão entre CD45RA⁺ e CD45RO⁺.

d1) Linfócitos T CD4

Identificam-se como CD4⁺, expressam outras moléculas de superfície (CD40 ligand) e segregam citocinas capazes de interagir com macrófagos e linfócitos B, activando-os.

O seu citoplasma contém grânulos capazes de destruir as células tumorais ou aquelas infectadas por vírus.

A diferenciação de TCD4 naife em células efectoras da imunidade celular implica reconhecimento antigénico, em regra nos órgãos linfóides secundários, aliado a co-estimulação.

O antigénio é presente aos linfócitos TCD4 naife pelas células dendríticas, que fagocitam antigénios proteicos e os “transportam” à sua superfície, congregados com moléculas HLA II. As células dendríticas apresentadoras de Ag expressam ainda moléculas de co-estimulação da família B7 1 e 2 e segregam citocinas (p.ex.IL-12) capazes de estimular e diferenciar as células T.

Após reconhecimento antigénico a proliferação T é mediada através de auto-estimulação por citocinas (IL-2). Os linfócitos TCD4 segregam IL-2 e possuem simultaneamente receptores de superfície para esta citocina. Preferencialmente serão as células T estimuladas pelos antigénios as produtoras e receptoras da IL-2, garantindo uma expansão clonal a partir da pool de linfócitos T naife que passam de 1 para cada 100 ou 1000 linfócitos T. Algumas das células T que proliferam diferenciam-se em células efectoras, outras em células T de memória que sobrevivem longo tempo e respondem rapidamente a novo ataque antigénico.

Logo que o antigénio for eliminado, as células T serão destruídas por apoptose, regressando ao valor basal.

Os linfócitos TCD4 efectores (TCD4⁺) caracterizam-se por expressarem moléculas de superfície que activam as células B, macrófagos e células dendríticas, segregando citocinas estimuladoras funcionais destas células T. Ao contrário das TCD4 naife que só produzem IL-2, estas produzem uma maior variedade de citocinas.

A maioria dos linfócitos TCD4⁺ são células helper produtoras de citocinas, que participam na defesa do hospedeiro contra os micróbios extra-celulares, fagocitados por macrófagos ou reconhecidos por anticorpos, promovendo a sua destruição.

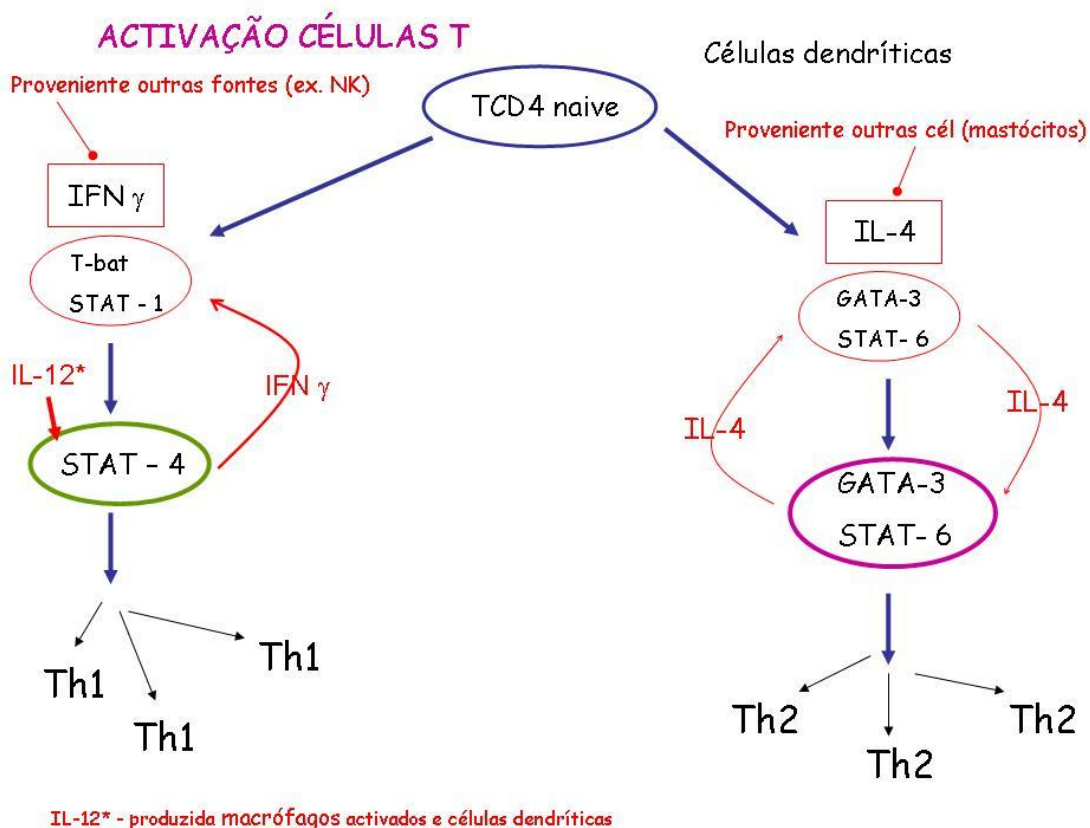
A diferenciação de linfócitos TCD4 em populações efectoras helper1 ou helper2, será função do tipo de citocinas presentes na sinapse imunológica, bem como do tipo de receptores acessórios expressos na superfície linfocitária e da sua relação com ligands das células apresentadoras de antigénios.

Diferenciação Th1

As células Th1 diferenciam-se a partir dos linfócitos T CD4 naife na presença de IL-12 e de IFN- γ , após contacto com APC's ou em resposta a micróbios ou vírus que infectaram macrófagos e que activaram células NK. A principal função Th1 que produz IFN- γ , é destruir os micróbios intracelulares presentes no interior das células fagocitárias.

Como já foi demonstrado, será o tipo e a concentração de citocinas a ditar a evolução da resposta linfocitária celular.

A produção dessas citocinas inicia-se logo após contacto de macrófagos e células dendríticas com agentes agressores. As células T podem ampliar a produção destas citocinas pelas células apresentadoras de antígenos, através da estimulação de genes de transcrição.



IFN - interferon; T-bet, STAT; Th linfócitos Thelper; GATA-3

Figura 1 - Bases moleculares para a diferenciação de células T helper (Th1 e Th2) a partir dos linfócitos TCD4 naifes

As bases moleculares para a diferenciação Th1 assentam na interrelação de sinais do receptor T com as citocinas IFN γ , IL-12 e factores de transcrição T-bet, STAT 1 e 4.

O IFN γ activa factores de transcrição STAT 1 que por sua vez estimulam o T-bet. Este é o regulador principal da diferenciação Th1, induzido quando os TCD4 naife reconhecem o antigénio e se expõem ao IFN γ .

O T-bet promove a produção de IFN γ por combinação com gene activador transcripcional, induzindo uma remodelação da cromatina no locus IFN γ .

Este feed-back positivo – capacidade do IFN γ para estimular a expressão T-bet e deste para aumentar a transcrição de IFN γ - favorece a diferenciação Th1.

Ambas as citocinas activam factores de transcrição STAT-4.

O IFN γ estimula a actividade microbicida dos fagócitos e a produção de IgG opsonizadora e activadora do complemento.

Logo, durante a diferenciação a partir das T naife os linfócitos Th1 aumentam a expressão de ligands para as selectinas P e E. Do ponto de vista molecular esta diferenciação resulta no aumento da expressão de glicosiltransferases às quais se ligam as selectinas. Este aumento expressão é T-bet dependente.

A migração inicial de células efectoras T para os locais de infecção é mediada pela secreção de citocinas (TNF e IL-1) pelos macrófagos que induzem o aumento da expressão de selectinas endoteliais e ligands de integrinas, que depois se ligam às células T efectoras.

Os macrófagos, as NK e as células endoteliais elaboram quimiocinas CXCL9, CXCL 10, CXCL11, CCL2, CCL4 e CCL5 que se ligam a receptores das quimiocinas nas células T efectoras, CXCR3 e CCR5 (expressos nas Th1 mas não nas Th2).

Esta migração de linfócitos T efectores do espaço vascular para o interstício infectado faz aumentar a produção de citocinas e quimiocinas, mas é independente do antigénio. Contudo, se há contacto com este, aumenta a migração.

Algumas das células T de memória também migram para os tecidos e aí estabelecem contacto com os antigénios que lhes são apresentados por APC's e macrófagos. O contacto entre células efectoras de antigénios específicas

com T de memória fazem-nas migrar preferencialmente para o espaço extravascular onde estão os antígenos. As células T não específicas para o antígeno regressam à circulação [26].

Acção dos Th1

A principal acção dos linfócitos Th1 é ajudar as células fagocitárias da imunidade inata, sobretudo os macrófagos, na eliminação dos agentes agressores.

Quando as T efectoras (Th1) são estimuladas pelo antígeno, segregam citocinas (sobretudo IFN γ - principal citocina activadora dos macrófagos) e aumentam a expressão CD40L, necessárias à proliferação e diferenciação de linfócitos B e à activação de macrófagos, tornando-os mais eficientes como APC's porque aumentam os níveis de moléculas envolvidas no processamento antigénico (ex. componentes de proteosomas e catepsinas), aumentam a expressão HLA, aumentam a expressão de moléculas de co-estimulação e a produção de citocinas que estimulam a proliferação e diferenciação de linfócitos T, contribuindo para a ampliação da resposta de imunidade celular.

Desta forma, a resposta funcional macrofágica vê-se ampliada pela acção de moléculas de co-estimulação (CD40) que activam factores de transcrição nuclear (NFkB) e pelo IFN γ activador de STAT 1 e IRF-1 (*interferin response factor 1*). Esta estimulação faz aumentar a quantidade de proteínas produzidas pelos macrófagos activados, expandindo a sua capacidade efectora, traduzida na:

1. Estimulação dos processos inflamatórios com aumento de secreção de citocinas, TNF, IL-1, quimiocinas, mediadores lipídicos de curta semi-vida, PAF (Factor Activador Plaquetar), PG (Prostaglandinas) e Leucotrienos, produzindo um processo inflamatório local rico em glóbulos brancos (neutrófilos) e recrutando monócitos que se transformarão em macrófagos.
2. Destruição de micróbios fagocitados por aumento da produção de espécies reactivas de O₂, NO (óxido nítrico) e enzimas lisosomais, estimuladoras da actividade bactericida. Nos macrófagos, são produzidos lisosomas que servem para destruir micróbios após fusão dos fagosomas com lisosomas. Estas substâncias tóxicas podem ser libertadas nos tecidos onde se localizam os micróbios com o objectivo de os destruírem.

3. Após controlarem a infecção, os macrófagos removem os tecidos necrosados e ajudam na reparação celular, segregando factores de crescimento que estimulam a proliferação de fibroblastos (*platelet derived growth factor*), a síntese de colagénio (TGF- β) e a formação de novos vasos (*fibroblast growth factor*).

Alguns TCD4 são capazes de destruir as células alvo que tinham antígeno/HLA II. São contudo deficitárias em granzinas e perforinas, sendo a destruição celular mediada por FasL.

Diferenciação Th2

A diferenciação Th2 ocorre em resposta à agressão por alérgenos ou helmintas.

Os TCD4 estimulados por antígenos segregam pequenas quantidades de IL-4. Se o antígeno persiste e/ou está presente em grandes concentrações, aumenta a quantidade de IL-4 produzida.

Esta actua sobre receptores T activados, estimulando factores de transcrição STAT 6 e GATA-3, reguladores da diferenciação Th2, induzindo elevação da expressão de genes para a produção de citocinas IL-4, IL-5 e IL-13 e, inibindo a sinalização dos receptores de IL-12.

A principal função efectora das Th2 é o aumento da secreção de IgE, estimulada pelas IL-4 e IL-13, capazes de opsonizarem os parasitas. Os mastócitos expressam receptores Fc ϵ , podendo ser activados pelos parasitas opsonizados por IgE. Os grânulos destes mastócitos possuem aminas vasoactivas, citocinas (TNF) e mediadores lipídicos capazes de induzirem inflamação local que irão destruir os parasitas.

Através da IL-5, estimulam a activação de eosinófilos, que libertam grânulos (contendo bases proteicas e proteínas catiónicas) capazes de destruírem o tegumento dos parasitas.

A fixação de Th2 a certos territórios inflamados depende da produção de determinadas quimiocinas. As Th2 aumentam a expressão de receptores de quimiocinas (CCR3, CCR4 e CCR8) que se unem a outras quimiocinas (CCL11, CCL24, CCL26, CCL7, CCL13, CCL17 e CCL22) que entretanto ampliaram a sua expressão nos locais de infecção parasitária ou de reacção alérgica, especialmente se localizadas às mucosas.

As Th2 têm um papel importante na defesa de barreira a agressões externas. As citocinas produzidas pelos Th2 impedem a entrada e promovem a expulsão de micróbios das mucosas.

Disso são exemplo a IL-13 que estimula a produção de muco e a IL-4 que estimula a peristaltase do sistema gastro-intestinal.

Os anticorpos estimulados pelas citocinas Th2 não promovem fagocitose nem activam o complemento, mas são capazes de neutralizar micróbios e toxinas.

A IL-4 e 13, aumentam a expressão de receptores de manose à superfície dos macrófagos, enzimas promotoras da síntese do colagénio e de fibrose e produzem citocinas anti-inflamatórias (IL-10 e TGF- β).

Este é um processo alternativo de activação dos macrófagos, distinto do clássico mediado pelo IFN- γ do qual resulta um aumento do poder bactericida.

Os macrófagos activados por citocinas Th2 contribuem para a formação de granulomas e para remodelação tecidual no contexto de infecção parasitária crónica ou doença alérgica [27].

TCD4 helper 17

Há um terceiro sub-grupo de linfócitos TCD4 efectores, que segregam IL-17, designados por Th17.

As TCD4 naife na presença de TGF- β^+ (*transforming growth factor*), IL-6, IL-1 (produzidas nas fases iniciais da lesão tecidual) e de outras citocinas pró-inflamatórias diferenciam-se em Th17. A IL-12 promove a sua sobrevivência mantendo a diferenciação de Th17.

A citocina TGF- β promove a resposta pró-inflamatória Th17 e a resposta anti-inflamatória das células Treg. Serão seleccionadas uma ou outra resposta em função da modulação das citocinas presentes.

O principal papel das Th17 é o da protecção contra as bactérias extra-celulares e fungos através do recrutamento de neutrófilos e de outros leucócitos.

d2) Linfócitos TCD8

Os linfócitos T citotóxicas (TCD8) são células T efectoras capazes de eliminarem os micróbios intracelulares com destruição das células infectadas.

Os antígenos (Ag) estimulam os linfócitos TCD8 naife nos gânglios linfáticos, promovendo a sua expansão clonal, com diferenciação e migração de linfócitos T citotóxicos diferenciados para os tecidos.

A resposta TCD8+ divide-se em quatro fases: activação, expansão clonal, contração e memória.

Este é um processo dinâmico que permite ao hospedeiro manter um conjunto de linfócitos T específicos em condições homeostáticas, seleccionando durante uma agressão infecciosa os clones mais úteis para combater a infecção que serão mantidos em stand-by para poderem ser usados em futuros contactos com o agente patogénico.

Em função dos diversos sinais que integram, as células TCD8 naife à semelhança de outras células linfocitárias, irão diferenciar-se nos diversos tipos funcionais – células efectoras ou de memória.

1. Reconhecimento Ag e activação células T citotóxicas

A resposta de linfócitos TCD8+ é desencadeada por antígenos peptídeos fagocitados, presentes no citoplasma das células infectadas, que os apresentam à sua superfície associadas a HLA I. Esse reconhecimento é favorecido pela interacção com co-recetores CD8 em presença de moléculas de adesão ICAM-1 (*intracellular adhesion molecule-1*) principal ligante para o LFA-1 (*leucocyte function-associated antigen 1*).

Há formação de sinapses imunológicas que permitem a activação bioquímica de mecanismos de sinalização e de estimulação celular.

Por vezes a completa activação dos linfócitos TCD8 naife e a sua diferenciação em células T citotóxicas pode necessitar das células TCD4 helper [28] – p.ex. a resposta TCD8 a infecções virusais latentes, transplantados e células tumorais que têm em comum uma fraca estimulação da imunidade celular.

A elevação dos TCD4 helper aumenta a expressão CD25 e a produção de IL-2, com redução da expressão CD62L à superfície dos TCD8+ condicionando o aumento dos TCD8+. As TCD4+ são as principais produtoras de IL-2 para a diferenciação de linfócitos TCD8 [29].

Os linfócitos Thelper podem activar as TCD8 de diversas maneiras, quer segregando citoquinas que estimulam a diferenciação CD8, quer aumentando a expressão moléculas co-estimuladoras CD40L que se liga ao CD40 à

superfície das células apresentadoras de Ag, tornando-as mais eficazes na estimulação TCD8.

A partir daí, a expansão clonal das células TCD8 é auxiliada por diversas citocinas (IL-12, IL-15 e IL-17). A IL-15 promove a sobrevivência das células TCD8 efectoras [30, 31] contrariando as acções apoptóticas do TGF β sobre estas células [32].

Diferenciação de células T citotóxicas

A diferenciação das células TCD8 em células T citotóxicas envolve a aquisição de capacidades para destruir as células alvo, com formação de grânulos citoplasmáticos contendo proteínas (perforinas e granzinas) e segregação de citocinas (IFN- γ , linfotóxina e TNF) capazes de activarem as células fagocitárias e induzirem inflamação.

Estas alterações são suportadas a nível molecular por transcrição de genes codificadores destas moléculas efectoras.

Para que as TCD8 se diferenciem em T citotóxicas é necessário o reconhecimento antigénico, a activação de citocinas sobretudo IL-12, e por vezes, como já vimos, pela acção dos TCD4 helper.

As citocinas e outros sinais das células dendríticas necessários para a diferenciação TCD8 naíves em T citotóxicas não são menos importantes para garantir a funcionalidade efectora das células T. Mas serão as moléculas co-estimuladoras CD28 e receptores TNF os principais determinantes para a proliferação e sobrevivência das TCD8 activadas [25] [33].

As células TCD8 citotóxicas expressam receptores para NK (que servem para activação e regulação das células T citotóxicas), alguns destes receptores são da família Kir (*Killer cell immunoglobulin-like receptor*), reconhecem HLA I nas células alvo, mas não são específicas para nenhum complexo HLA I/peptídeo-antigénio. Quando activadas, transmitem sinais inibidores que protegem as T citotóxicas da destruição e servem para impedir que estas destruam as células normais.

Destruição das células marcadas pelas T citotóxicas

Os linfócitos T citotóxicos podem destruir qualquer célula nucleada desde que expresse o antigénio/HLA I que marcou a diferenciação daquele clone T

citotóxico a partir das TCD8 naife do qual derivam (garante de especificidade). Este é um processo de destruição contínua mesmo que a sinapse com a célula TCD8 deixe de existir.

É feito por libertação de enzimas citotóxicas armazenadas em grânulos citoplasmáticos, libertados na sinapse imunológica, formada pela ligação entre membrana T citotóxica e membrana da célula alvo, mediada por LFA-1 e ICAM-1.

Os grânulos T citotóxicos e NK contêm:

- * granzinas A, B e C (proteases da serina que destroem proteínas) que constituem a principal forma de destruição pelas TCD8 citotóxicas, accionando diversas vias citoplasmáticas que envolvem caspases (ex. caspases 3 e Bcl-2 que activam a apoptose mitocondrial).

- * perforinas que facilitam a entrada das granzinas nas células alvo, promovendo uma destruição da membrana semelhante à do factor 9 do complemento.

As T citotóxicas usam ainda um outro mecanismo letal mediado por interações entre moléculas de membrana T citotóxicas e das células alvo, expressando proteínas de membrana FasL que se ligam aos receptores Fas (morte celular) expressos à superfície de muitas células.

As caspases das células alvo que foram activadas por granzinas e FasL clivam inúmeros substratos, e activam enzimas que destroem o DNA, indutoras por isso da apoptose celular.

Há ainda uma outra proteína (granulisina) existente nos T citotóxicos e células NK, capaz de alterar a permeabilidade das membranas.

É fundamental a destruição de células infectadas por micróbios intracelulares para erradicar os reservatórios de infecção.

Após iniciarem esta acção letal, as T citotóxicas libertam-se das células alvo por diminuição da afinidade dos seus ligands, o que ocorre mesmo antes da morte destas. As T citotóxicas nunca ficam danificadas neste processo, porque os grânulos letais foram colocados dentro das células alvo e, quando os grânulos T citotóxicos são libertados, há uma enzima proteolítica, a catepsina B, que degrada as perforinas perdidas nas proximidades das T citotóxicas.

A diferenciação TCD8+ em células efectoras ou de memória é influenciada por sinais mediados pelos RCT, por moléculas de co-estimulação e citocinas [34] [35].

d3) Células T de memória

Após estimulação antigénica, os linfócitos T que sobreviveram ao processo apoptótico transformam-se em células T efectoras ou em células T de memória específicas para esse Ag que podem sobreviver toda uma vida. Estas sofrem ao longo de um processo de diferenciação, alterações da expressão dos seus marcadores de superfície (Figura 2).

Estes linfócitos T de memória, quando em contacto de novo com aquele antígeno, tornam a resposta imunológica mais potente e rápida.

A população de células T de memória é heterogénea, podendo derivar tanto das TCD4+ como das TCD8+, a partir de diversos estados de maturação das T naife (ex. TCD4+ de memória podem derivar de percursoros antes da diferenciação fenotípica Th1 ou Th2 e, quando reactivadas de novo pelos antígenos podem prosseguir a sua diferenciação para um ou outro fenótipo).

As células TCD8 de memória mantêm algumas características das T citotóxicas efectoras diferenciadas.

LINFÓCITOS

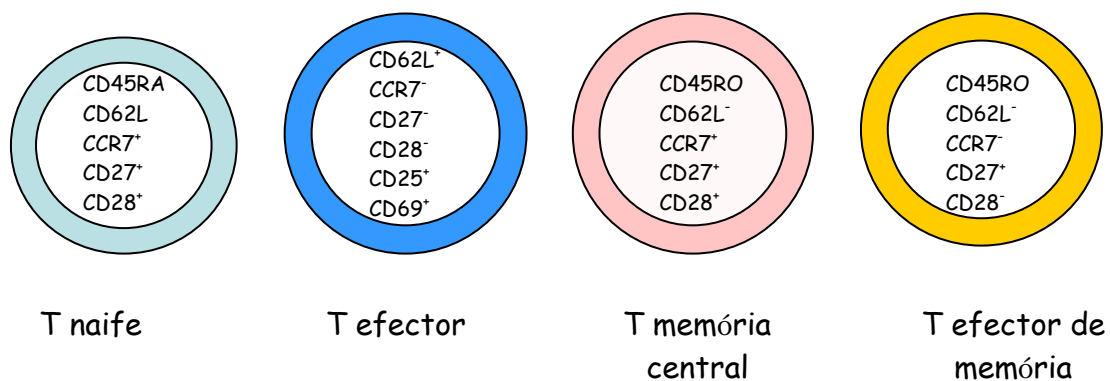


Figura 2 - Fenótipo dos linfócitos T em diversos estádios de diferenciação em função da expressão de alguns marcadores de superfície (a expressão de receptores de superfície para moléculas de diferenciação ou para receptores de citocinas, factores de crescimento, selectinas e quimiocinas vão-se modificando ao longo das diferentes fases de diferenciação das células T).

Tanto as TCD4 como as TCD8 de memória [36] dividem-se em dois sub-grupos, em função da sua localização e das funções efectoras:

T de memória centrais – expressam CCR7 e L-selectina, e estão presentes nos nódulos linfáticos onde se agrupam em linfócitos antigénio específicos rapidamente mobilizáveis para proliferarem e se diferenciarem em células efectoras, sempre que o antigénio invada de novo o organismo.

T de memória efectoras – não expressam CCR7 ou L-selectina, residem nos tecidos periféricos, sobretudo nas mucosas de onde podem ser rapidamente recrutadas para qualquer local de infecção, para activarem respostas efectoras para a eliminação antigénica. Após esta estimulação antigénica, as células efectoras produzem citocinas (IFN- γ) mas pouco proliferam.

A manutenção das células T de memória está dependente de citocinas presentes nos tecidos que suportam uma actividade proliferativa de baixo nível. A IL-7 é uma dessas citocinas, necessária para a manutenção CD4/CD8 de memória [31]. Por isso, as células T efectoras que durante a resposta imune, expressam elevados níveis de receptores para a IL-7 (IL-7R α), são aquelas que sobreviverão, dando origem às células T de memória.

Já a manutenção dos TCD8 de memória necessita também de IL-15 para reduzir o nível proliferativo.

d4) Células T reguladoras (Treg)

A imunidade celular é caracterizada por um dualismo entre a manutenção da capacidade de defesa, face a uma grande variedade de agentes patogénicos, e a tolerância imunológica periférica, assegurada por células T reguladoras (Treg).

Estas, atenuam a resposta efectora de defesa imunitária a agentes patogénicos, impedindo o desencadear de complicações patológicas, mantêm um equilíbrio entre as células de defesa e os comensais do intestino e destroem as células T auto-reactivas que escaparam à deleção clonal tímica.

As células T reguladoras foram inicialmente descritas por Gershon e Kondo [37] que demonstraram a sua capacidade para transmitirem uma tolerância antigénica específica a animais não imunizados.

Mas, foi só em meados da década de 90 que Sakaguchi as descreveu como um tipo de linfócitos TCD4⁺, que expressavam elevados níveis de receptores para a IL-2 α (CD25) com propriedades supressoras da actividade imunológica. Estava feita a identificação fenotípica destas células como TCD4⁺CD25⁺ [38].

Embora sejam incapazes de a produzir, as Treg dependem da IL-2 libertada pelos linfócitos T efectores nos locais de inflamação [39], que através de um processo de feed-back negativo marcarão o início da regulação imunológica que limita a expansão das células T efectoras [40].

É curioso salientar o papel oposto exercido pela IL-2 sobre um grande número de células, ora promovendo a diferenciação Th1 e Th2 e o aumento TCD8 e NK, ora estimulando a apoptose Fas/FasL nas células T activadas, ora inibindo a diferenciação T naife em Th17 (TGF- β 1/IL-6) [41].

As Treg compreendem cerca de 5-10% dos linfócitos TCD4⁺ periféricos e 5% dos timócitos CD4⁺CD8⁻ [38].

Nos territórios periféricos, regulam a actividade imunológica, impedindo que os auto-Acs desencadeiem respostas auto-imunes e, suprimem a activação, proliferação e acção efectora de linfócitos T CD4⁺, CD8⁺, células NK, NK-T, células dendríticas e linfócitos B [42].

Anos mais tarde, o mesmo grupo de Sakaguchi descreve [43] nas células TCD4⁺CD25⁺ uma expressão Foxp3 que é um factor de transcrição da família “*forkhead/winged-helix*” responsável pela activação da funcionalidade Treguladora em células T naife [44].

As células Foxp3 formam complexos com outros factores de transcrição (NfKB, AP-1, NFAT) e regulam a expressão de diversos genes codificadores de factores nucleares que controlam, entre outros, a produção de proteínas de sinalização [45].

As características fenotípicas da actividade reguladora das células Foxp-3 são caracterizadas pela redução da resposta após estimulação imune, com diminuição da produção de IL-2 [46] e aumento da expressão CD5/CTLA-4 e o GITR (*glucocorticoid induced TNF receptor*), regulando desta forma a activação, diferenciação e função efectora de linfócitos T e outras células não-T.

Para além destas propriedades características das Foxp3 com origem tímica, também as células T naife periféricas podem adquirir a expressão Foxp3,

activadas pelas células dendríticas, sob influência de IL-10, TGF- β 1 ou ácido retinóico, transformando-se em Treg, funcional e fenotipicamente iguais às suas congéneres com origem central [47].

Este aumento da transcrição da expressão Foxp3 nos linfócitos T naife após estimulação Ag/RCT não confere por si só funções de supressão, podendo constituir uma forma de controlo regulador intrínseco do desenvolvimento de linfócitos T patogénicos.

Após estimulação antigénica há um clone TCD4+CD25+Foxp3 que prolifera e produz citocinas anti-inflamatórias (TGF- β e CTLA-4). Foi possível confirmar *in vitro* que este clone inibe por contacto (via CTLA-4), a proliferação de IFN- γ pelos TCD4 [48] [49].

As Treg CD4+CD25+Foxp3 suprimem a actividade proliferativa e a resposta mediada por citocinas das células T naife, macrófagos, células dendríticas, NK, NK-T e células B de uma forma antigénio inespecífica [50] [51].

Esta acção supressora das Treg (CD4+CD25+) sobre as células T ou APC's é exercida por contacto directo com as células Tefectoras ou por produção de citocinas inibidoras (TGF- β , IL-10) [52-54] que actuam modulando a maturação das APC's, impedindo a activação e diferenciação das células T [55-58] ou induzindo a apoptose destas [59, 60].

As T reguladoras competem ainda com as T efectoras pela ligação à superfície das células dendríticas (LFA-1), reduzindo a expressão CD80/86 por mecanismo CTLA-4 dependente [50, 61] capaz de suprimir a maturação celular [52] ou de activar uma enzima imunossupressora IDO (*indoleamina 2,3 dioxigenases*) que cataboliza o triptofano em kineurinas destruidoras das células T [62].

Há ainda uma molécula inibidora de membrana associada às Treg – LAG-3 (*Lymphocyte-Activation Gene 3*): é uma proteína de adesão TCD4 que se liga às moléculas HLA II expressas nas células apresentadoras de antígenos, activando vias de sinalização negativas que inibem a maturação e a acção destas células.

Para além de regularem a supressão da actividade das células efectoras T, as Treg podem aumentar a sua destruição através da libertação de enzimas citolíticos - granzina A/B, perforinas e TRAIL-DR5 (*Tumor-necrosis-factor Rrelated Apoptosis Inducing Ligand Death Receptor 5*). – [63].

Regulação das Treg

É evidente que uma hiperestimulação das Treg se associa ao aumento da susceptibilidade à infecção e/ou desenvolvimento de neoplasias. Por isso, durante a resposta imune, estabelecem-se uma série de mecanismos que impedem uma estimulação negativa exagerada.

Desde logo, as citocinas pró-inflamatórias (IL-6, TNF- α) produzidas pelas células dendríticas, inibem a activação/expansão das Treg. Da mesma forma, as células efectoras de memória tornam-se resistentes à supressão pelas Treg. Desta relação entre supressão Treg e a resistência das T efectoras à supressão gera-se uma resposta imune equilibrada e eficiente durante o processo inflamatório.

Sug-grupos Treg

Há quem divida as Treg em função das citocinas que produzem, as Tr1 segregam IL-10 e pequena quantidade de IL-2, IL-4 e TGF β , enquanto as Th3 segregam grandes quantidades de TGF β e pequenas quantidades de IL-10 e IL-4.

Desconhece-se se estas diferenças representam diferenciações de desenvolvimento ou funcionais.

1.Tr1

São Treg que não expressam níveis elevados de CD25 ou de Foxp3. Estes linfócitos TCD4+ são células produtoras sobretudo de IL-10, TGF- β e IL-5, aliadas à baixa produção de IL-2, IFN- γ ou IL-4 [64]. Sabemos que a activação *ex vivo* de TCD4 e IL-10 leva à produção de TCD4 produtoras de IL-10 com redução da atividade proliferativa capazes de suprimirem a resposta T *in vivo* e *in vitro* [63].

Estas Tr1 desenvolvem-se nos tecidos periféricos após estimulação antigénica específica das células T, em presença de elevados níveis de IL-10. A sua acção inibidora mediada por citocinas (produção de IL-10 e TGF- β) é totalmente inespecífica [65]. Esta actividade supressora das células T naife e de memória após estimulação por APC's ou células dendríticas, torna-as reguladoras importantes da imunidade celular.

Diversas situações clínicas relacionadas quer com doenças imunitárias (ex. artrite reumatóide com baixos níveis de Treg e IL-10) quer com situações clínicas de transplante de órgão (ex. transplante medular com aumento Tr1 e ausência de rejeição ou redução de Tr1 e evidência de fenómeno de rejeição), atestam a importância destas células na regulação da resposta imunológica.

2. Th3

Trata-se de uma sub-população de TCD4+ presente na mucosa intestinal que expressa TGF- β . O microambiente intestinal, com níveis elevados de TGF- β , citocinas Th2 e células dendríticas próprias é o promotor do desenvolvimento de células Th3 quando encontram antígenos intestinais, constituindo um importante mecanismo de tolerância para com as bactérias comensais não patogénicas ou alimentos potencialmente imunogénicos.

As Th3 activadas em resposta a antígenos específicos, induzem à semelhança das Tr1, uma inibição inespecífica mediada por TGF- β . As Th3 reduzem a estimulação Th1 e Th2 e activam os linfócitos B na produção de IgA [66].

Os níveis de linfócitos Th3 traduzem a tolerância imunológica local.

2.1.3. CITOQUINAS

As citocinas têm um papel modulador na interacção entre os diversos componentes celulares da resposta imune inata ou adaptativa. A sua importância é tão grande que merece algumas considerações a encerrar este capítulo de caracterização da resposta imunológica à agressão.

As citocinas são polipéptidos produzidos pelas células de defesa orgânica, da imunidade inata e celular, em resposta à estimulação antigénica ou à agressão bacteriana, que regulam a resposta imune e a actividade inflamatória.

A produção de citocinas após activação celular é transitória, sendo mediada por transcrição genética com activação mRNA. Podem também ser produzidas por mecanismo pós-translacional – libertação proteolítica de um produto activo a partir de um precursor inactivo – importante para a produção de TNF.

São caracterizadas por uma actividade pleomórfica com capacidade de actuarem em diferentes tipos celulares, permitindo que a mesma citocina exerça diversos efeitos biológicos, associada a uma actividade redundante, já que múltiplas citocinas podem exercer o mesmo efeito funcional. Estas

propriedades limitam a actuação terapêutica directa de um único fármaco sobre a acção das citocinas

Actuam na própria célula que as segregam, nas células adjacentes e quando presentes em grandes quantidades podem ter uma acção sistémica.

Ligam-se a receptores de superfície das células alvo para os quais tem grande afinidade e elevadas constantes de dissociação, fazendo com que mesmo em pequenas quantidades promovam grandes efeitos biológicos. A expressão celular destes receptores é controlada por estímulos externos que regulam a resposta celular do sistema imune às citocinas. O principal exemplo é a elevada expressão dos receptores de citocinas após estimulação antigénica das células B ou T.

A acção das citocinas sobre as células alvo condiciona modificações da expressão genética e/ou aparecimento de novas funcionalidades (são responsáveis pela diferenciação de linfócitos T ou B, pela estimulação de células efectoras como por exemplo macrófagos e pela activação da função bactericida das células fagocitárias).

Nem sempre a acção das citocinas se exerce por nova transcrição genética ou pela síntese de proteínas de novo, resultando por vezes apenas só na modificação da afinidade de integrinas, na alteração do citoesqueleto que favorece a migração leucocitária ou na activação de enzimas celulares indutoras de apoptose.

Mas, esta resposta celular às citocinas é altamente regulada por mecanismos de “feed-back” negativo (bloqueiam a interacção de cinases sinalizadoras, fosfatases que antagonizam cinases activadoras e moléculas que bloqueiam factores de transcrição) capazes de induzirem genes inibidores dos receptores das citocinas ou das vias de sinalização activadas pelos receptores.

Este variado leque de propriedades faz com que as citocinas produzidas por mononucleares e outras células fagocitárias activadas, sejam mediadoras e reguladoras da imunidade inata e da resposta inflamatória inicial, por acção sobre os leucócitos e células endoteliais.

Regulam, da mesma forma, a imunidade celular, exercendo importante papel na proliferação e diferenciação de células T, bem como na activação das células efectoras especializadas (macrófagos, mononucleares, neutrófilos e eosinófilos) na eliminação de antígenos agressores.

1 - O TNF é o principal mediador da resposta inflamatória aguda a Gram negativos e outros agentes infecciosos, responsáveis por muitas das complicações sistémicas associadas a infecções graves.

É produzido essencialmente por células mononucleares, células T activadas, células NK e mastócitos em resposta à interacção com agentes infecciosos ou outras citoquinas.

A ligação das citoquinas a receptores da família TNF (TNF RI, RII e CD40) recruta proteínas TRAF (*TNF receptors associated factors*) que se ligam a terminais citoplasmáticos destes receptores, activando diversos factores de transcrição, como por exemplo o NFkB (*nuclear factor kB*) e AP-1 (*activator protein -1*).

Embora os receptores tenham características estruturais idênticas, divergem nos terminais citoplasmáticos, com diferentes ligações de sinalização e de activação à proteína TRADD (*TNF receptor associated death domain*) o que condiciona comportamentos fenotípicos diversos das células activadas no sentido pró-inflamatório ou pró-apoptótico:

1 - O FADD (*Fas-associated death domain*) liga-se ao TRADD, e a caspase-8 (protease) liga-se ao FADD activando a cascata das caspases que culmina com a apoptose.

2 - Na activação da via pró-inflamatória e anti-apoptótica – TRAF-2 e RIP-1 ligam-se ao TRADD e activam a transcrição genética de NFkB e AP-1, promovendo a transcrição de uma série de genes da cascata da inflamação (moléculas de adesão endotelial, citoquinas e quimiocinas). O NFkB aumenta a expressão inibidora de células apoptóticas que bloqueiam a ação das caspases.

A principal acção do TNF é estimular e recrutar neutrófilos e monócitos para os locais de infecção, através do aumento da expressão nas células do endotélio vascular de moléculas de adesão (selectinas e ligantes) que se unem a integrinas da superfície dos neutrófilos, monócitos e linfócitos, facilitando a sua migração para os locais de agressão. Além disso, estimula a secreção de IL-1 pelos mononucleares.

2 - IL-1

Mediador da resposta inflamatória produzida após estímulo antigénico lipopolisacárido da parede bacteriana (LPS) por mononucleares, macrófagos, mas também neutrófilos, células endoteliais e epiteliais.

Exerce a sua acção biológica através da interacção com receptores da IL-1, activando factores de transcrição nuclear – NFkB e AP-1.

Quando produzidas em baixas concentrações funcionam como mediadores locais da inflamação, aumentando a expressão de ligands à superfície das células endoteliais, que facilitam a migração de leucócitos para os locais de agressão.

Em grandes quantidades têm uma acção sistémica, contribuindo para os sinais de SIRS – febre, aumento da produção de proteínas de fase aguda e através da estimulação da IL-6 aumenta a produção medular de neutrófilos e plaquetas.

Os mononucleares produzem um antagonista natural contra a IL-1, estruturalmente semelhante, com afinidade para os mesmos receptores mas sem actividade biológica (IL-1ra) que constitui um regulador biológico da actividade da IL-1.

3 - IL-12

Mediador da resposta imune inata aos micróbios intra-celulares por activação da função celular citotóxica de células NK e macrófagos, e indutor crucial da imunidade adquirida na resposta a agentes agressores, pois estimula a produção de IFN γ pelos linfócitos T e células NK que garante a diferenciação de CD4 imaturos em Th1 produtores de IFN γ .

Os principais produtores de IL-12 são as células dendríticas e os linfócitos activados em resposta à estimulação dos TLR por múltiplos antigénios (bactérias e vírus).

Os macrófagos e as células dendríticas produzem também grandes quantidades de IL-12, em resposta à estimulação por diferentes patógenos. A IL-12 assim formada estimula a produção de IFN γ pelas células Nk e células T (Th1 e CD8), activando a fagocitose macrofágica, contribuindo assim para a destruição do agente agressor.

O aumento do IFN γ estimula a produção de TNF pelos macrófagos (potenciando a estimulação destas células pelo LPS) o que faz com que se libertem grandes quantidades de TNF.

4 - IL-10

Citoquina inibidora da actividade macrofágica, das células dendríticas e das células T reguladoras.

É um bom exemplo do controlo do sistema imune. Os macrófagos respondem à agressão microbiológica segregando citocinas e expressando co-estimuladores que activam a resposta imunitária celular T. A acção da IL-10 sobre estes macrófagos termina esta activação.

Além disso, bloqueiam a produção de IL-12 por macrófagos e células dendríticas activadas (já que a IL-12 é um estímulo fundamental para a produção de IFN γ indutor da imunidade inata e adquirida contra a agressão microbiana) e reduzem a expressão co-estimuladora de moléculas da classe HLA II à superfície de macrófagos e células dendríticas (inibindo a activação de células T).

Desconhece-se se o macrófago produtor de citocinas pró e anti-inflamatórias o faz em resposta a estímulos diferentes, ou se o mesmo estímulo com critérios diferentes conduz à produção de citocinas antagonistas.

5 - IL-6

Sintetizada por mononucleares, células endoteliais, fibroblastos e outras células T activadas por micróbios. Sintetizada também em resposta a outras citocinas – IL-1 e TNF.

Estimula a síntese de proteínas hepatocitárias de fase aguda e a produção de neutrófilos a partir de progenitores da medula óssea. Estimula ainda a proliferação de linfócitos B na produção de anticorpos.

6 - IL-2

Factor de crescimento, sobrevivência e diferenciação de linfócitos T, com papel fundamental na modulação da resposta T através das células T reguladoras.

Produzida sobretudo pelos linfócitos T CD4+. A activação das células T por antígenos e moléculas co-estimuladoras, activam genes de transcrição da IL-2, com aumento da produção desta citocina.

A proximidade física entre o receptor da IL-2 (superfície das células T) e as citocinas formadas, fazem com que haja aumento da concentração desta nos receptores na fase inicial da estimulação.

A IL-2 tem papel importante na multiplicação de células T estimuladas pelos antígenos, que é partilhado com outras citocinas. Mas o aumento da expressão dos receptores da IL-2 nas células T reguladoras é exclusivo destas citocinas que regulam a resposta imune.

A IL-2 estimula a sobrevivência, proliferação e diferenciação das células T activadas por antígenos, através de diversas vias:

1. Induz a proteína anti-apoptótica Bcl-2, promovendo desta forma a sobrevivência das células T.
2. Aumenta a produção de citocinas efectoras (IFN γ e IL-4) pelas células T.
3. Promove a proliferação celular.
4. Promove a proliferação e diferenciação de células NK, estimulando factores de crescimento para estas células e aumentando a sua função citolítica produzindo *linfoquinas-activated Killer-cells*.

A IL-2 funciona como factor de crescimento das células B e estimula a produção de anticorpos.

7 - IL-4

Os seus principais produtores são os mastócitos e os linfócitos TCD4+ Th2. Estimulam as células B na produção de IgE, constituindo o principal mediador das reacções de hipersensibilidade imediata (alérgica).

8 - IFN γ

Proteína produzida pelas células NK, CD4Th1 e CD8+

O IFN γ é produzido pelas células T após reconhecimento antigénico, sendo a sua produção aumentada pelas IL-12 e 18. Esta sequência de activação que envolve o IFN γ e a IL-12 é crucial para a resposta da imunidade celular contra agentes microbiológicos.

Exerce variadas funções fisiológicas:

1. Activa macrófagos, para destruírem os micróbios fagocitados.
2. A acção de moléculas co-estimuladoras (CD40) e citocinas (IFN γ) sobre os Th1 contribui para aumentar a função macrofágica.
3. O IFN γ é responsável pela activação macrofágica mediada pelas células NK (imunidade inata).

De facto o IFN γ aumenta a função macrobica dos macrófagos estimulando a síntese de intermediários oxidativos RO (radicais livres de oxigénio) e NO (óxido nítrico), e fá-lo por activação de factores de transcrição genética codificados por enzimas necessários à formação de ROO e NO (oxidase fagocitária e NO sintetase). Estas enzimas são produzidas dentro dos lisosomas, destruindo as bactérias que se encontram no fagolisossoma.

Através de diversas vias, promove a diferenciação de CD4+ imaturos em Th1 e inibe a diferenciação Th2.

Estimula a produção de factores de transcrição (T-bet) que promovem a diferenciação de Th1.

Activa a produção de IL-1L por mononucleares, principal citocina produtora de Th1.

Aumenta a expressão de receptores IL-12.

Inibe a diferenciação Th2 através da suspensão mediada pelo T-bet do GATA-3 factor de transcrição necessário para que as células T imaturas se diferenciem em Th2.

Actua sobre os linfócitos B, promovendo mudanças para a sub-classe de imunoglobulinas capazes de ligação ao receptor Fc das células fagocitárias com activação do complemento, garantindo a fagocitose das bactérias opsonizadas.

Esta dupla acção sobre a produção de anticorpos pelas células fagocitárias, conjugada com a activação directa de macrófagos mediados por estas citocinas, facilita a eliminação microbiana.

O IFN γ estimula a expressão molecular de HLA das classes I e II e de co-estimuladores das APC.

Aumenta a apresentação de antígenos ligados ao HLA, aumenta a expressão de ligantes para as células T e amplia a fase de reconhecimento da resposta imune.

O IFN γ é um activador das células do endotélio vascular, potencia diversas acções do TNF sobre estas células, promovendo a adesão e a migração de linfócitos T para os locais de infecção.

A consequência global da activação do IFN γ é a promoção da reacção inflamatória rica em macrófagos e a inibição da reacção eosinofílica dependente das IgE.

2.1.4. AC MONOCLONAIS

Finalizando o capítulo dedicado à imunologia, abordaremos de forma sucinta a formação de Ac monoclonais, peça fundamental da análise laboratorial que permite hoje aos imunologistas caracterizarem as várias células participantes em respostas imunes, isolá-las, analisar individualmente as suas características, padrão de resposta e funções efectoras.

Assim que os imunologistas descobriram que classes de linfócitos funcionalmente diferentes expressavam também diferentes proteínas à superfície das membranas celulares, procuraram um método para as caracterizar.

A abordagem mais simples era a de produzir anticorpos que selectivamente reconheceriam as diferentes sub-populações linfocitárias.

Inicialmente imunizaram estirpes congénitas de ratos com linfócitos de outras estirpes, conduzindo ao aumento da produção de aloAc (anticorpos que podem reconhecer alelos de proteínas da superfície celular). Estes eram capazes de reagirem com células T murinas e outros tipos de células T. A limitação da técnica é de que estes anticorpos só eram capazes de reagir com as proteínas da superfície das células, que existiam em diferentes formas alélicas.

A capacidade de produzir quantidades ilimitadas de anticorpos específicos com o objectivo de caracterizar determinantes antigénicos, revolucionou a imunologia.

Foram Georges Köhler e Ceasar Milstein quem em 1975 [67], desenvolveram o primeiro método para a produção homogénea de anticorpos monoclonais específicos.

O “rationale” é de que cada linfócito B é capaz de produzir anticorpos específicos durante um tempo limitado. Estes autores descobriram a forma de eternizar essa produção, estimulando a fusão entre células B produtoras de anticorpos e células de mieloma, seguida da selecção das células de fusão com capacidade para produzirem anticorpos de determinada especificidade – HIBRIDOMAS, sendo os anticorpos produzidos Ac monoclonais.

As proteínas de superfície capazes de serem reconhecidas pelos Ac monoclonais, designam-se como marcadores que detêm a capacidade de discriminar diferentes populações celulares, algumas específicas de

determinada linha ou via de maturação, outras com expressões diferentes consoante o estado de activação e diferenciação celular.

Inicialmente estes marcadores de superfície adquiriam o nome dos anticorpos que com eles reagem, o que causava grande confusão. Para resolver este problema, adoptou-se uma nomenclatura uniforme, e assim o marcador de superfície que identifica uma linha celular ou um estado de diferenciação, que tenha uma estrutura definida e seja reconhecido por um grupo (“*cluster*”) de Ac monoclonais, é designado por “*cluster of differentiation*” CD.

Esta nomenclatura de CD permite-nos caracterizar funcionalmente diversas sub-populações linfocitárias, usando as proteínas das membranas dos linfócitos como marcadores fenotípicos.

Assim, os Ac monoclonais são usados para identificar marcadores fenotípicos específicos de determinados tipos celulares (esta é a base para a actual classificação de linfócitos e outros leucócitos), definidos como CD markers, permitindo a análise funcional da superfície dos linfócitos e moléculas que segregam. Tem ainda aplicação no diagnóstico de várias infecções e doenças sistémicas assentes na detecção de antigénios ou anticorpos específicos em circulação, ou nos tecidos através destes Ac monoclonais. Auxiliam-nos no diagnóstico de tumores (Ac monoclonais tumor específicos usados na deteção tumoral por técnicas de imagem. Podem ainda ser utilizados como adjuvantes da terapêutica antineoplásica como por exemplo os Ac anti CD20 (linfoma B) ou os Ac anti receptores factor de crescimento epidérmico tipo 2 (carcinoma da mama). São também usados na terapêutica de anticorpos contra doenças inflamatórias crónicas (ex Ac anti-TNF na artrite reumatóide) [68, 69].

2.2. GLUTAMINA

Sir Hans Krebs, um dos pioneiros da investigação bioquímica, disse acerca da glutamina:

“..há aminoácidos com múltiplas funções mas, a glutamina é sem dúvida o mais versátil.”

É esta versatilidade que ilustraremos neste capítulo, traduzida na regulação de diversos mecanismos moleculares e celulares, implicados no controlo metabólico, na resposta ao stress e na defesa orgânica.

2.2.1. BREVE HISTÓRIA da GLUTAMINA

Nos fins do século XIX, numa carta escrita ao editor do Journal für Praktische Chemie, Ritthausen [70] relatava a descoberta de um novo composto químico obtido a partir das proteínas do tremço e da amêndoa:

“Este novo composto formado durante a ebulição do glúten, em presença de ácido sulfúrico, é um ácido azotado monobásico, cuja fórmula é $C_{10}H_8NO_8$. Chamei-lhe ácido glutâmico, tendo em conta o material do qual proveio”.

Devemos a primeira descrição da glutamina aos trabalhos de Schulze e Bosshard [71] publicados em 1883. Num artigo histórico, designado “Über das Glutamin” descreve: *“a raiz da beterraba contém um amido do ácido glutâmico que, quando aquecido na presença de um ácido, se decompõe em amónia e ácido glutâmico. A este novo composto homólogo da asparagina chamámos glutamina $C_5H_{10}N_2O_3$ ”.*

De facto, os resultados desta importante descoberta conduziram ao seu posterior isolamento, e foram seguidos de numerosos relatos que analisavam e caracterizavam quimicamente a glutamina.

No início do século XX descrevia-se o importante papel que os aminoácidos livres intracelulares exerciam no metabolismo proteico [72].

A primeira referência acerca da presença e da função da glutamina no corpo humano foi-nos dada em 1914 por Thierfelder e Sherwin [73].

Foram usados vários processos analíticos (enzimáticos, microbiológicos e colorimétricos) para avaliarem o conteúdo de glutamina em vários fluídos biológicos, mas só muitos anos mais tarde, com a introdução de métodos

automatizados cromatográficos de troca de iões, foi possível estabelecer a quantidade e distribuição da glutamina em organismos animais e em tecidos humanos [74].

Em experimentação animal, verificou-se que a concentração de vários aminoácidos livres era maior dentro das células do que no espaço extra-celular [75], sendo a glutamina, o principal aminoácido isolado nos tecidos de várias espécies animais.

Na década de 1930, Sir Hans Krebs e colaboradores, conseguiam sintetizar a glutamina *in vitro*, utilizando um modelo de incubação com ácido glutâmico e iões de amónia em amostras de fígado [76]. Simultaneamente, isolou-se no fígado, rim, retina e tecido cerebral, a glutaminase, enzima que cataliza a desaminação da glutamina [77].

Nos anos seguintes assistimos à descoberta das diversas funções executadas pela glutamina, no organismo de diversas espécies.

Leuthardt descreveu em 1944, o importante papel da glutamina na destoxificação de compostos azotados.

Em 1950 Eagle e colaboradores [78], descobriram que a glutamina é um substrato essencial para as células em multiplicação num meio de cultura.

O mesmo grupo [79], revendo as necessidades nutricionais da cultura de células de mamíferos, enfatizava a importância da glutamina como nutriente, fonte energética, doador de valências azotadas para a biosíntese de nucleótidos, aminoaçucares e aminoácidos.

Em 1974 é publicado o primeiro relato fidedigno sobre a concentração de aminoácidos livres intracelulares do músculo do homem [80] que é de 86,5 gr, dos quais 51,8 gr são de glutamina, correspondendo a cerca de 60% do total de aminoácidos intra-celulares.

Como iremos relatar, o músculo esquelético é o principal local de síntese e armazenamento da glutamina, constituindo esta, mais de metade da pool de aminoácidos presentes naquele território muscular, numa concentração total de cerca de 20 mmol/L de água intracelular [80]. Este nível é 30 vezes maior que o da concentração de glutamina circulante (0,6 mmol/L), ilustrando o elevado gradiente que existe entre a concentração intra e extra-celular [81].

Em situações de stress, assistimos à dramática redução da pool de glutamina muscular (cerca de 80%) que resulta da mobilização desta para fora do

músculo esquelético, que se acompanha de atrofia muscular, perda de água intra-celular e um balanço azotado calórico-proteico francamente negativo, tradutor do intenso catabolismo a que estes doentes estão sujeitos [82]. Este estado é tanto mais marcado quanto mais grave é a situação clínica, sendo impossível de corrigir apesar do aumento da síntese e da exportação de glutamina do músculo esquelético. Isto levou Roth [83] a propôr uma teoria de adaptação metabólica das células ao déficite de glutamina no meio, com redução da capacidade proliferativa e da produção de proteínas de defesa orgânica.

Em circunstâncias fisiológicas a glutamina é um aminoácido não essencial, capaz de ser sintetizada a partir do glutamato e da amónia sob acção da glutamino-sintetase. Contudo, em situações patológicas tais como a sépsis, o trauma, a agressão cirúrgica ou neoplásica, as necessidades de glutamina a nível hepático, imunológico e intestinal ultrapassam largamente as possibilidades de mobilização endógena das reservas musculares de glutamina [84-86], reduzindo as concentrações plasmáticas e musculares de glutamina em mais de 50%, tornando-nos nestas circunstâncias dependentes de aporte exógeno, passando a designar-se [87] aminoácido condicionalmente essencial. Embora reconhecido, este déficite de glutamina em doentes graves, sujeitos a intenso stress catabólico, foi impossível de corrigir durante largos anos, pois a solubilidade reduzida (~3 gr/100 cc a 20°C) e a instabilidade, especialmente durante o aquecimento necessário à esterlização ou o armazenamento prolongado, limitavam a sua utilização clínica como suplemento da nutrição artificial [88].

Era possível, apesar de tudo, juntar glutamina a uma solução comercial de aminoácidos, desde que esta mistura se realizasse imediatamente antes de ser administrada e que a preparação fosse a feita a + 4°C, em condições de estricte assépsia, de preferência em câmara de fluxo laminar [89, 90]. Além disso, para reduzir o risco de precipitação, a concentração de glutamina numa solução não deveria exceder 1 a 1,5%. Isto representava um desafio no doente crítico, em especial se fosse necessário fazer restrição de volume. Daí que, durante longos anos, a administração de glutamina por via parentérica ficou reservada a alguns estudos estritamente controlados.

A tecnologia permitiu ultrapassar este problema através da criação artificial de dipeptídeos, conjugando glutamina com alanina (ALA-GLN) ou glicina (GLY-GLN) e, desta forma, garantir a solubilidade em água e a estabilidade durante a esterlização e o armazenamento prolongado [91, 92].

Hoje é possível suplementar as habituais soluções para nutrição parentérica com glutamina sob a forma de dipeptídeo [93], e perfundi-las em veia central ou periférica [94].

Estudos realizados em humanos voluntários saudáveis, mostraram que a alanyl-glutamina era rapidamente hidrolizada após administração endovenosa, com um tempo de semi-vida de 3 a 4 minutos [95, 96]. A infusão contínua de ALA-GLN ou de GLY-GLN não se acompanhou de complicações secundárias, foi bem tolerada [97, 98], e fez aumentar as concentrações orgânicas de alanina, glutamina e glicina. Durante a infusão, só se encontraram concentrações plasmáticas vestigiais destes aminoácidos, sugerindo a hidrólise praticamente completa dos dipeptídeos infundidos.

Também num grupo de doentes críticos, a administração de glutamina sob a forma de L-alanyl-L-glutamina a 20%, na dose de 0,5 g/kg (correspondente a 0,35 g/kg de glutamina), foi bem tolerada metabólicamente durante um período de infusão de 4 horas. No grupo suplementado com glutamina havia um rápido aumento das concentrações séricas, comparativamente ao grupo não suplementado, com uma semi-vida de 0,26 horas (0,15-0,63 horas) e uma excreção urinária reduzida, idêntica entre os dois grupos, com retorno aos valores séricos pré-infusão 8 horas após o fim desta. O volume de distribuição do dipeptídeo era superior ao volume de água extra-celular, traduzindo a rápida hidrólise deste, com entrada da glutamina no interior das células [99].

2.2.2. METABOLISMO DA GLUTAMINA

2.2.2.1. Entrada de Glutamina nas células

A glutamina é um composto solúvel em água, que lhe permite a rápida passagem através das membranas celulares, ao contrário do seu precursor, o glutamato, que necessita de transporte específico [100]. Apesar disso, a glutamina não consegue entrar livremente dentro das células porque a sua

concentração intra-celular está acima do equilíbrio de distribuição transmembrana, por isso o transporte de glutamina é altamente regulado.

Existem vários sistemas de transporte para a glutamina, que agrupamos em sódio-dependentes e sódio-independentes. Os primeiros utilizam o potencial energético presente no gradiente electroquímico de sódio transmembrana, mantido pela Na⁺/K⁺ ATPase, para conseguir captar aminoácidos contra o seu gradiente de concentração [101]. O potencial eléctrico transmembrana, mantido pela carga negativa intracelular, promove a ligação do sódio ao seu transportador, aumentando a afinidade da glutamina por este, criando-se um complexo Na/GLN co-transportador. Uma alteração na configuração deste complexo permite a entrada de sódio e GLN no interior da célula.

Os transportadores de glutamina Na⁺ dependentes, incluem os sistemas ASC, N, A, B0+ e Y+2, enquanto que os independentes de sódio incluem os sistemas L e b 0,73. Não são exclusivos da glutamina, pois transportam outros aminoácidos.

O movimento de aminoácidos através de outros canais sem sódio, fica dependente das concentrações relativas de aminoácidos de um e de outro lado das membranas, tornando a dinâmica do transporte, função do gradiente transmembrana.

A expressão destes transportadores varia de tecido para tecido (ex. sistemas ASC presentes no fígado, rins, musculo esquelético, células epiteliais intestinais, pulmão, placenta e pâncreas). Os sistemas N (transportam glutamina, histidina e aspargina), têm um leque de distribuição mais curto, expressando-se sobretudo no fígado e músculo esquelético, sendo neste último um limitador da velocidade do metabolismo.

Contudo, não podemos esquecer que existe uma grande variabilidade nos níveis de substractos intra-celulares e no potencial eléctrico transmembrana, fazendo com que, para os mesmos níveis de expressão entre os diversos grupos celulares, a afinidade da glutamina por cada sistema seja muito variável.

Apesar de identificados, ainda não é claro como se regulam os diferentes níveis de transporte, pelo que são necessários mais estudos para compreendermos a influência que estes sistemas têm no fluxo inter-orgãos.

Em situações de catabolismo há um reajuste na captura de glutamina através do sistema N entre o fígado e o músculo esquelético, com aumento da captação hepática e redução no músculo esquelético.

Atendendo ao elevado teor de glutamina dentro das células, a maioria do efluxo é feito por canais independentes do sódio.

2.2.2.2. Síntese e degradação

Cada molécula de glutamina contém 2 grupos azotados, um grupo amino e um grupo amida, ligados por um esqueleto de carbono (Figura 1).

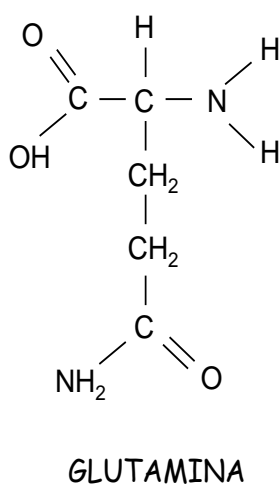


Figura 1 – Molécula de glutamina: com um esqueleto central de carbono que liga dois grupos azotados (grupo amida e grupo amino) em cada extremidade da molécula

A regulação do metabolismo da glutamina é feita por duas enzimas intracelulares, que regulam quer a sua síntese (glutamino-sintetase) quer a sua degradação (glutaminase).

A maior parte da GLN circulante tem origem na “síntese de novo”, que ocorre no fígado ou no músculo esquelético, a partir do glutamato e da amónia, por acção da glutamino-sintetase [102, 103]. Esta síntese endógena só é inibida por valores séricos de GLN, superiores a 125 mg/Kg/h.

Não está bem estabelecido de onde provém a fonte de carbono para a síntese de GLN molecular, mas pensa-se que a propionil CoA, derivada do metabolismo dos aminoácidos de cadeia ramificada valina e isoleucina, pode ser carboxilada em succinil CoA, que depois de convertida em oxolacetato e conjugada com acetil CoA se transformará em citrato e depois em α -cetoglutarato.

A glutamina é depois formada a partir do α -cetoglutarato, aminoácido do metabolismo intermediário do ciclo tricarboxílico, numa reacção com transferência de 2 grupos azotados mediada por aminotransferases, que ocorre em duas etapas.

Na primeira, o α -cetoglutarato é transformado em glutamato por acção duma transaminase, com ganho de um grupo amino, transferido de outro aminoácido para o carbono α do α -cetoglutarato.

De seguida, o glutamato é transformado em glutamina por combinação com um grupo amónia (NH_4), numa reacção dependente de energia com hidrólise de 1 molécula de ATP, catalizada pela enzima ubiquitária glutamino-sintetase (Figura 2).

Esta reacção é irreversível e sujeita a múltiplos reguladores, que incluem alguns produtos e sub-produtos da mesma reacção (GLN, glutamato, ATP, amónia, α -cetoglutarato).

Assim, a formação de glutamina a nível tecidual não é mais do que a incorporação de grupos azotados no esqueleto de carbono resultante da degradação de aminoácidos de cadeia ramificada.

Embora a generalidade das células orgânicas possuam glutamino-sintetase [104], em circunstâncias normais a glutamina é sintetizada sobretudo no músculo esquelético, nos hepatócitos perivenosos [105], no cérebro e pulmão, tecidos que produzem glutamina para exportação [106].

A expressão da glutamino-sintetase é influenciada em situações agudas de stress pelo aumento de glucocorticóides, que caracterizam a resposta hormonal secundária à elevação de citocinas [107], com aumento dos níveis de mRNA por acção directa sobre o gene da glutamino-sintetase.

Em situações crónicas de stress será a concentração de glutamina no meio que, a nível pós-transcricional, influencia de forma directa a velocidade de

degradação da glutamino-sintetase [108], ou regula a expressão de genes para a sua síntese [109].

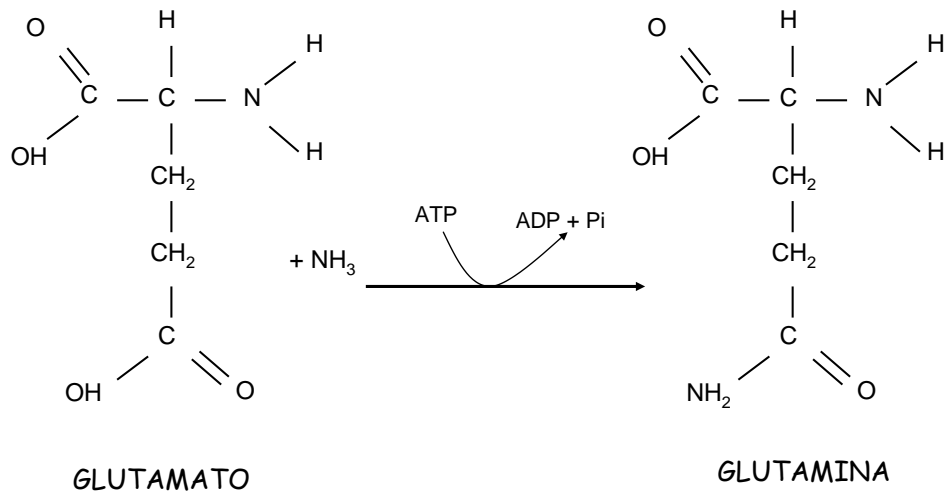


Figura 2. A glutamino-sintetase, catalisa a formação de glutamina a partir do glutamato e da amónia (NH₃) num processo dependente de energia

O fluxo endógeno da glutamina é determinado pela degradação de proteínas musculares e pela sua “síntese de novo”, de forma a manter concentrações séricas constantes de cerca de 600 uM/L.

O turnover endógeno da glutamina (captura e libertação plasmática) é, no homem, adulto de 300 μmol/Kg/h [110]. Cerca de 15% é metabolizada pela mucosa intestinal e outros 15% são captados pelos rins [111].

A maioria dos tecidos são consumidores de glutamina, possuindo grandes quantidades de glutaminase presente nas células epiteliais, intestinais, fibroblastos, linfócitos, macrófagos, células tubulares renais, hepatócitos periportais, células endoteliais e células acinares pancreáticas [112-120].

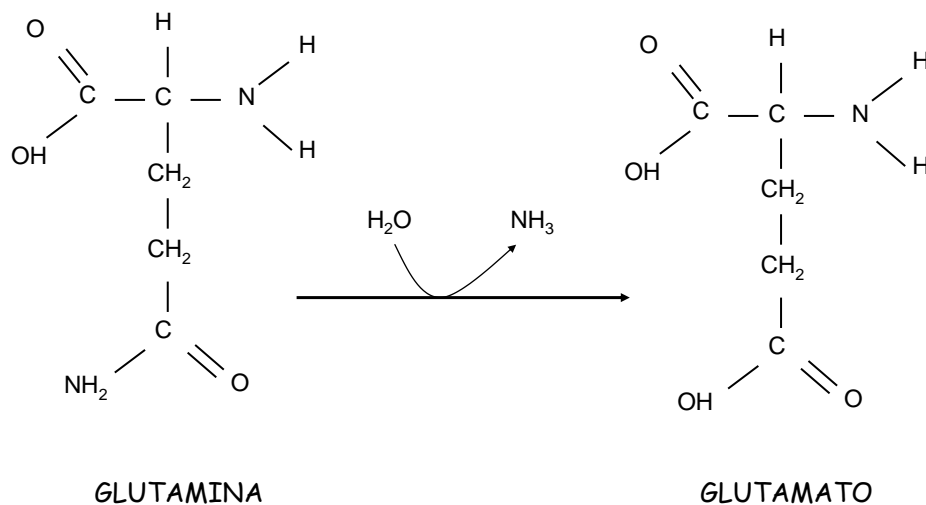


Figura 3. A glutaminase catalisa a hidrólise do grupo amida (NH₂) da glutamina, dando origem à amónia (NH₃), para ser catabolizada no ciclo da ureia.

A hidrólise da glutamina inicia-se com a perda de um grupo amina para formar glutamato (Figura.3), sob acção quer de transaminases citoplasmáticas que utilizam o grupo azotado da glutamina numa série de vias metabólicas, quer de glutaminases mitocondriais das células utilizadoras de glutamina (fígado, rim, enterócito e células imunes) que darão origem a quantidades equimolares de glutamato e de amónia [121]. O glutamato então formado sofre transaminação com perda de novo ião amónia (acção da glutamato desidrogenase), transformando-se em α cetoglutarato.

A amónia resultante destas reacções é transformada no fígado através do ciclo da ureia ou é excretada directamente pelo rim.

O esqueleto de carbono do α cetoglutarato, segue a via catabólica de todos os aminoácidos, entra no ciclo tricarboxílico podendo ser directamente degradado em ATP, CO₂ e H₂O ou ser utilizado na síntese de lactato, piruvato ou alanina.

A glutamina é um composto não tóxico, resultante da associação entre o glutamato e a amónia (produto tóxico), proveniente da degradação de compostos azotados. A formação de glutamina serve, assim, como processo de destoxificação da amónia, removendo-a dos tecidos periféricos e

transportando-a aos órgãos onde será excretada (rins) ou convertida em ureia (fígado).

Em fígados isolados de ratos, a perfusão com glutamina aumenta a secreção de ureia [122], ilustrando o papel importante da glutamina hepática na destoxificação da amónia.

A glutamina que chega ao fígado (região periportal) é rapidamente transformada pela glutaminase em α cetoglutarato e a amónia libertada incluída no ciclo da ureia (Figura 4).

Na porção perivenosa hepática existem elevadas concentrações de glutamino-sintetase que convertem o glutamato e o excesso de amónia em glutamina, contribuindo para reduzir a níveis não tóxicos as concentrações de amónia no sangue venoso hepático.

Desta forma, com este ciclo de glutamina inter-órgãos, o fígado destoxifica eficazmente o conteúdo sanguíneo de amónia e controla os níveis de glutamina.

O rim, através de uma isoforma da glutaminase, sintetiza de novo a amónia a partir da glutamina, excretando este composto tóxico e regenerando valências básicas, contribuindo assim para o equilíbrio ácido-básico.

Sabe-se que 50% dos compostos azotados excretados pelo rim, quer sob a forma de ureia, quer sob a forma de amónia, são derivados do catabolismo da glutamina.

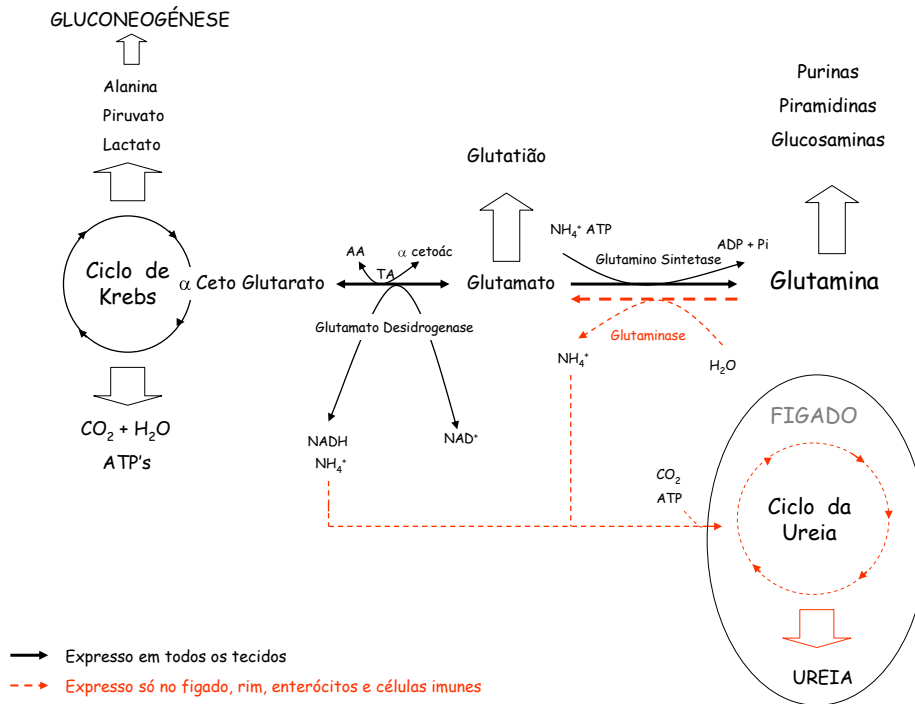


Figura 4 Funções metabólicas da síntese e degradação da glutamina.

Usada como substrato da síntese de nucleótidos e do glutatião. Fornecendo o seu esqueleto de carbono para a degradação energética no ciclo de Krebs e aminoácidos para a gluconeogénese. Transportadora de valências tóxicas azotadas que serão degradadas no ciclo da ureia hepático e excretadas pelos rins. [Transaminases (TA); Aminoácidos (AA); Amónia (NH_4)]. Adaptado de Roth in *Metabolic and Therapeutic Aspects of Aminoacids in Clinical Nutrition* 2ªed CRC Press 2004.

Além de ser utilizada como substrato do metabolismo intermediário, a glutamina pode ser usada como fonte de energia, catabolizada através do ciclo de Krebs no interior das mitocôndrias.

Existe uma relação positiva entre a capacidade de utilização da glutamina, a actividade da glutaminase mitocondrial e o estado de proliferação celular de linfócitos, timócitos e células com estimulação mitogénica [123].

Os timócitos activados, quando sujeitos a um estímulo proliferativo, aumentam 3 vezes mais a actividade da glutaminase e utilizam 8 vezes mais glutamina [124].

Este aumento da utilização de glutamina pelas células proliferativas parece traduzir uma maior necessidade energética e de substratos para o metabolismo intermediário e para a síntese de macromoléculas [125, 126].

A glutaminase não é exclusiva das células que mais se multiplicam, estando presente também em células quiescentes, como as células musculares, astrócitos e células neuronais [127, 128].

2.2.3. FUNÇÕES FISIOLÓGICAS da GLUTAMINA

A glutamina é muito mais do que um simples aminoácido necessário à síntese proteica, desempenhando uma série de funções importantes no metabolismo intermediário e em diversas vias metabólicas [88].

1. é um precursor da síntese de ácidos nucleicos, fornecendo compostos azotados para a síntese de purinas, pirimidinas, nucleótidos e aminoaçucres.
2. é o substrato mais importante da amoniogénese renal, com papel relevante no equilíbrio ácido-base.
3. é o principal aminoácido livre circulante, transportador preferencial de valências azotadas entre o compartimento muscular e os diversos órgãos.

A sua participação em reacções de desaminação torna-a num regulador da homeostase dos aminoácidos.

Serve de substrato energético às células com grande turnover – enterócitos, linfócitos e macrófagos. Contribui para a manutenção da integridade funcional das células de diversos órgãos, através da manutenção das reservas antioxidantes e do restaurar da capacidade de defesa orgânica [129-133].

A administração de glutamina por via parentérica melhora o balanço azotado, aumenta a síntese proteica, melhora a função imune, preserva a permeabilidade da barreira intestinal, reduz a mortalidade, e o tempo de internamento numa população de doentes críticos [134-136]. Estes benefícios estão relacionados com a manutenção dos níveis intra-celulares de glutatião e do efeito protector das HSP [137-139]. Além disso, a glutamina tem um papel importante no metabolismo, modificando a oxidação dos ácidos gordos e reduzindo a hiperglicémia e a insulino-resistência [140].

2.2.3.1. Fornecedora de energia/transportadora de valências azotadas

A glutamina constitui cerca de 1/3 de todos os compostos azotados circulantes [141] atingindo uma concentração plasmática de 650 $\mu\text{mmol/L}$, muito superior à de qualquer outro aminoácido.

Cerca de 60 a 80% do fluxo plasmático de glutamina é resultante da “síntese de novo”, cabendo à glutamina proveniente da dieta um papel menor [142].

A produção endógena de glutamina (glutamina-sintetase) é assegurada quase na totalidade pelo músculo esquelético à qual se juntam pequenas contribuições do pulmão e do cérebro. No adulto saudável, esta produção, avaliada por diferentes técnicas [143-146] é de 50-70 g nas 24 horas.

A glutamina constitui 5 a 10% do total de proteínas dos alimentos habituais, por isso, uma dieta que contenha 100-200 g de proteínas por dia fornecerá cerca de 5-20 gr de glutamina. Isto faz com que o aporte exógeno contribua entre 5 a 40% para o total de glutamina disponível.

As células podem sobreviver num meio sem glicose desde que tenham quantidades suficientes de glutamina e ácidos nucleicos precursores [147, 148].

Há quase duas décadas Gonzalez-Mateos [149] demonstrou que a glutamina, o aspartato e o glutamato, impediam a glicólise em células de tumores de Ehrlich e faziam-no inibindo a fosfofructokinase. Estas células, face ao aumento das necessidades energéticas, em vez de degradarem glicose usam a glutamina como substrato do ciclo tricarboxílico.

A quantidade total de energia produzida a partir da glutamina depende das proporções disponíveis de glutamina e de glicose, assim como do estado proliferativo das células (ex. os linfócitos activados oxidam grandes quantidades de glutamina desde que esta esteja disponível) [123, 124, 149-153].

A glutamina tem um papel importante na regulação do metabolismo, intervindo na gluconeogénese (processo pelo qual o fígado converte as cadeias de carbono de vários aminoácidos como por exemplo a alanina e a glutamina, em glicose) e ao mesmo tempo incorpora os grupos azotados no ciclo da ureia, facilitando a sua excreção. Desta forma, o fígado, em função das necessidades metabólicas orgânicas, comporta-se quer como consumidor quer como produtor de glutamina [154].

A infusão de glutamina faz aumentar as concentrações séricas deste aminoácido e os níveis de glicémia, sem alterar os níveis de insulina ou glucagon [155]. É, pois evidente que a glutamina actua quer como substrato quer como modulador do metabolismo da glicose.

A glutamina reduz a insulino-resistência, particularmente no tecido adiposo, inibindo a oxidação dos ácidos gordos e a lipólise, contribuindo para a melhoria do metabolismo da glicose [156].

No indivíduo saudável o principal local do catabolismo da glutamina é o intestino delgado, onde o seu esqueleto de carbono pode ser catabolizado no ciclo de Krebs, transformado em piruvato, e depois oxidado em acetil CoA ser usado pelos enterócitos como fonte energética [150, 157], ou transaminado em alanina, libertada no circuito portal e captada pelo fígado onde integrará a via da gluconeogénese [158]. Desta forma a glutamina participa activamente ainda que de forma indirecta através da alanina, na síntese da glicose de novo [159].

Para além dos enterócitos, também o tecido linfóide associado à defesa intestinal (nódulos linfáticos, baço, timo, placas de Peyer, neutrófilos, monócitos e macrófagos), usa a glutamina como substrato energético. Em condições fisiológicas 1/3 da produção de ATP em cultura de enterócitos, linfócitos e monócitos é assegurada pela glutamina [160, 161].

A glutamina é particularmente importante para o metabolismo dos neutrófilos em situações de baixa concentração de glicose, ou de incapacidade da sua utilização funcional [162].

Porém, apesar desta estreita relação entre a glutamina e as células intestinais, estas não estão totalmente dependentes da glutamina para realizarem o seu metabolismo intermediário [163]. As células intestinais podem utilizar o glutamato e prolina provenientes da dieta, para a síntese de aminoácidos ou como substratos produtores de energia [164, 165]. Por outro lado, as células intestinais detêm a capacidade de sintetizar a glutamina através da glutamino-sintetase, por isso não estão totalmente dependentes da absorção de glutamina do meio extracelular.

Os linfócitos e macrófagos, particularmente quando são activados, utilizam grandes quantidades de GLN como fonte energética. Aqui, o principal sub-produto da degradação do seu esqueleto é o aspartato (percursor da síntese de pirimidinas e dador de aminas para a síntese de purinas), com pouca ou nenhuma produção de alanina, citrulina ou prolina.

O rim usa GLN para excretar valências ácidas (amónia) e reter catiões importantes (bicarbonato) e, desta forma, corrigir desequilíbrios ácido-básico em situação de acidose metabólica.

2.2.3.2. Glutamina precursora de macromoléculas

Nem toda a GLN é usada como substracto energético, cerca de 20% serve para a síntese de macromoléculas [166, 167]. Em situações de estimulação linfocitária esta proporção pode aumentar.

A glutamina é doadora de grupos amina directamente envolvidos na síntese de ácidos nucleicos, fundamentais para a síntese de DNA. A título de exemplo, 3 moléculas de GLN (grupos amina) contribuem para a síntese de 1 molécula de purina. De igual forma, a pirimidina é sintetizada numa sequência de reacções que envolvem a GLN e o aspartato. Este papel como precursor de ácidos nucleicos é importante para a proliferação de linfócitos e macrófagos [168].

Existe uma estreita relação entre a glutamina o volume celular e o metabolismo proteico – a adicção de glutamina a um meio de cultura estimula a síntese de DNA, RNA e proteínas [169]. Este duplo estímulo mitogénico e anabolizante necessário à activação e proliferação de linfócitos e monócitos, associa-se ao aumento do volume celular [82], com retenção de água e iões no interior das células, conferindo-lhe efeitos protectores. Esta osmosinalização activa igualmente cinases reguladoras de sinal e da actividade mitogénica.

É evidente que as células orgânicas com elevada cinética, tais como os enterócitos e as células de defesa imunológica são os principais utilizadores destes substractos. Além disso participa na formação de glicosaminas - glicosamina, aspargina e nicotinamida adenina dinucleótido (NAD⁺) – necessárias para a formação e reparação de diversos tecidos corporais.

2.2.3.3. Participação da glutamina nos mecanismos de protecção celular e de defesa orgânica

O papel da glutamina nos mecanismos de protecção celular é multivariado, modulando a resposta inflamatória, reduzindo a produção de citocinas pró-inflamatórias (TNF α) e protegendo as células da destruição apoptótica, através da expressão da HSP (*Heat Shock Proteins*) e do aumento das defesas anti-oxidantes.

a) Manutenção da integridade funcional das diversas células orgânicas – papel da glutamina na preservação das Heat Shock Proteins (HSP)

As HSP (*heat shock proteins* ou proteínas de choque térmico) inicialmente descritas em larvas de *Drosophila Melanogaster* [170, 171] expostas a um choque térmico, são proteínas conservadas no processo evolutivo, presente em todos os microrganismos das células vivas.

Foram identificadas proteínas de diversos pesos moleculares (15-110 kDa) designadas colectivamente como HSP.

Induzidas pela temperatura e por várias formas de stress (hipertermia, hipóxia, acidose, elevação de radicais livres de O₂, isquémia-reperfusão), protegem as células contra mediadores citotóxicos [172, 173] reduzindo a falência multiorgânica e a mortalidade em modelos animais de sépsis [137, 174-176].

Estão presentes dentro das células (citoplasma, organelos citoplasmáticos e núcleo) e no espaço extra-celular [177] onde exercem funções imunomoduladoras quer da imunidade inata quer adquirida [178, 179].

A expressão HSP 70 à superfície das células infectadas torna o reconhecimento mais fácil por parte das células apresentadoras de antígenos e células T [180], serve de marcador para as células NK actuarem e exercerem a sua actividade lítica sobre elas [181]; quando expressas à superfície das células apoptóticas facilitam o seu reconhecimento por células apresentadoras de antígenos ou a sua fagocitose por macrófagos promotores da sua destruição [182].

O seu papel na imunidade inata está bem definido: aumentam a expressão de moléculas co-estimuladoras e de HLA à superfície das células dendríticas, estimulam várias células da imunidade inata [183] que libertam cito e quimiocinas ampliadoras do processo inflamatório, promovem a maturação e a migração das células apresentadoras de antígenos assim como a sua interacção com as células T, ligam-se a peptídeos antigénicos de tumores e vírus apresentando-os às células T CD4 e CD8, cooperando com a imunidade celular [184].

Libertadas em situações de stress, activam macrófagos, células dendríticas, células NK e células T [185].

Wang [180] sugere que através da expressão das HSP 70 é possível melhorar a interacção entre as células dendríticas e as células T, por regulação indireta da expressão CD 40L à superfície das células T.

Mas, se o reconhecimento da sua acção sobre a imunidade inata está bem documentado, pouco se sabe sobre a relação entre as HSP e a imunidade celular.

A expressão HSP-70 à superfície das células dendríticas em situações de stress faz aumentar a produção de IL-15 (dependente de NFkB) [186], activadora essencial das células T de memória (CD4+CD45RA). Esta activação é independente da interacção entre o complexo antigénio-HLA II e o RCT, alargando a perspectiva de actuação das HSP 70 na regulação da imunidade adquirida.

Foi demonstrado *in vitro* que a indução de HSP-70 em linfócitos isolados é condicionada pela disponibilidade de glutamina, de uma forma dose dependente [187].

A depleção de glutamina em doentes com síndromas de resposta inflamatória sistémica, associa-se à diminuição da expressão mRNA HSP 70 nas células de defesa orgânica [188-190] e do epitélio intestinal [175, 191]. Com a diminuição da expressão desta proteína de choque térmico regista-se um compromisso da funcionalidade e da sobrevivência dos leucócitos, que poderá estar na génese da depressão imunitária observada nestes doentes [192].

Em diversos modelos de experimentação animal foi possível associar a administração de glutamina com recuperação da expressão HSP-70, e a melhoria dos processos inflamatórios e da mortalidade nos animais estudados [193, 194].

A glutamina aumenta a expressão das proteínas de choque térmico em leucócitos [187], monócitos [195] e neutrófilos [196].

Concretamente, as HSP 70 e 72 responsáveis pela integridade das proteínas celulares vêm a sua expressão em macrófagos alveolares e célula epiteliais serem aumentadas pela glutamina [197], conferindo-lhes em situações sépticas, protecção contra a agressão [198, 199].

Em doentes graves internados em Medicina Intensiva, foi possível demonstrar que a administração de glutamina por via parentérica permitia a recuperação dos níveis séricos de HSP-70 [200].

Demonstrou-se recentemente que o mecanismo molecular através do qual a glutamina aumenta a expressão das HSP-70, está dependente da activação da via das glicosaminas (O-GlcNac) com a O-glicosilação e a fosforilação de factores de transcrição (HSF-1 e Sp-1) necessários para a activação das HSP-70 [193, 194, 201].

Numa população de doentes de cuidados intensivos, Paul Wischmeyer verificou que a administração de glutamina endovenosa aumentava a expressão de HSP72 à superfície das células mononucleares, sendo esta resposta dose-dependente de glutamina [202].

A indução de HSP-72 requer a ligação de um factor de transcrição das proteínas de choque térmico (HSF-1) a um elemento de choque térmico (HSE) na região promotora do gene da HSP-70 [203]. A glutamina ao induzir a fosforilação do HSF-1, vai aumentar a expressão HSP e a protecção celular contra a agressão [201].

Em situações agudas de stress há um aumento de HSP-72 nos espaços extracelulares (eHSP-72), que estimula o processo inflamatório [204] e os mecanismos da imunidade inata mediados por estimulação adrenérgica [205]. A libertação desta HSP-72 acontece mesmo na ausência de necrose celular, aparecendo no fluido alveolar de doentes com ALI (Acute Lung Injury), protegendo o epitélio alveolar contra o stress oxidativo [206].

b) Manutenção da integridade funcional das diversas células orgânicas – papel da glutamina na defesa anti-oxidante

O stress oxidativo está frequentemente presente em doentes graves, como consequência da produção contínua de valências azotados e radicais livres de oxigénio, aliados ao consumo das defesas anti-oxidantes [207]. Nestas circunstâncias a oxidação proteica, a peroxidação lipídica e a lesão do DNA condicionam a destruição celular com a instalação de falências multi-orgânicas. Enquanto a glutamina protege as células contra o stress oxidativo, removendo ou reparando as proteínas lesadas, o glutatião (GSH) reage directamente com os radicais livres de oxigénio e impede as lesões oxidativas.

O glutatião (GSH) é um tripeptídeo anti-oxidante composto por glutamato, cisteína e glicina, importante regulador do potencial anti-oxidante celular, tendo

um efeito protector contra o stress oxidativo [168] como regenerador de radicais livres de oxigénio e de peróxidos [208].

O estado redox intracelular é fundamental quer para a multiplicação celular quer para a activação de diversos factores de transcrição nuclear [209].

O glutatião que se encontra em circulação, é produzido sobretudo nas células musculares esqueléticas e nos hepatócitos, sendo a sua libertação proporcional às concentrações tecidulares [210], reflectindo assim o stress oxidativo sistémico [211].

A sua concentração tecidular (musculo, fígado, pulmão, intestino delgado e tecido imune) diminui em resposta à activação inflamatória (SIRS) ou infecciosa [212, 213], estando esta diminuição relacionada directamente com o aumento da mortalidade a curto prazo [214].

Esta redução é consequência do consumo de anti-oxidantes e da diminuição da produção de glutatião no músculo esquelético e nos hepatócitos [210] provavelmente por declínio dos aminoácidos precursores (cisteína, glicina e glutamato).

O estado pró-oxidativo que se instala é proporcional à gravidade da situação clínica e ao tempo de internamento em Medicina Intensiva [215]. A normalização do nível de glutatião associa-se à melhoria do prognóstico destes doentes.

Existe uma estreita relação entre a redução de glutamina e a diminuição intracelular de glutatião em cultura de células mononucleares [209] células T de ratinhos [216] e linfócitos nas placas de Peyer [217].

Esta redução de glutamina conduz à depleção do conteúdo de glutatião intracelular, que favorece um estado pró-oxidativo e activa diversas proteínas sinalizadoras [proteína B kinase, proteína fosfatase 1 e 2^a, NFkB, JAK (*Janus Kinase*), ASK 1 (*Apoptosis Signal Regulated Kinase 1*) e MAPK (*Mitogen-Activated Protein Kinase*)] [218], que reduzem a proliferação celular, aumentam a produção de citocinas e a apoptose [219-221].

A redução dos níveis de glutatião associa-se à redução da estimulação e proliferação de linfócitos T citotóxicos e de leucócitos em doentes críticos [222], demonstrando que as células de defesa orgânica são incapazes de manter os seus níveis de glutatião em situações de depleção de glutamina.

O suporte nutricional com glutamina por via parentérica, realizado em diversos modelos animais demonstrou restaurar os níveis séricos e tecidulares de glutatião e reduzir o número de infecções [223-225].

O enriquecimento de nutrição parentérica com glutamina faz aumentar os níveis plasmáticos de GSH em ratos e promove a libertação de GSH do intestino para a circulação [226].

Em modelos animais o grupo de Eric Roth [227] demonstrou que a suplementação com glutamina se associa ao aumento de glutatião nos órgãos linfóides secundários (baço e placas de Peyer) e ao aumento do número de linfócitos nas placas de Peyer, sendo estes directamente proporcionais ao conteúdo de glutatião

David Wilmore [225], estabeleceu uma correlação entre a glutamina e a preservação dos níveis de glutatião intra-celular após lesão hepática.

A incubação de células mononucleares com elevadas concentrações de glutamina aumentam as concentrações de GSH em linfócitos CD4 e CD8 [228].

Várias situações de stress acompanham-se de depleção das reservas de glutatião, a suplementação com glutamina atenua esta redução [229, 230].

c) Manutenção da integridade funcional das diversas células orgânicas – papel da glutamina na redução da apoptose

A apoptose pode ser induzida por uma série de agressores ambientais, físicos ou químicos, podendo ser iniciada:

1. por via intrínseca, estimulada por citocinas ($TNF\alpha$), associa-se a perturbações da funcionalidade das mitocôndrias, com aumento da formação de radicais livres e libertação de enzimas citotóxicas que destruirão as estruturas celulares.

2. por via extrínseca – directamente activada pela ligação a receptores de destruição celular mediados pelo Fas que inicia a cascata de activação de cinases (caspases, JNK e MAPK) [231].

Estudos in vitro realizados com células mielocíticas HL-60, mostraram que a redução de glutamina aumentava o número de apoptoses mediadas pelo Fas [232].

A diminuição de glutamina reduz o volume celular, promovendo um aumento da expressão CD95 indutora da apoptose celular.

Assim, a glutamina interfere directamente com a transdução do sinal celular mediado pela activação de receptores da apoptose Fas-dependentes.

Estudos recentes atribuem à HSP-70 um papel favorecedor na supressão do estímulo apoptótico [233].

Nas células privadas de glutamina, uma dupla acção induzida pela redução da expressão de HSP-70, aliada à diminuição das proteínas anti-oxidantes (GSH) poderá ser responsável pelo aumento da apoptose [234, 235].

d) Papel da glutamina na preservação da integridade da função imunitária

As células do sistema imune são das principais utilizadoras de glutamina.[236, 237]. Grande parte da glutamina que aí chega não vai ser consumida em energia, mas transformada em glutamato, lactato e aspartato e usada para a síntese de macromoléculas [125], conferindo-lhe um importante papel na proliferação linfocitária.

A actividade da glutaminase está aumentada nos órgãos e células linfóides (linfócitos, macrófagos e neutrófilos) em resposta aos estímulos mitogénicos. Isto é ilustrado pelo aumento de utilização de glutamina pelos macrófagos após activação pelo BCG *in vivo* ou pela estimulação LPS *in vitro* [238].

Wu e colaboradores [239] simularam *in vitro* um meio depletado de glutamina (0,01 mM), que iam enriquecendo gradualmente até atingir valores próximos das concentrações plasmáticas habituais (0,5 mM) verificando que níveis crescentes de glutamina se associaram ao aumento da proliferação linfocitária.

A glutamina tem um papel importante na diferenciação de células de defesa orgânica, aumentando a actividade fagocitária e a produção de superóxido pelos neutrófilos, numa forma dose dependente [240], garantindo um meio oxidativo ideal para a actividade das células de defesa que facilita a opsonização e a fagocitose bacteriana.

Esta dependência entre as células do sistema imune e a glutamina é evidenciada em diversos modelos *in vitro* – a glutamina é necessária para a proliferação linfocitária em resposta a um estímulo mitogénico [241-243] para a prevenção da apoptose, estimulando o crescimento celular e a produção de anticorpos pelos linfócitos [244], para a produção de citocinas pelos monócitos e macrófagos [245] e para manter a actividade fagocitária de macrófagos [246] e células NK .

A IL-2 que habitualmente se encontra diminuída nos doentes graves, é fundamental para a diferenciação das populações linfocitárias T [247]. Yaqoob e Calder confirmam que a expressão, produção e utilização de IL-2 pelas células linfocitárias em resposta à estimulação *in vitro* com a Concanavalina A é dependente da concentração de glutamina no meio [248].

A nutrição parentérica suplementada com glutamina, aumenta a sobrevivência de ratos após a indução de quadro séptico abdominal [249-251]. Morlion [252] demonstrava um aumento do número de linfócitos no pós-operatório de doentes suplementados com alanyl-glutamina.

Doentes com carcinoma esofágico, tratados com quimio e radioterapia, recuperam mais rapidamente o número e a funcionalidade dos seus linfócitos se o suporte nutricional for suplementado com glutamina (30 g/dia) durante 28 dias [253, 254].

Estes resultados demonstram um benefício da utilização de glutamina na manutenção do número e capacidade funcional das células de defesa imunológica em doentes imunocomprometidos ou infectados [150, 255-257].

A expressão HLA-DR à superfície dos monócitos é essencial para apresentação antigénica às células de defesa orgânica, sabe-se que em situações de stress fisiológico como por exemplo nos politraumatizados, doentes sépticos ou cirúrgicos graves, há uma redução dessa actividade proporcional à gravidade da agressão. A glutamina aumenta a expressão HLA-DR à superfície de monócitos em politraumatizados e doentes cirúrgicos [258] contribuindo para reduzir a morbidade infecciosa nestes doentes.

A glutamina estimula a proliferação e a diferenciação de linfócitos T [259].

Sabe-se que a concentração de glutamina influencia a expressão e activação de receptores de superfície de células T (CD25, CD45RO e CD71) assim como a produção de citocinas (IFN γ e TNF α) [260, 261].

É um importante substrato para os enterócitos, garantindo a manutenção da integridade funcional da barreira intestinal, traduzida não só pela preservação da estrutura física da membrana, impedindo a translocação bacteriana, mas mantendo igualmente a capacidade de defesa linfóide da parede do intestino, expressa pela manutenção da estrutura linfóide intestinal (linfócitos parede, linfócitos lâmina própria, linfócitos placas de Peyer e gânglios linfáticos intestinais) com capacidade de resposta funcional à agressão e síntese de IgA.

Esta capacidade de defesa induzida na parede do intestino estende-se a outras mucosas, nomeadamente à das vias respiratórias, contribuindo para reduzir a morbidade infecciosa [262-265].

2.2.4. METABOLISMO da GLUTAMINA em SITUAÇÕES de STRESS

A farmacocinética da glutamina foi avaliada numa população de doentes seleccionados sujeitos a cirurgia abdominal por colecistectomia electiva [266] e, no grupo provido com glutamina, havia uma manutenção da concentração intracelular de glutamina e um melhor equilíbrio no balanço azotado, comparativamente ao grupo sem glutamina.

Contudo nem sempre é possível estabilizar os níveis de glutamina muscular após uma agressão. Palmer [267] realizou estudos sobre o conteúdo muscular de glutamina, usando doentes críticos, aos quais foi administrada glutamina adjuvando a nutrição parentérica. Realizou biópsias musculares no início e cinco dias depois da administração de glutamina. Registou níveis baixos de glutamina muscular que não se modificaram com a suplementação desta.

Nas primeiras 24-48 h após a agressão assiste-se a uma redução da concentração sérica (25 a 30%) e muscular esquelética (45%) de glutamina. [84, 268]. Esta diminuição da concentração muscular é consequência do aumento da “exportação” das reservas de glutamina muscular [146].

Mais tarde, com a falência multiorgânica já instalada, há uma saída constante da glutamina a partir do músculo, mantendo-se baixos níveis séricos e musculares deste aminoácido [269, 270].

Grande parte deste efluxo de glutamina destina-se ao território esplâncnico, onde por acção da glutaminase é usada como substracto energético por células de elevado *turnover*, como as células intestinais e as do sistema imunitário [271, 272].

Nestas a glutamina actua como precursor de nucleótidos na produção de DNA e RNA necessários à multiplicação celular. Como alternativa pode, perdendo dois grupos amina, ser transformada em α -ceto glutarato sendo o seu esqueleto de carbono oxidado, no ciclo de Krebs, em radicais ATP fornecendo 30 mmol de ATP quando completamente oxidada [273].

Esta dualidade da glutamina fornecedora de substractos energéticos mas que se necessário, pode rapidamente maximizar a produção de nucleótidos é bem ilustrativa, do seu papel no metabolismo intermediário.

Mesmo após a simples agressão cirúrgica, em que as reservas de glutamina muscular se reduzem transitoriamente, o retorno aos valores normais faz-se lentamente, ao longo de 4-6 semanas, período durante o qual a cicatrização é máxima e em que a ingestão de nutrientes e a deambulação regressam lentamente aos valores normais.

Este período pode, no entanto, prolongar-se se a ingestão calórica for limitada ou se, entretanto, surgirem complicações.

Nestas situações de stress há um aumento da produção de glutamina muscular, mediada pelo aumento das hormonas da contra-regulação. Estudos de células musculares em cultura, incubadas com dexametasona, confirmam o aumento da velocidade de transcrição genética e da expressão mRNA para a glutamino-sintetase uma hora após a incubação. Diversos autores estudaram o efluxo de glutamina muscular em animais, tendo verificado, que este era 4 vezes maior em animais tratados com dexametasona [274-276]. Estudos similares em ratos [277] demonstraram que os glicocorticóides estimulavam a actividade de glutamino-sintetase muscular, por aumento do mRNA para esta enzima.

Mas, apesar de nestas situações de stress ou induzidas pelos corticóides se registarem um aumento acentuado da produção e libertação de glutamina muscular e pulmonar [278, 279] os níveis séricos desta pouco se modificam traduzindo um aumento da utilização da glutamina pelos diversos tecidos.

Estudos em cães cateterizados demonstraram que a utilização de glutamina pelo tracto gastro-intestinal duplica após uma cirurgia [280]. Este aumento da captura de glutamina a nível intestinal ocorre apesar das baixas concentrações séricas de glutamina e da redução do fluxo sanguíneo intestinal, sugerindo um processo de captação activo de glutamina, independente do aporte de substractos. Este efeito pós-operatório está relacionado com o stress cirúrgico e não com a redução da ingestão de nutrientes [281].

O aumento da captura da glutamina intestinal duplica com a administração de dexametasona [282]. Sarantos [283] refere que uma única dose de

dexametasona eleva os níveis de mRNA glutaminase na mucosa jejunal, de uma forma tempo-dependente.

Os corticóides aumentam também a actividade da mRNA glutaminase nos gânglios linfáticos mesentéricos [284], sublinhando o importante papel da glutamina na proliferação linfocitária em situações de stress.

Este aumento da utilização intestinal de glutamina conjuga-se com o aumento da libertação intestinal de alanina, que será utilizada na via da gluconeogénese hepática.

Quer o glucagon, quer a dexametasona, estimulam a captura de glutamina pelos hepatócitos. Para o glucagon, este efeito é conseguido por estímulo directo sobre o sistema de transporte N.

O glucagon é responsável pela redução em cerca de 25% da concentração sérica da glutamina, triplicando ao mesmo tempo a captura intestinal desta e a da concentração de amónia na veia porta.

Este perfil portal de redução da concentração de glutamina e elevação das concentrações de amónia, estimula a libertação hepática de glutamina em situações de acidose metabólica.

Também os rins aumentam a captura de glutamina em situações de stress metabólico ou sob o efeito da corticoterapia [282, 285].

O fluxo normal de glutamina inter-orgãos vê-se assim alterado em situações de stress, passando a ser mediado pela resposta orgânica à agressão, com aumento das hormonas da contra-regulação e pela libertação de citocinas, muitas vezes agravada por acção de endotoxinas.

A agressão infecciosa associa-se à libertação de múltiplas citocinas que regulam a resposta metabólica, através de uma rede complexa de interações entre citocinas e hormonas.

Grande parte do processo de aumento da captação de glutamina pelas células hepatocitárias não resulta de um efeito directo das citocinas, mas do efeito destas mediadas pelos glicocorticóides que estimulam o transporte através do sistema N sódio-dependente [286].

Procurou estabelecer-se *in vitro* qual o papel das citocinas e dos corticóides nos diversos sistemas de transporte da glutamina. Verificou-se que em culturas de células hepatocitárias, a IL-6 aumenta em 30% a actividade do sistema N, resposta esta que se amplia quando se junta dexametasona ao meio. Em ratos,

a administração de IL-6 aumenta 2 a 3 vezes a actividade do sistema N hepático, mas não tem efeitos sobre o sistema Y⁺ [287]. Os glucocorticóides por si só não induzem o sistema N, mas aumentam a actividade dos sistemas A e Y⁺. A dexametasona aumenta a resposta do sistema N à IL-6, mas sem efeitos sinérgicos sobre o sistema A.

De salientar que o efeito das citocinas é diferente entre órgãos, e é específico de certos tecidos. Isto está de acordo com o que sabemos acerca da agressão, em que o organismo responde a diversas pressões metabólicas, direccionando o fluxo de glutamina para determinados órgãos conseguindo-o através da capacidade de transporte presente a nível das membranas plasmáticas. Serão os hepatócitos, os linfócitos e as células endoteliais com elevado grau de diferenciação, os grandes beneficiados com o aumento da captação de glutamina em situações sépticas.

Anstgen, usando um modelo animal de sépsis (ratos a quem foi administrado 7,5 a 10 mg de endotoxina E.Coli), verificou (2 a 4 horas após administração de LPS), uma alteração marcada do metabolismo da glutamina inter-órgãos, com redução dos níveis circulantes de glutamina [288].

A endotoxina aumenta o efluxo de glutamina muscular e reduz o fluxo sanguíneo circulante. Numa tentativa para impedir a depleção da pool de glutamina muscular, há um aumento 3 a 6 vezes da expressão mRNA para a glutamino sintetase, com o conseqüente aumento da actividade desta enzima no músculo esquelético. Contudo, esta elevação da síntese de glutamina é incapaz de compensar o aumento das perdas musculares e a depleção das reservas deste aminoácido.

Quer as endotoxinas [289], quer as citocinas – TNF e IL-1 [290], aumentam os níveis séricos de glutamina-sintetase [291] e o transporte de glutamina no endotélio pulmonar.

Durante as situações sépticas, há um aumento da libertação de glutamina pelo pulmão. Aqui, ao contrário do músculo esquelético, esta libertação é limitada à fase inicial da agressão, mediada por citocinas e endotoxinas [292]. Com a evolução para ALI e ARDS fazendo parte integrante da falência multiorgânica aliada à sépsis, reduz-se a libertação de glutamina no tecido pulmonar.

A captura de glutamina circulante pelas células intestinais está diminuída em doentes sépticos [293, 294] [295] associando-se uma redução da produção de

IgA e o desenvolvimento de bacteriémias por Gram⁻. Não existe aqui uma relação causa/efeito, embora em alguns modelos animais de translocação bacteriana intestinal, a administração exógena de glutamina, melhore a função da barreira intestinal.

Em períodos de endotoxémia o transporte de glutamina ao longo da parede do intestino tem um comportamento bifásico, na fase inicial algumas horas após a agressão infecciosa, há um aumento do transporte da glutamina através dos canais sódio-dependentes [293] fazendo face ao aumento intestinal da síntese proteica, depois mais tarde regista-se uma redução do transporte de glutamina [296].

Estas alterações contrastam com o aumento da captura de glutamina pelas células intestinais após agressão cirúrgica ou em resposta à antibioterapia.

Contudo, nos gânglios linfáticos intestinais há um aumento da utilização de glutamina (10 vezes maior), fundamental para os linfócitos que se encontram em fase proliferativa [256, 297].

A agressão infecciosa modifica o metabolismo renal da glutamina. Os rins, órgãos discretos na captação de glutamina, transformam-se em exportadores de glutamina [298]. Esta modificação associa-se ao aumento de actividade da glutamina sintetase (50%) e a uma queda da excreção urinária da amónia. Com a deterioração funcional do rim, perde-se a capacidade deste intervir na homeostase ácido-básica.

Em suma, durante a agressão infecciosa, o aumento da velocidade de troca de glutamina inter-orgãos limita a manutenção de níveis plasmáticos de glutamina. Nestas circunstâncias, o fígado torna-se no principal órgão consumidor de glutamina [295], com um consumo 3 vezes superior ao do intestino. O aumento do fluxo sanguíneo hepático, o aumento do transporte transmembrana hepatocelular e o aumento do metabolismo intracelular, fazem com que a captura de glutamina pelos hepatócitos seja 10 vezes superior. Este aumento ocorre precocemente, nas primeiras horas de endotoxémia e insere-se na elevação da captura global de aminoácidos característicos da agressão em doentes críticos [299].

Como já referimos, o músculo esquelético constitui o principal produtor e exportador de glutamina, tendo por isso um papel central no seu metabolismo. Em doentes de cuidados intensivos, na fase inicial da agressão, os níveis de

glutamina livre muscular estão reduzidos a cerca de 1/4 do seu valor, [84, 300] porque foram mobilizados de forma a manter níveis séricos ajustados, mas este mecanismo de compensação à custa da degradação das reservas musculares está limitado no tempo [301] tornando necessária a suplementação exógena.

Na tentativa de perceber a relação entre a administração de glutamina exógena a doentes graves e a sua utilização no metabolismo muscular esquelético, o grupo de Wernerman verificou que a administração de níveis crescentes de glutamina (0,28, 0,57 e 0,86 g/Kg/dia) por via parentérica durante 5 dias fazia aumentar proporcionalmente os níveis séricos desta a partir das 24 horas, de uma forma dose-dependente, sem modificação do conteúdo de proteínas musculares [268]. Esta falta de ligação era aparente, pois os compartimentos (muscular e sérico) não eram totalmente independentes, existindo uma discreta correlação estatística no início e fim do estudo entre os níveis de concentração de glutamina livre, sérica e muscular. Numa análise “*post-hoc*” do estudo havia a evidência da redução em 30% da excreção de 3-metilhistidina na urina do grupo suplementado com glutamina, sugerindo uma diminuição da degradação de proteínas musculares.

Numa população de doentes sujeitos a cirurgia do cólon por neoplasia, a suplementação da nutrição parentérica com glutamina melhora o balanço azotado diário e o acumulado ao 5º dia do pós-operatório (- 7,1 vs - 18,1 g N) e, restaura os valores de glutamina intra-muscular para níveis próximos do pré-operatório comparativamente ao grupo controlo sem glutamina [302].

Os benefícios do aporte de glutamina por via entérica na correção das concentrações séricas deste aminoácido são marginais [303, 304] tendo em conta a avidez pela glutamina demonstrada pelos enterócitos, que a captam e utilizam em vez de a lançar em circulação.

Estes aportes exógenos embora normalizem as concentrações séricas, pouco modificaram a produção endógena e a exportação muscular, que permanecem elevadas com um balanço marcadamente negativo [269, 305] e baixos níveis de glutamina livre muscular.

Em suma, a magnitude da redução dos níveis séricos de glutamina dependerá da gravidade da agressão. Em cirurgia electiva, as concentrações séricas de glutamina pouco se alteram, mas as concentrações de glutamina livre musculares diminuem [86, 266].

Quando a agressão é grave (sepsis, trauma) a produção endógena de glutamina é incapaz de manter concentrações normais de glutamina livre plasmáticas ou musculares, e a suplementação exógena de doses elevadas normalizam as concentrações séricas mas sem impedirem a depleção muscular. Embora a normalização dos níveis musculares de glutamina seja lenta [306], a suspensão da suplementação exógena agrava-a de imediato [307] enfatizando a importância da sua suplementação mesmo para agressões *minor* limitadas no tempo. Sabemos que concentrações baixas de glutamina sérica se associam a maior taxa de mortalidade [99, 308]. Novak publica uma meta-análise na qual demonstra que a glutamina administrada por via parentérica a uma população de doentes de cuidados intensivos, se associa a uma menor taxa de morbidade e de mortalidade [309].

Na prática, sobretudo numa população de doentes críticos com aumento das necessidades metabólicas e um excesso de consumo de glutamina, pretendemos corrigir as baixas concentrações plasmáticas de forma a garantir que a glutamina esteja disponível nos tecidos que dela necessitam, factor determinante para o êxito na redução da morbi-mortalidade evidenciada nos ensaios clínicos com suplementação de glutamina [309-314].

Muitos destes doentes graves tem falências orgânicas instaladas, por isso é importante garantir que a glutamina exógena não as vai agravar. A infusão de 0,5 gr/kg de alanil glutamina numa população de doentes graves é segura, bem tolerada, sem efeitos secundários [94, 99], podendo ser usada em doentes com insuficiência renal sujeitos a técnicas dialíticas contínuas [315].

Sendo a glutamina um precursor do glutamato (neurotóxico) a infusão desta foi contestada em doentes neurocirúrgicos. Contudo, os estudos demonstraram que a infusão de glutamina (0,34 g/Kg/dia) em doentes com traumatismo crânio-encefálico não modificou as concentrações cerebrais de glutamato [316].

2.2.5. EFEITOS da DEPLEÇÃO de GLUTAMINA

2.2.5.1. Limitador da velocidade de síntese proteica

Diversos estudos demonstram que a diminuição da disponibilidade de aminoácidos se associa à diminuição da velocidade da síntese proteica. Este

controlo ocorre a nível da translação de mRNA em proteínas, que é regulada por uma dezena de cinases designadas por factores de iniciação de células eucarióticas. O estado de activação (fosforilação) destes factores determina a eficácia do desenrolamento do mRNA e a união deste com o complexo ribossómico que dá início à síntese proteica. Um dos principais factores de activação é o mTOR (*mamalian target of rapamycin*) com actividade fosforilativa aumentada na presença de aminoácidos e reduzida com a diminuição destes [317, 318].

O deficit de glutamina aumenta a inibição de diversos factores de transcrição TOR (Glutamina 3, RGT1, CRTG3) todos mediadores da sua síntese [319].

Este factor, associado ao aumento de hormonas de contra-regulação e potenciado pelos elevados níveis de citoquinas em circulação, contribui para que a população de doentes graves mantenha persistentemente balanços proteicos negativos durante o internamento em Medicina Intensiva.

Desta forma, num ciclo vicioso, a diminuição de glutamina contribui a nível molecular para a redução quer da sua própria síntese, quer da síntese de outras proteínas, eternizando um deficit que comprometerá a funcionalidade de diversos órgãos.

2.2.5.2. Efeitos sobre a manutenção da integridade celular

Serão os enterócitos e os leucócitos, células cujas reservas energéticas são dependentes da glutamina, aquelas que mais susceptíveis serão ao seu deficit em situações catabólicas.

Ambas têm um importante papel nos mecanismos de defesa contra os microrganismos, sendo por isso fundamentais na população de doentes críticos. Enquanto os enterócitos são essenciais para a integridade da mucosa intestinal, prevenindo a translocação de bactérias e endotoxinas do lúmen intestinal para a circulação, os leucócitos detectam e eliminam microrganismos invasores no decurso da resposta imunitária.

Nestas circunstâncias, a diminuição da disponibilidade da glutamina tem efeitos adversos no metabolismo energético, na síntese de proteínas, nos mecanismos celulares de protecção e na viabilidade e funcionalidade destas células glutamino-dependentes.

A depleção de glutamina interfere com diversos mecanismos moleculares necessários à integridade celular, através da redução de ATP intracelular. Nas células dos animais mamíferos, a falta de energia (aumento da relação AMP:ATP) activa a cascata AMP- *activated protein kinase* (AMPk) - [320], reguladora da actividade celular.

Estas cinases funcionam como interruptores que inibem as vias anabólicas e activam as catabólicas, com o objectivo de pouparem energia (ATP's).

A maior parte da evidência que relaciona a depleção de glutamina com a activação da via de AMPk provêm de resultados de investigação básica, como por exemplo o estudo da fisiologia dos fungos. Uma das formas que a glutamina tem para controlo da activação celular é através da via aminoacil-t-RNA sintetetase (cataliza a ligação de aminoácidos específicos com o tRNA, garantindo a transmissão fiel do código genético), reguladoras da síntese de RNA ribosómico, da apoptose, da inflamação e da angiogénese [321]. Várias espécies destas enzimas (aminoacil-t-RNA sintetetase) interagem directamente com uma série de proteínas reguladoras, como por exemplo a ligação directa ao domínio catalítico da ASK1 (*apoptotic signal-regulating kinase 1*) que fosforila a cinase N-terminal de c-Jun [321]. A glutaminil- tRNA sintetase reconhece directamente a glutamina, permitindo que esta possa exercer um papel regulador sobre a actividade da ASK1. Esta capacidade da glutamina interagir com diversas vias de sinalização celular, suporta o papel polimórfico que lhe é atribuído no controlo do metabolismo e sobrevivência celular, pois a sua depleção influencia o metabolismo do glutatião, diminui a semi-vida do mRNA das HSP70 e reduz o volume celular e o conteúdo intracelular de ATP.

2.2.5.3. Efeitos sobre os sistemas de defesa orgânica

A concentração sérica de glutamina está reduzida em diversas situações de stress [84, 241, 322, 323], grandes queimados, doentes sépticos ou cirúrgicos complicados, que partilham em comum uma depleção das células de defesa orgânica e um aumento da susceptibilidade às infecções, sugerindo que o deficit de glutamina poderia ser responsável por este aumento [324].

Perante este quadro de depleção orgânica e funcional da população linfocitária, a glutamina exógena fornece-lhes os substractos necessários para a produção de energia e de nucleótidos essenciais à multiplicação destas

células [243, 325], bem como de precursores para a síntese de glutatião, impedindo a apoptose e garantindo a manutenção do número de linfócitos indispensáveis para fazer face às agressões. Diferencia a população linfocitária preferencialmente em Th1 produtoras de IL-2 e IFN- γ [326] que ajudam a manter a funcionalidade dos linfócitos efectores da imunidade celular [228].

Engel [327] numa população de doentes cirúrgicos (cirurgia cardíaca electiva), verifica que a redução de IL-2 é menor no grupo suplementado com glutamina. A deplecção de glutamina pára a proliferação de linfócitos na fase G0/G1 e a actividade celular de “*linfoquinas activated killer*”. Esta paragem no crescimento pode ser revertida com a adição de glutamina promotora da activação de cAMP e das cininas JNK e MAPK [328].

Estudos *in vitro* mostram a dependência de glutamina para a proliferação de linfócitos activados por mRNA ou por outros estímulos mitogénicos [329].

Samantha Kew [330] demonstrava que os linfócitos de animais suplementados com glutamina quando estimulados *in vitro*, aumentavam a sua proliferação, traduzida por maior incorporação de tiamina marcada, melhoravam o grau de diferenciação com aumento da expressão CD25 à superfície de linfócitos TCD4+ e TCD8+, e aumentavam a produção de IL-2 e IFN- γ , importantes citoquinas activadoras de células Th1, NK, monócitos e macrófagos.

Diversas publicações realçam o efeito imunoestimulador alcançado com a suplementação de glutamina após uma agressão [242, 243] traduzido no aumento do número e da diferenciação de linfócitos circulantes [259].

Num dos primeiros estudos realizados no homem pesquisando os benefícios dos suplementos de glutamina por via parentérica sobre o sistema imune, foi possível observar o aumento significativo de linfócitos T [331].

Numa população de doentes cirúrgicos (peritonite secundária) a glutamina (0,4 g/Kg/dia) administrada por via parentérica durante 10 dias aumenta o número de linfócitos totais TCD4 e TCD8 condicionando uma redução do número de novas infecções com diferença estatisticamente significativa [312].

À semelhança do que se passava para os linfócitos e monócitos também os neutrófilos de doentes sujeitos a agressões, sobretudo infecciosas, mostravam uma diminuição do número e capacidade funcional, traduzida na redução da produção de citoquinas pró-inflamatórias e de radicais livres, impedindo-os de

criarem um ambiente favorecedor à opsonização, fagocitose e destruição de agentes agressores.

A glutamina aumenta a capacidade de opsonização e fagocitose de neutrófilos incubados *in vitro* com E. Coli [332] e aumenta a expressão HSP 70, garantia de proteção das células fagocitárias contra a destruição por apoptose [188].

Os monócitos que expressam HLA-DR têm um papel relevante na apresentação de antígenos às células efectoras da imunidade celular. Diversas situações patológicas (trauma/sépsis) cursam com redução dos seus níveis séricos e com o aumento do número de infecções.

Reduções dos níveis de glutamina associam-se a diminuição da expressão HLA-DR, comprometendo a apresentação de antígenos às células T [260]. A administração de glutamina com normalização dos seus níveis circulantes registou uma recuperação da expressão HLA-DR [333] e da produção de TNF α [235, 334].

A depleção de glutamina compromete a actividade fagocitária de células monocíticas, reduzindo a expressão de moléculas de adesão intercelular ICAM-1/CD54, diminuindo a resposta Fc para IgG/CD64 e para a fração 3 do complemento (CD11b/CD18). [335].

2.2.6. IMPORTÂNCIA da GLUTAMINA na PRESERVAÇÃO da CAPACIDADE FUNCIONAL da PAREDE INTESTINAL

A relação entre o intestino e a glutamina merece aqui destaque pelo facto daquele possuir a maior extensão de tecido linfóide do corpo humano, à qual se associa a dependência de glutamina para a manutenção da funcionalidade das suas células.

Nas últimas décadas sedimentou-se a ideia do intestino como fonte potencial de microrganismos patogénicos, contra os quais dispõe de inúmeros mecanismos de defesa – as defesas mecânicas, os mecanismos de normalização da microflora, as defesas imunológicas e o eixo intestino-fígado.

Como não é possível estudar ao mesmo tempo todos estes mecanismos, a generalidade dos estudos iniciais centrou-se na avaliação de parâmetros

bioquímicos ou morfológicos da mucosa e na determinação da permeabilidade intestinal.

O objectivo era claro, procurava relacionar as alterações da permeabilidade intestinal por deficit de glutamina com a translocação bacteriana e o aumento do número de infecções naquele grupo de doentes.

Mas, se para alguns modelos animais (pequenos roedores) essa assunção é verdadeira por estar sempre presente, para outros entre os quais o homem se inclui a relação entre integridade estrutural da mucosa e a translocação bacteriana microbiologicamente confirmada mas difícil de objectivar, é pouco evidente [271, 336-338].

Desde a década de 90 que se sabe que para manter a funcionalidade das células intestinais são necessários níveis séricos de glutamina superiores a 0,5 mmol/L. O grupo de Wilmore [339] foi dos primeiros investigadores a comprovar os efeitos tróficos da glutamina a nível das mucosas, com aumento da mitogénese das criptas.

Experiências in vitro demonstram que se enriquecermos o meio com glutamina (> 2 mM) aumentamos significativamente a incorporação de ³H-timidina no DNA, que se traduz numa resposta proliferativa das células intestinais [328]. Este aumento estava associado com a activação de cinases sinalizadoras celulares ERK 1 (*Extracellular Signal Regulated Kinase*), ERK 2 e MAPK (*Mitogen Activated Protein Kinases*), com a fosforilação de factores de transcrição nuclear Elk-1, c-Jun e com a elevação de proteínas activadoras do gene de transcrição (AP-1) - [340, 341]. Assim, a glutamina é fundamental para os enterócitos, capaz de dupla actividade de sinalização e amplificação dos efeitos dos factores de crescimento que regulam a proliferação e a reparação intestinal [342].

Thomas Ziegler [343] publicou um estudo realizado em ratinhos com síndrome do intestino curto por ressecção de 80% da massa intestinal, randomizados num grupo com glutamina vs outro sem glutamina, verificando que no grupo suplementado entéricamente com glutamina houve um aumento de 40% dos níveis de DNA da mucosa intestinal, tradutor da acção desta na promoção do crescimento vilositário.

A administração de glutamina por via entérica estimula a proliferação e a síntese de proteínas da mucosa intestinal, protegendo-a da apoptose, fazendo

com que a maior parte da glutamina fornecida por via digestiva não chegue à veia porta [344], ficando retida no intestino onde as células a usam para crescimento e metabolismo.

A glutamina administrada em doses fisiológicas, reduz a apoptose das células intestinais [345]. O mecanismo de protecção exercido pela glutamina contra a apoptose induzida por citocinas é distinto da protecção contra o *stress* oxidativo mediada pelo glutatião. Há evidência de que este mecanismo anti-apoptótico citoprotector resulta igualmente da activação de vias de sinalização celular (ERK).

A glutamina estimula a expressão de HSP nas células intestinais. Doses fisiológicas de glutamina (1-5 mM) impedem a morte celular por *stress* oxidativo através da indução de HSP 70 sendo este fenómeno objectivado *in vitro* e em experimentação animal [137, 346, 347].

A protecção da glutamina é exercida também pela indução de um factor de protecção, a heme-oxigase 1 (HO-1) principal regulador da resposta à hipóxia [348]. A terapêutica com glutamina activa o mRNA para a HO-1 com a produção desta proteína pelas células epiteliais do cólon e células da lâmina própria do íleum e colon [349]. Quando administrada antes da inoculação por LPS (lipopolisacárido da parede de bactérias Gram negativas), reduz a agressão à mucosa, a inflamação e a destruição apoptótica de células do cólon e íleum.

Estudos *in vitro* e em modelos animais demonstram que a glutamina é necessária para manter a estabilidade das “*tigh junctions*”. [350].

Grande parte da investigação inicial que aqui resumimos sobre os efeitos da glutamina no intestino, foi realizada *in vitro* ou em experimentação animal com pequenos roedores sujeitos a agressões. Nestes, demonstrou-se um benefício inequívoco na manutenção estrutural e funcional da parede intestinal [351-355] com diminuição da translocação bacteriana [356] e melhoria do balanço azotado. As semelhanças entre estes modelos e o homem são relativas, podendo este ser um dos motivos pelos quais não existem resultados significativos que suportem inequivocamente os benefícios da glutamina no intestino do homem.

Sabemos hoje que, no homem, a atrofia vilositária resultante da incapacidade de utilização do tubo digestivo é pouco acentuada [357] e que a

suplementação parentérica com glutamina não conseguiu grande benefício na recuperação do tamanho ou do número de vilosidades [358].

Em doentes críticos, a alanyl-glutamina por via parentérica, mantém a funcionalidade da parede do intestino, avaliado pelo teste de absorção da D-xylose, comparativamente a um grupo sem glutamina [359].

Scheppach [360] confirma estes benefícios da glutamina sobre as células da mucosa intestinal, realizando biopsias do ileum, cólon proximal e rectosigmóide de indivíduos normais e incubando estas células com glutamina, alanyl-glutamina e solução salina. A glutamina e a alanyl-glutamina estimulam a proliferação de células crípticas e exercem um efeito trófico sobre a parede basal das criptas.

No homem, a glutamina exerce um efeito anti-inflamatório com redução da produção IL6, IL-8 e aumento de IL-10 da parede intestinal [361, 362]. Esta modulação inflamatória poderá contribuir para a melhoria da permeabilidade com redução da morbidade de doentes traumáticos em falência multiorgânica [363]. Esta relação entre trauma/glutamina e processo inflamatório é bem patente nos trabalhos experimentais de Chen, que verificou que a administração de glutamina reduzia a lesão intestinal (avaliada histologicamente) e a produção de citocinas intestinais, provavelmente por diminuição da expressão intestinal do NF-kB [364].

É por isso simplista reduzir os benefícios da glutamina à simples manutenção estrutural da barreira intestinal e ao fenómeno da translocação bacteriana, esquecendo o importante papel do intestino como órgão de defesa imunológica, importante barreira funcional contra a agressão.

Colocadas estas reservas iniciais, passaremos a analisar os resultados publicados na literatura que correlacionam a glutamina com os diversos mecanismos de defesa do intestino.

O tecido linfóide intestinal (correspondendo a 70-80% do tecido linfóide no homem), é uma extensa linha de defesa continuamente exposta ao contacto com antígenos presentes no lúmen intestinal. Funcionalmente fornece proteção imunológica contra agentes patogénicos intestinais e extraintestinais, pois a sensibilização antigénica dos linfócitos naife presentes nas placas de Peyer, estende-se às mucosas da naso-faringe, pulmão, glândulas salivares, mama e órgãos reprodutores. Estruturalmente é constituído por numerosas

moléculas e células imunes, distribuídas ao longo da lâmina própria e superfície epitelial da mucosa, envolvendo o tecido linfóide intestinal (placas de Peyer, gânglios linfáticos mesentéricos e apêndice).

A IgA é o agente estratégico fundamental deste sistema imune, exercendo função de reconhecimento e controlo da inflamação ou unindo-se a agentes patogénicos, impede a invasão e subsequente infecção [365, 366]. Além disso, previne a activação do complemento, a resposta inflamatória a outros agentes não patogénicos e controla bactérias comensais [367, 368].

Em situações de stress a produção de IgA [369, 370] é favorecida pela presença de citocinas pró-inflamatórias [371], $TNF\alpha$ e $IL1\beta$ que estimulam *in vitro* a pIgR (*polymeric Ig receptor* – proteína de transporte de IgA), enquanto a IL6 estimula a diferenciação de linfócitos B em células plasmáticas secretoras de IgA. Esta resposta é limitada no tempo, passando a estimulação do tecido linfóide intestinal a ser condicionada pela administração de nutrientes por via oral ou entérica.

A impossibilidade de utilizarmos o tubo digestivo, leva-nos muitas vezes a recorrer à nutrição parentérica total. Esta, compromete a capacidade de defesa intestinal através da redução do número de linfócitos nas placas de Peyer, com diminuição de células B e T [372, 373], assim como do número de linfócitos T (sobretudo TCD4) na lâmina própria da parede intestinal. Há igualmente uma redução na produção de IgA pulmonar e intestinal, por diminuição da produção de citocinas pelos linfócitos Th2, por redução pIgR e pelo aumento da resposta inflamatória à agressão com elevação de citocinas produzidas pelos Th1.

Reconhecidamente, a nutrição parentérica interfere com a resposta imune, animais imunizados com êxito contra o vírus influenza, quando sujeitos a nutrição parentérica total e estimulados com uma segunda dose, perdem a capacidade de eliminarem os vírus do tracto respiratório superior. Porém, a memória imunológica mantêm-se presente, já que três dias depois do início da nutrição entérica, normaliza-se a resposta imunitária respiratória [374, 375]. Este estudo traduz bem a interdependência existente entre as diversas mucosas orgânicas, pois embora distantes fisicamente, permanecem ligadas através dos linfócitos activados que viajam continuamente entre elas [375].

Assim, apesar da nutrição parentérica *per si* não ser pró-inflamatória, ao fragilizar a capacidade de defesa da mucosa intestinal predispõe ao aumento da resposta inflamatória à agressão, deixando as mucosas à mercê de novas agressões, favorecedoras de infecções secundárias nomeadamente pneumonias em doentes críticos [376].

Diversos ensaios clínicos demonstraram o aumento do número de pneumonias em doentes nutridos por via parentérica [377]. É lícito especular que o ponto sensível desta equação é a redução do número de linfócitos presentes nos territórios linfóides intestinais sensibilizados pelo contacto com agentes patogénicos, aliado á redução da produção de IgA protectoras.

Estamos muito longe no homem de estabelecer uma forte relação de evidência entre via de administração de nutrientes e parâmetros de imunidade da mucosa [378].

No Homem, alguns estudos ilustram a importância das IgA na resposta imune, cito o estudo de Anane que demonstra que a redução de IgA se associa à menor resistência à infecção, traduzida pelo aumento do número de pneumonias [379, 380].

Estudos em recém-nascidos mostram que o estímulo intestinal é fundamental para povoar o tracto gastro-intestinal (GALT e camada epitelial) com células produtoras de imunoglobulinas [381-383], permanecendo a dúvida se estas conclusões são aplicáveis no adulto.

Em doentes com carcinomas do cólon, nutridos pré-operatóriamente por via parentérica verificou-se uma diminuição do número de linfócitos nas placas de Peyer e na lâmina própria, comparativamente a outro grupo nutrido por via oral [384].

Biópsias comparando o ramo proximal (exposto a nutrientes), com o ramo distal (não exposto) do intestino de doentes ostomizados mostraram que o tecido linfóide intestinal tinha maior celularidade no ramo proximal, comparativamente ao distal sem contacto com nutrientes [385].

Buchman [338], pelo contrário, não encontrou diferenças na celularidade GALT em biópsias jejunais de indivíduos saudáveis nutridos parentéricamente durante 14 dias, concluindo que no homem, a via de administração não afectava a função imune intestinal mas, o número de biópsias foi pequeno, por isso pouco representativo da massa e funcionalidade GALT intestinal.

A depressão imunitária com diminuição da resposta de defesa intestinal em doentes que por impossibilidade de utilizarem o tubo digestivo estão a ser nutridos por via parentérica, pode ser parcialmente revertida suplementando com glutamina a nutrição parentérica total.

A glutamina por via parentérica, aumenta a secreção de IgA por estimulação sobre os linfócitos Th2 e aumento da produção de pIgR. Restaura ainda os níveis de linfócitos T naife CD4 e CD8 no GALT [264].

Esta acção da glutamina é resultante da manutenção do fenótipo dos linfócitos intraepiteliais da parede do intestino, que impedem o aumento da expressão $IFN\gamma$, mantendo a expressão da IL-10 necessária à produção de IgA [386].

Estes benefícios reduzem as infecções respiratórias por Gram negativos, como patente no trabalho de DeWitt e al. realizado em ratos imunizados para pseudomonas 10 dias antes de uma agressão cirúrgica, posteriormente randomizados para grupos nutridos por via entérica, parentérica e parentérica com glutamina e inoculados com pseudomonas intratraqueais. Verificaram que a NP com GLN mantêm a imunidade e melhora a sobrevida (semelhante ao grupo nutrido por via entérica) comparativamente à NP sem glutamina cuja taxa de mortalidade às 24 e 48 horas se aproxima do grupo não imunizado [387].

Um outro estudo realizado numa população de doentes críticos, concluiu que a nutrição parentérica total com glutamina melhora a funcionalidade dos linfócitos intestinais (relação CD4/CD8 mais elevada), comparativamente a uma população sem glutamina [388].

Apesar da evidência ser limitada, é lícito ponderar que, por impossibilidade funcional de usar o tubo digestivo, quando prescrevemos nutrição parentérica total em doentes críticos, a devemos suplementar com glutamina, garantindo a integridade imunológica da mucosa intestinal que se repercutirá na capacidade de defesa de outras mucosas orgânicas, nomeadamente na mucosa respiratória.

2.2.7. NUTRIÇÃO PARENTÉRICA com GLUTAMINA em DOENTES CRÍTICOS - resultado dos ensaios clínicos

Thomas Ziegler publicava em 1992 [389] o primeiro relato sobre o uso de glutamina (0,57 g/Kg/dia) suplementando o suporte nutricional parentérico numa população de doentes transplantados medulares. Os resultados mostravam um melhor balanço azotado e uma redução na relação S-metilhistidina/creatinina urinária quando comparada com um grupo controlo sem glutamina. A melhoria da morbidade infecciosa pós-transplante medular, com redução da incidência infecciosa, redução da colonização microbiológica e redução do tempo de internamento, favorecia o grupo suplementado com glutamina comparativamente ao grupo controlo.

Schloerb [390] usando um protocolo semelhante em doentes com neoplasia hematológica e tumores sólidos sujeitos a transplante medular autólogo, verificava que não havia diferença na morbidade infecciosa (incidência de culturas positivas e número de infecções) nem na mortalidade quando comparava o grupo enriquecido com glutamina com o grupo controlo. Havia contudo uma redução no tempo de internamento no grupo com glutamina.

Griffith [391] publicou um estudo realizado numa população de doentes críticos, demonstrando que a suplementação de glutamina por via parentérica se associava a uma redução significativa da mortalidade aos seis meses (apesar da mortalidade precoce na UCI ser similar entre os dois grupos e, o número de mortes em doentes que permaneceram mais tempo na UCI, ser maior em doentes que receberam nutrição parentérica sem glutamina).

Anos mais tarde numa análise *post-hoc* a este estudo, Griffiths [392] confirma que o grupo provido com glutamina por período superior a 5 dias tinha uma menor percentagem de novos episódios infecciosos (38 vs 74%), particularmente por *Candidas* e, apresentava uma maior sobrevida aos 6 meses.

Numa população mais heterogénea de doentes críticos, capazes de tolerar nutrição entérica, muitos deles já infectados no momento da admissão não houve redução da mortalidade no grupo de doentes suplementados com

glutamina [393]. Mas, os custos do internamento eram menores nos grupos suplementados com glutamina por via entérica ou parentérica.

Powell-Tuck [394] num estudo realizado numa população de doentes graves (168 doentes) divididos em dois grupos, sujeitos a nutrição parentérica com glutamina (20 gr/dia) e sem glutamina, durante oito dias, verificou não haver diferenças na morbidade infecciosa ou no tempo de internamento. Havia uma redução da mortalidade que favorecia o grupo com glutamina (16,9%) comparativamente ao grupo controlo (24%), não tendo esta diferença um significado estatístico importante. Na análise de sub-grupos, verificou que no grupo de doentes cirúrgicos havia uma redução no tempo de internamento hospitalar.

Paul Wischmeyer [395] numa população de grandes queimados internados em MI (Medicina Intensiva), randomizados num grupo com glutamina e outro sem glutamina, verificou uma tendência para a redução do número de infeções (58,3 vs 64,3%) e uma redução significativa da mortalidade (13 vs 31%) na população suprida com glutamina.

Fuentes-Orozco [312] numa população de doentes graves com peritonite secundária a pancreatite aguda, verificou que o grupo nutrido com glutamina tinha uma diferença significativa na redução da morbidade infecciosa e uma tendência para a redução da mortalidade quando comparado com um grupo controlo. Anos mais tarde [313] o mesmo grupo, com uma amostra mais alargada de doentes confirma as mesmas conclusões.

Zhou [396] numa população de doentes queimados, verifica existir uma tendência para a redução das infeções (20 vs 26%) com a suplementação do suporte nutricional parentérico com glutamina.

Xian-Li [397] estudou uma população de doentes com pancreatite aguda grave, demonstrando que o uso de glutamina por via parentérica contribui para uma redução significativa da mortalidade.

Pierre Dechelotte [311] coordenou um estudo multicêntrico, realizado em doentes do foro cirúrgico e traumático, internados em SMI, randomizados num grupo com e sem glutamina por via parentérica, demonstrando uma redução significativa da morbidade infecciosa (40 vs 58%), sobretudo de pneumonias nosocomiais (17 vs 34%), não evidenciando modificação da mortalidade quer precoce, quer tardia.

Sahin [398] verificou que em doentes com pancreatite aguda, a suplementação de nutrição parentérica com glutamina, reduzia significativamente a mortalidade (10 vs 30%).

Duska [399] verificou que a suplementação com glutamina fazia aumentar a mortalidade de doentes politraumatizados.

Estivariz [400] verificou que a glutamina por via parentérica reduzia significativamente quer o numero de pneumonias, (43 vs 55%), quer a mortalidade (3 vs 19%) numa população de doentes com pancreatite.

Perez-Barcena numa população heterogénea em doentes de MI, verificou que a glutamina não modificou a mortalidade, mas mostrou uma tendência para reduzir a morbidade infecciosa (73 vs 87%).

Teodoro Grau [401] realizou um estudo multicêntrico em doentes predominantemente cirúrgicos de MI, verificando que a glutamina por via parentérica reduzia significativamente o número de infecções nosocomiais, sem modificar a sobrevida quer precoce quer tardia.

Andrews [402] publicou os resultados do estudo SIGNET, multicêntrico realizado numa população de doentes críticos (randomizou cerca de 500 doentes, dos quais incluiu 125 no grupo glutamina e 125 no grupo controlo). Tratou-se de um estudo complexo, destinado a avaliar os benefícios da glutamina e do selénio, que suplementavam o habitual suporte nutricional por via parentérica. Não houve benefícios com o uso de glutamina quer no desenvolvimento de novos episódios infecciosos: 1,07 (0,75 -1,53) quer na redução da mortalidade aos 6 meses: 1,18 (0,82-1,50).

A maior parte destes estudos, particularmente os realizados a partir de 2004, utilizaram quantidades de glutamina superiores a 0,30 g/Kg/dia e, sempre que possível por período maior ou igual a 9 dias de tratamento.

Goeters [403] demonstrou que se usarmos estas regras, era possível aumentar a concentração sérica de glutamina entre o 6º e o 9º dia de terapêutica, melhorando com isto a sobrevida aos 6 meses de 66,7% (glutamina) vs 40% (controlo).

O último estudo publicado (SIGNET) não cumpriu nenhuma destas regras, não teve em conta o peso dos doentes, usando sempre a mesma quantidade de glutamina (20 g/dia) para todos eles, o que levou a que muitos fizessem doses sub-terapêuticas. Por outro lado cerca de metade dos doentes fez terapêutica

nutricional menos de 5 dias, manifestamente pouco tempo, sobretudo quando sabemos serem necessários 9 dias de terapêutica para que o efeito da glutamina pudesse influenciar a sobrevida. Por tais motivos, podemos afirmar que o estudo SIGNET não fez verdadeira terapêutica com glutamina e, por isso não poderia mostrar os resultados do seu benefício.

Diversas meta-análises confirmam [309, 404-406] uma redução significativa da morbidade infecciosa 0,76 (0,62-0,93) e da mortalidade 0,71 (0,55-0,92) quando utilizamos glutamina para suplementar o suporte nutricional parentérico numa população de doentes críticos (www.criticalcarenutrition.com).

Esta evidência faz com que as Sociedades Científicas internacionais - ASPEN (American Society of Parenteral and Enteral Nutrition) [407] e ESPEN (European Society of Parenteral and Enteral Nutrition) [408] atribuam um elevado grau de recomendação à suplementação da nutrição parentérica com glutamina numa população de doentes críticos.

3. CONTRIBUIÇÃO PESSOAL

3.1. FUNDAMENTAÇÃO do ESTUDO

A incidência da infecção nosocomial em doentes de cuidados intensivos é elevada, apesar da prática de medidas para a sua prevenção. O estudo EPIC [409, 410], que avaliou a prevalência da infecção nas Unidades de Cuidados Intensivos (UCI) Europeias, demonstrou que mais de 45% dos doentes internados na UCI estão infectados, sobretudo com infecções respiratórias. Mais de metade destas infecções são nosocomiais, contraídas durante o internamento na UCI.

O aumento destas infecções é facilitado pela desregulação transitória da capacidade de defesa imunitária que se segue a uma agressão grave [411], e que se manifesta por uma disfunção linfocitária, com desactivação de monócitos/macrófagos e aumento de citocinas anti-inflamatórias (IL-10) [412, 413].

Esta resposta CARS tem por objectivo conter a resposta inflamatória iniciada pela SIRS (mediada pelas células linfocitárias da imunidade celular) que se não for limitada conduzirá a falência multiorgânica e ao compromisso do prognóstico vital destes doentes. A imunodepressão aumenta a possibilidade de infecções nosocomiais, que comprometem o prognóstico da agressão inicial. Os dados publicados na literatura demonstram a existência de uma estreita relação entre o número e a gravidade destas infecções e a taxa de mortalidade dos doentes [414, 415].

A malnutrição, entendida tanto no sentido da obesidade quanto da desnutrição, previamente existente ou adquirida durante o internamento hospitalar, contribui para aumentar a morbidade infecciosa e condicionar o prognóstico de doentes graves.

David Cuthberston foi o primeiro a descrever a relação entre a perda de peso por depleção de massa magra muscular, e o catabolismo associado à agressão, atribuindo-lhe um significado prognóstico [416-418].

Apesar dos enormes avanços que a ciência médica teve desde então, continuamos, hoje em dia, a debater-nos com o problema de compensar o

catabolismo e equilibrar o balanço azotado [419] durante o internamento de doentes graves em Serviços de Medicina Intensiva (SMI).

Para impedir a redução de massa magra muscular, verdadeira reserva funcional face à agressão, é imperioso o início do suporte nutricional logo que haja estabilidade hidro-electrolítica e hemodinâmica, o que geralmente acontece nos primeiros dias de internamento em Medicina Intensiva.

Hoje em dia, o suporte nutricional é muito mais do que a simples administração de calorias e macromoléculas, necessárias à manutenção das células e à plastia dos tecidos. Percebemos que reforçando o teor de determinados aminoácidos ou modificando a relação de lípidos da nossa dieta, podemos modular a inflamação, a resposta imune e hemodinâmica, e assim, modificar o prognóstico de doentes graves.

Estudos recentes demonstram que a utilização de glutamina por via parentérica diminui a incidência de infecções pulmonares agudas e de bacteriémias por Gram negativos [311, 313, 314, 420]. Tais benefícios são mediados pela modulação da resposta inflamatória e imunológica exercida pela glutamina.

Reconhecemos que doentes graves internados em Medicina Intensiva têm uma redução da concentração sérica de glutamina [421].

Serão as células que têm um ciclo cinético mais acelerado, como as da parede intestinal, os fibroblastos e as do sistema imunológico, aquelas que mais sofrem com a falta deste aminoácido.

Diversos estudos confirmam a relação entre o *deficit* de glutamina habitualmente existente nestes doentes, e a diminuição do número de linfócitos T CD4 e CD8, de monócitos e da sua expressão HLADR.

A limitação da activação da imunidade celular agrava o estado de anergia associado ao CARS, com potencial aumento de infecções nosocomiais, determinantes para o prognóstico destes doentes.

A administração de glutamina por via parentérica associa-se ao aumento substancial de linfócitos totais, linfócitos T, sub-populações CD4 e recuperação de CD8 após transplante alogénico de medula óssea [243, 259]. Tem, além disso, um papel fundamental na melhoria da resposta imunitária celular face à agressão, traduzida pelo aumento dos linfócitos Th₁, [422], contribuindo simultaneamente para a manutenção da integridade funcional e estrutural da parede intestinal [326, 330].

No entanto, não é apenas pelo aumento do número e da diferenciação das células efectoras da resposta imune, que a glutamina exerce a sua acção. Também a nível molecular foi possível observar em estudos experimentais que, a suplementação com glutamina, contribuiu para a preservação dos níveis de glutatião hepático, [209, 214, 229, 260], aumentando a concentração celular deste anti-oxidante. Além disso, garante a protecção celular através da manutenção de *heat shock proteins* (HSP), cuja síntese é aumentada pela glutamina [137, 175, 192, 202, 423-426], e reduz a apoptose.

Meta-análises dos estudos até agora publicados com glutamina por via parentérica em doentes graves, mostram uma tendência para a redução das infecções e da mortalidade [309, 427]. Têm, contudo, um número reduzido de doentes e nem sempre conseguem estabelecer uma relação entre os benefícios alcançados e a estimulação do sistema imunológico.

Estes motivos fazem com que algumas questões permaneçam em aberto, sendo necessário a realização de mais estudos para os esclarecer.

3.2. OBJECTIVOS

O principal objectivo deste estudo foi determinar a relação entre a utilização de nutrição parentérica suplementada com glutamina durante pelo menos 10 dias, e a infecção nosocomial no Serviço de Medicina Intensiva (SMI) dos HUC.

Como objectivos secundários, pretendemos analisar os efeitos da glutamina sobre:

- a) o sistema imunitário, através do estudo de diversas populações e sub-populações linfocitárias, correlacionando esse efeito com o desenvolvimento de novas infecções.
- b) o número de falências multi-orgânicas existentes ou desenvolvidas durante o internamento, através do *Sequential Organ Failure Assessment* (SOFA).
- c) o tempo de internamento, quer no SMI quer nos Hospitais da Universidade de Coimbra (HUC).
- d) a taxa de mortalidade no SMI, no Hospital e aos 6 meses após o início da intervenção.

3.3. MATERIAL e MÉTODOS

3.3.1. Tipo de estudo

Trata-se de um estudo prospectivo, randomizado e duplamente cego.

Foi efectuado no Serviço de Medicina Intensiva dos Hospitais da Universidade de Coimbra (SMI-HUC), que é um Serviço de 20 camas que recebe doentes em falência orgânica potencialmente reversível.

3.3.2. Critérios de inclusão e de exclusão

Incluímos no estudo os doentes internados no Serviço de Medicina Intensiva dos HUC no período de 2003-2009, que após a estabilização hidro-electrolítica e hemodinâmica inicial tinham incapacidade funcional de utilizarem o tubo digestivo para a administração de nutrientes, prevendo-se que esta duraria pelo menos 5 a 8 dias, necessitando assim de serem nutridos por via parentérica.

Foram excluídos deste estudo as grávidas, os menores de 18 anos, doentes neoplásicos, infectados por HIV, esplenectomizados e aqueles que se encontravam a fazer terapêutica imunossupressora ou que toleravam nutrição entérica nas primeiras 48 horas de internamento no SMI.

3.3.3. Desenho do estudo

Randomizámos prospectivamente doentes internados em Medicina Intensiva que necessitavam de suporte nutricional por via parentérica.

No momento da admissão, para cada um dos doentes incluídos no estudo registámos diversos parâmetros gerais, antropométricos e clínicos, tais como a idade, o sexo, o diagnóstico de entrada, as co-morbilidades associadas, o peso, a altura, o perímetro braquial, os resultados dos exames bacteriológicos realizados, o número de leucócitos, e o resultado da radiografia do tórax.

Às 24 horas foram registados os valores dos índices de gravidade – *Acute Physiology and Chronic Health Avaliation* (APACHE II) e o *Simplified Acute Physiology” Score* (SAPS II e SAPS III). Durante o internamento foi feito o registo do “*Sequential Organ Failure Assessment* “(SOFA).

A nutrição parentérica era individualizada e prescrita diariamente, tendo em conta não só o peso do doente mas também outros aportes calóricos (lipídicos

ou glicémicos) realizados nas últimas 24 horas. O preenchimento das bolsas era realizado na câmara de fluxo laminar da farmácia do hospital, prática que vimos executando há mais de dez anos.

O cálculo do aporte calórico administrado foi feito com base nas recomendações do Grupo de Trabalho de Nutrição e Metabolismo da *European Society of Intensive Care Medicine* (ESICM) [428, 429], e da *European Society of Parenteral and Enteral Nutrition* (ESPEN) [430] que recomendam um aporte calórico diário de 20 a 25 Kcal/Kg/dia.

A distribuição dos doentes pelos grupos foi feita aleatoriamente na farmácia do Hospital, por isso os investigadores clínicos e laboratoriais não sabiam a que grupo o doente estava alocado, só vindo a ter disso conhecimento no fim do estudo.

Ao grupo de estudo foram fornecidos 0.5 g/Kg/dia de glutamina (L-alanil – glutamina – Dipeptiven® – Fresenius Kabi, Bad Homburg, Germany) + 1 g/Kg/dia de uma mistura comercial de aminoácidos (Aminoplasmal L-12.5® BBraun, Melsungen, Germany). O grupo controlo foi suprido com 1.5 g/Kg/dia de uma mistura comercial de aminoácidos (Aminoplasmal L-12.5® BBraun, Melsungen, Germany).

O suporte energético não proteico foi garantido através de Glicose a 30% (2,5 g/Kg/dia - Fresenius Kabi, Campo de Besteiros, Portugal) e por uma emulsão lipídica mista de lípidos de cadeia longa-lípidos e de cadeia média (LCT-MCT) a 20% (0,75 g/Kg/dia - Intralipid 20%® BBraun, Melsungen, Germany) com uma relação 60:40 do total de calorias não proteicas a administrar. Os macronutrientes antes referidos foram misturados de forma asséptica na câmara de fluxo laminar da Farmácia do Hospital e incluídos numa Bolsa.

No momento de admissão, aos 5º e 10º dias após a inclusão no estudo, foram feitas colheitas de sangue periférico em tubo com EDTA para as determinações de populações e sub-populações linfocitárias (CD3, CD4, CD8, CD19, DN, CD69, CD69CD3, CD69CD4, CD45RA, CD45RACD3, CD45RACD4, CD45RACD25CD3, CD25, CD25CD3, CD25CD4, CD25CD69, CD25CD127, CD14, CD14HLADR, CD14CD95, CD14CD95L, HLADR, HLADRCD3, HLADRCD25CD3, HLADRCD69CD3, HLADRlysCD95, HLADRlysCD95L, HLADR(CD14)CD95L, CD28, CD28CD8, CD26CD28, CD26, CD26CD25, CD56, CD56CD3, CD56CD8, CD16, CD16CD3, CD16CD8, CD16CD56, CD127CD4, CD95HLADRCD14, CD95CD95L, CXCC3,

CXCR3CD4, CXCR3CD14, CCR5, CCR5CD4, CCR5CD14, CXCR3CCR5, CXCR3CCR5CD4, CXCR3CCR5CD14) por citometria de fluxo (“Facs Calibur” – Becton Dickinson, San Jose, CA, USA).

Para determinar, num único teste, as principais populações linfocitárias, utilizou-se o “*Lymphogram*” (Cytognos, Salamanca, Espanha) que contém os anticorpos monoclonais CD8/CD19, CD3/CD56 e anti-CD4, marcados com os fluorocromos fluoresceína-isotiocianato (FITC), ficoeritrina (PE) e ficoeritrina cianina 5 (PEcy5), respectivamente. Para as outras marcações foram usados CD45RA (BD Pharmingen, San Jose, USA), HLADR, CD69, CD16 (Immunostep, Salamanca, Espanha), CXCR3 (R&D Systems, Minneapolis, USA) e CD28 (BD Pharmingen, San Jose, USA) marcados com FITC, CD69 (Sanquin, Amsterdam, Netherlands), CD25 (BD Pharmingen, San Jose, USA), CD95L (Caltag Burlingame, CA, USA), CCR5 (R&D Systems, Minneapolis, USA), CD127 (BD Pharmingen, San Jose, USA), CD26 e CD56 (Immunotech, Marseille, França), com PE, CD3, CD4, CD8 e CD14 (BDBiosciences, San Jose, CA, USA), com Percp, CD3, CD25 e CD95 (BD Pharmingen, San Jose, USA) e CD 14 (Immunostep, Salamanca, Espanha) com APC.

Para a marcação celular, misturámos 100 µl de sangue total com os Ac monoclonais acima descritos, incubando esta mistura no escuro durante 15 minutos, à temperatura ambiente. Após a incubação com os anticorpos monoclonais, procedeu-se à lise dos eritrócitos, usando 2 ml de “*Lysing solution*” (BDBiosciences, San Jose, CA, USA), durante 10 minutos, à temperatura ambiente e no escuro. Em seguida, centrifugou-se 5 min a 450 G, verteu-se o sobrenadante e efectuou-se uma lavagem com 2 ml de *phosphate buffer saline* (PBS), com nova centrifugação de 5 min a 450 G. Suspenderam-se as células com 500 µl de PBS e fez-se a leitura no citómetro de fluxo “*Facscalibur*” (BD Biosciences, San José, CA, USA) usando o software de aquisição *Cellquest* (BD Biosciences, San José, CA, USA) adquirindo dez mil eventos.

Os dados foram guardados e analisados posteriormente usando o programa de análise “*paint-a-gate*”, que permitiu identificar as populações e sub-populações celulares.

Na apresentação dos resultados, os leucócitos são apresentados em números absolutos, enquanto as populações e sub-populações linfocitárias são

apresentadas em percentagens da expressão antigénica à superfície de linfócitos, monócitos, células dendríticas e macrófagos.

Os doentes randomizados para o estudo realizaram culturas para bacteriologia (aspirado traqueo-brônquico, hemoculturas e uroculturas) no momento da admissão no Serviço, repetindo-se estas, sempre que estivessem presentes sinais clínicos ou laboratoriais de infecção ou, na ausência destes, ao 5º e 10º dias após inclusão no estudo.

Usámos os critérios de infecção definidos pelo *Atlanta Center for Disease Control and Prevention* [431], para caracterizarmos uma nova infecção não aparente no momento da admissão ou que aparecia 48 horas depois do início do suporte nutricional.

Definimos pneumonia nosocomial como o aparecimento de um infiltrado “de novo” ou persistente numa radiografia do tórax, associado a pelo menos dois dos seguintes critérios – temperatura superior a 38°C, leucocitose (≥ 12000 leucócitos/mm³) ou leucopenia (< 4000 leucócitos/mm³) secreções purulentas traqueo-brônquicas, agravamento das trocas gasosas ($PaO_2/FIO_2 \leq 240$, com necessidade de ajustar parâmetros de suporte ventilatório) ou exame microbiológico positivo ($\geq 10^6$ CFU/ml) em amostra de aspirado traqueo-brônquico.

Definimos bacteriémia primária pelo isolamento numa hemocultura de gérmens não comensais ou isolamento de germens comensais em duas hemoculturas colhidas em alturas diferentes, desde que não seja identificado outro foco infeccioso responsável pela bacteriémia.

Definimos bacteriémia secundária através do isolamento do mesmo gérmem em hemocultura periférica e no foco primário.

Definimos infecção urinária como aquela que associa critérios de infecção (temperatura $> 38^\circ$, leucocitose ≥ 12000 leucócitos/mm³) à presença de mais do que 10^5 CFU/ml numa cultura de urina com isolamento de não mais do que duas espécies de microrganismos.

Definimos infecção de ferida cirúrgica como aquela que surge nos 30 dias seguintes à cirurgia e que se acompanha de sinais inflamatórios locais, com drenagem de pus ou com isolamento de gérmens obtidos de forma asséptica a partir de fluido ou tecido da zona de incisão.

Cada local de infecção era contabilizado como um episódio infeccioso separado.

3.3.4. Caracterização Geral da População

3.3.4.1. Grupos e Categorias de Diagnóstico à Admissão

Para uma melhor caracterização da população, dividimo-la em três grupos de admissão (médica, cirúrgica e traumática) e em categorias diagnósticas de admissão de acordo com os critérios do APACHE II [432].

3.3.4.2. Índices de Gravidade

Para descrevermos a gravidade clínica dos doentes seleccionados para o estudo, utilizámos o *APACHE II* [432], o *SAPS II e III* [433], que tomando em conta a idade, o estado de saúde prévio, o grupo de admissão e o grau de disfunção fisiológica aguda (medido através de variáveis clínicas e laboratoriais nas primeiras 24 horas de internamento), nos permite avaliar a gravidade clínica e o eventual risco de mortalidade.

3.3.4.3. Avaliação do Grau de Disfunção Orgânica

Para a avaliação e quantificação do grau de disfunção orgânica, utilizámos o SOFA [434]. Trata-se de um score vulgarmente usado, que quantifica a disfunção e potencial falência orgânica com base na avaliação clínico-laboratorial de seis órgãos e sistemas: respiratório, cárdio-vascular, hematológico, hepático, neurológico e renal. Atribuímos uma pontuação de zero a quatro pontos em função da alteração das diversas variáveis encontradas, equivalendo zero pontos a função normal, 1-2 pontos a disfunção e 3-4 pontos a falência do órgão avaliado, para um total máximo possível de 24 pontos (tabela I).

Para uma melhor caracterização do grau de disfunção orgânica e da sua evolução temporal, usámos várias medidas deste score:

SOFA à admissão – reflectindo o estado do doente à admissão no SMI;

SOFA médio ao 1º, 5º e 10º dia de inclusão no estudo, obtido pela soma da pontuação individual diária dos diversos órgãos, reflectindo a evolução clínica dos doentes ao longo do período;

SOFA máximo, obtido através da pontuação máxima para cada órgão, reflectindo o grau de disfunção cumulativa sofrida pelo doente;

Delta SOFA obtido pela diferença entre o SOFA máximo e o SOFA à admissão, traduzindo o grau de falências que se instalaram após o internamento no SMI.

Tabela I – SOFA (“Sequential Organ Failure Assessment”)

SOFA Score	0	1	2	3	4
Respiratório	PaO ₂ /FiO ₂ >400	PaO ₂ /FiO ₂ <400	PaO ₂ /FiO ₂ <300	PaO ₂ /FiO ₂ <200	PaO ₂ /FiO ₂ <100
Cardiovascular	PAM >70 mmHg Sem vasopressor	PAM <70 mmHg	Dopamina <5 ou Dobutamina	Dopamina > 5 Noradrenalina <0,1	Dopamina > 15 Noradrenalina >0,1
Renal (mg/dl)	Creatinina < 1,2	Creatinina 1,2-1,9	Creatinina 2,0-3,4	Creatinina 3,5-4,9	Creatinina > 5
Hematológico	Plaquetas >150000	Plaquetas <150000	Plaquetas <100000	Plaquetas < 50000	Plaquetas < 20000
Hepático (mg/dl)	Bilirrubina < 1,2	Bilirrubina 1,2-1,9	Bilirrubina 2,0-5,9	Bilirrubina 6,0-11,9	Bilirrubina > 12
Neurológico	Glasgow 15	Glasgow 13-14	Glasgow 12-10	Glasgow 6-9	Glasgow < 6

PaO₂/FIO₂ – avalia a oxigenação do sangue arterial através da relação entre a pressão parcial de O₂ e a FIO₂ (concentração de O₂ no ar inspirado). Valor final em mmHg.

PAM – pressão arterial média (mmHg)

Dopamina - µg/Kg/min ; Dobutamina - µg/Kg/min; Noradrenalina -µg/Kg/min.

Escala de Glasgow – escala de avaliação neurológica que tem em conta a melhor resposta motora, verbal e ocular ao estímulo.

3.3.4.4. Caracterização Nutricional

Para caracterizar o estado nutricional da população estudada usámos diversos parâmetros antropométricos – Peso, Altura, Índice de Massa Corporal (IMC) e Perímetro Braquial (PB) com o respectivo percentil.

Como peso de referência registámos o peso habitual referido pelo doente ou seus familiares. Medimos o doente no momento da admissão no SMI, usando para isso uma fita métrica não distensível.

O IMC foi calculado pela relação entre o peso e o quadrado da altura: $IMC = \text{peso (Kg)} / \text{altura (m}^2\text{)}$.

Em 2002 o grupo de Ermelinda Camilo publicou um estudo [435] realizado em doentes ventilados numa Unidade de Cuidados Intensivos, usando o perímetro braquial (PB), correlacionando-o com tabelas de percentis ajustados à idade e

ao género. Verificou que o PB para identificação de doentes graves malnutridos era idêntico à medição do perímetro muscular braquial (índice que avalia a massa magra e massa gorda braquial, através do PB e da prega cutânea tricipital), sendo o único parâmetro identificador de malnutrição que, abaixo do percentil 15, demonstra sensibilidade e especificidade significativa para o desenvolvimento de complicações infecciosas, de falência multiorgânica ou mesmo de aumento da mortalidade neste grupo de doentes graves.

Decidimos por isso utilizar o perímetro braquial para avaliar o estado nutricional dos doentes no momento da admissão.

O PB em centímetros foi sempre avaliado pelo investigador ao 1º dia de inclusão no estudo. A medição foi feita no braço não dominante, a meia distância entre o acrómio e o olecrânio, usando uma fita métrica plástica, flexível mas não distensível. O valor registado foi o da média de três avaliações consecutivas.

Os resultados obtidos foram depois comparados com valores de referência em função do sexo, idade, peso e altura, repartidos por percentis [436, 437], permitindo desta forma a avaliação do estado nutricional.

Calculámos a relação entre o aporte de proteínas e a sua excreção urinária, de forma a estabelecermos o balanço azotado de cada doente durante o período de estudo.

3.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi feita usando o *Statistical Package for Social Science da IBM* (SPSS versão 19.0 copyright 1989-2010 SPSS Inc.).

Na análise estatística descritiva, as variáveis numéricas com distribuição normal foram expressas em média e desvio padrão e aquelas que não tinham distribuição normal foram expressas em mediana e percentis 25 (P_{25}) e 75 (P_{75}).

Para a análise estatística inferencial usámos inicialmente os testes de Kolmogorov-Smirnov (KS) e de Shapiro-Wilk (nas amostras de pequena dimensão), para avaliarmos a normalidade da distribuição dos parâmetros relativos aos objectivos do estudo. Em função do padrão de distribuição

encontrado usámos os testes mais apropriados a cada uma das variáveis. Os resultados quantitativos que mostravam uma distribuição normal em cada um dos grupos, foram analisados por testes paramétricos (teste t de student) e apresentados como médias e desvio padrão. Para os resultados sem distribuição normal, usámos testes não paramétricos (Mann-Whitney para variáveis independentes e o de Wilcoxon para variáveis emparelhadas), sendo os valores apresentados como mediana e diferença interquartis.

Usámos uma combinação entre o teste t de student e o teste do χ^2 (chi²) para a comparação basal entre as populações estudadas.

Para os resultados dicotómicos, usámos o teste do χ^2 .

Calculámos o risco relativo com intervalo e confiança de 95% para a análise da incidência de infeção nosocomial.

A probabilidade de sobrevida aos 6 meses foi analisada através do teste de Kaplan-Meyer.

Realizámos uma análise estatística multivariada através da avaliação de componentes principais categóricas (CatPCA), usando o coeficiente α de Cronbach como indicador de consistência entre as variáveis integrantes das diversas dimensões independentes.

Para avaliar a relação entre a glutamina e as diversas sub-populações linfocitárias na redução da infeção nosocomial, seleccionámos as variáveis significativas e usámos um modelo de regressão logística multivariada.

Para todos os testes estabelecemos como nível de significância o valor de $p < 0,05$.

3.5. RESULTADOS

3.5.1. Características gerais da população

Este estudo incluiu 72 doentes internados no SMI-HUC.

A maioria dos doentes era do sexo masculino, com uma distribuição semelhante entre os grupos GLN (28 homens e 8 mulheres) e controlo (27 homens e 9 mulheres). Os grupos eram igualmente homogéneos para a idade, com uma média de 60,1 anos (29-83) para o grupo GLN vs 62,7 anos (20-84) para o controlo (tabela II).

Tabela II: Características gerais dos doentes à entrada

	Glutamina	Controlo	p
Idade	60,1 (29-83)	62,7 (20-84)	ns
Sexo (masculino:feminino)	28:8	27:9	ns
Patologia Médica	9 (25%)	9 (25%)	ns
Patologia Cirúrgica	14 (39%)	17 (47%)	ns
Patologia Traumática	13 (36%)	10 (28%)	ns
Peso (Kg)	73,7 (48-103)	74,7 (50-101)	ns
Altura (m)	1,67 (1,52-1,75)	1,67 (1,55-1,75)	ns

Dos 72 doentes estudados, 23 eram politraumatizados (32%), 31 eram cirúrgicos (43%) e 18 eram médicos (25%), com distribuição muito semelhante entre os dois grupos do estudo (Tabela II).

A categoria diagnóstica da admissão, com base no APACHE II, reflecte o principal motivo de internamento do doente no SMI. A falência respiratória presente na totalidade dos doentes internados, a sépsis em 41% (distribuídos por 12 doentes em sépsis grave e 8 doentes em choque séptico) e a disfunção neurológica consecutiva na sua maioria a traumatismos crânio-encefálicos presente em 31%, constituíram os principais motivos de admissão no SMI (Tabela III).

Tabela III – Grupos de Admissão e Categorias de Diagnóstico

Grupo Médico (n=18)	
Pneumonia	5
DPOC	2
Sépsis	8
Neurológico	1
Tóxicos	2
Grupo Cirúrgico (n=31)	
Sépsis	12
IR pós-operatório	4
Obstrução/perfuração	15
Grupo Trauma (n=23)	
Trauma Múltiplo	19
TCE	4

Categorias de diagnóstico (APACHE II)
DPOC = Doença Pulmonar Obstrutiva Crónica;
IR = Insuficiência Respiratória;
TCE = Traumatismo Crânio-Encefálico

Setenta e nove doentes tinham co-morbilidades significativas, 13 com diabetes mellitus, 9 com insuficiência cardíaca, 8 com DPOC, 3 com insuficiência renal crónica e 6 com doença hepática alcoólica (Tabela IV).

Em termos absolutos o grupo glutamina evidenciava maior número de co-morbilidades face ao controlo (42 vs 37), mas tal diferença não tinha significado estatístico.

Quando comparávamos os grupos de estudo face aos diversos índices de gravidade, verificávamos que não havia diferenças estatísticas entre eles. O APACHE II médio foi de 21 (14-32) para o grupo GLN e de 21,5 (10-32) para o grupo controlo, o SAPS II foi de 49,8 (31-73) para o grupo GLN e de 46,3 (18-72) para o grupo controlo e o SAPS III foi de 76 (44-93) para o grupo GLN e de 73,6 (42-103) para o grupo controlo, atestando não só a homogeneidade entre os grupos estudados mas, sobretudo, o elevado índice de gravidade dos doentes internados no SMI (Tabela V).

Tabela IV – Comorbilidades associadas

Grupos	Comorbilidades	Glutamina (42)	Controlo (37)
Respiratório	DPOC	4	4
Cardiovascular	ICC	5	4
	HTA	10	8
	DVP	2	1
Renal	IRC	1	2
Endócrino	Diabetes	7	6
	Obesidade	6	8
Digestivo	Úlcera Duodenal	3	2
	DH alcoólica	4	2

DPOC – Doença Pulmonar Obstrutiva Crónica; ICC – Insuficiência Cardíaca Congestiva; HTA – Hipertensão Arterial; DVP – Doença Vasculiar Periférica; IRC – Insuficiência Renal Crónica; Obesidade – IMC > 30 Kg/m²; DH alcoólica – Doença Hepática Alcoólica

Tabela V – Índices de Gravidade: medianas (P₅₀) (percentis P₂₅-P₇₅)

	Glutamina	Controlo	p
APACHE II	21 (14-32)	21,5 (10-32)	0,40
SAPS II	49,8 (31-73)	46,3 (18-72)	0,24
SAPS III	76 (44-93)	73,6 (42-103)	0,41

APACHE – “Acute Physiology and Chronic Health Evaluation”; SAPS – “Simplified Acute Physiology Score”

Análise estatística feita pelo teste U de Mann-Whitney

Tabela VI – Distribuição dos doentes por grupos de patologia - análise de sub-grupos

	GLUTAMINA	CONTROLO
Médica (Total)	10	8
Pneumonias	2	4
DPOC	1	1
Sépsis	5	3
Intoxicação OF	2	
Cirúrgica (Total)	14	17
Pancreatite	5	4
Perfuração Intestinal	7	11
Insufic Respir Pós-operatório	2	2
Traumática (Total)	12	11
PTR	11	8
TCE	1	3

DPOC – Doença Pulmonar Obstrutiva Crónica; Intoxicação OF – Intoxicação por organofosforados;

PTR – politraumatizados; TCE – Traumatismo Crânio-Encefálico.

A distribuição dos doentes incluídos no estudo pelas diversas patologias (Tabela VI), não traduz de forma fidedigna o “*case-mix*” do SMI. Neste, não encontramos uma prevalência de patologia cirúrgica sobre as demais. E a patologia médica apresenta no “*case mix*” habitual uma maior incidência face às outras patologias, do que aquela que transparece nesta amostra.

As diferenças que observámos entre os grupos, com aumento do número de doentes médicos e traumáticos no grupo glutamina face ao controlo e de aumento do número de doentes cirúrgicos no grupo controlo face ao grupo com glutamina, não tinham significado estatístico ($p=0,70$).

Nos doentes com patologia médica registámos menos doentes com pneumonias mas, mais doentes com sépsis no grupo glutamina face ao controlo.

Nos doentes com patologia cirúrgica há a acentuar o elevado número de peritonites por perfuração intestinal no grupo controlo face a grupo com glutamina.

Nos doentes com patologia traumática, há um maior número de politraumatizados no grupo glutamina e um maior número de traumatismos crânio-encefálicos sem outros traumas associados no grupo controlo.

Nenhuma destas diferenças tinha significado estatístico relevante.

3.5.2. Incidência da Infecção Nosocomial

O objectivo principal do nosso estudo era saber se suplementando com glutamina o suporte nutricional parentérico habitual, numa dose suficiente (\geq a 0,35 g/Kg/dia), por período superior a 5 dias, reduzíamos o número de infecções nosocomiais numa população de doentes graves de cuidados intensivos.

Alguns dos doentes incluídos no estudo estavam infectados no momento da admissão. O número de doentes nestas circunstâncias era coincidente (11 doentes) para cada um dos grupos.

Dos 11 doentes infectados do grupo da glutamina no momento da admissão no SMI, nove curaram a infecção com as medidas tomadas, enquanto os restantes dois permaneceram infectados nos 10 dias que se seguiram após o início da nutrição parentérica.

Os 11 doentes do grupo controlo infectados na admissão tiveram contudo uma evolução diferente. Destes, só um reverteu a infecção, os restantes dez mantiveram-na durante todo o período do estudo, re-infectando alguns deles por outros germens nosocomiais.

Tabela VII – Relação de doentes infectados antes e depois do início do suporte nutricional

	Total	Glutamina	Controlo	p
Número de doentes	72	36	36	
Doentes infectados à admissão no SMI	22 (30%)	11 (30%)	11 (30%)	-
Doentes com infecção após início NP	36 (50%)	15 (42%)	21 (58%)	P=0,15
Número total de doentes infectados	48 (67%)	17 (47%)	31 (81%)	P= 0,01*
Número de episódios infecção nosocomial		22	47	P= 0,001*
Índice de episódios de infecção por doente		0,61	1,30	

Análise estatística feita pelo teste do χ^2 (teste de Fisher) * p < 0,05

Quando analisámos os dois grupos do estudo (Tabela VII), verificamos existir, no grupo glutamina, uma tendência para a redução no número de doentes que infectaram após o início da nutrição parentérica, comparativamente ao controlo (15 vs 21 $p = 0,15$). Esta tendência passa a ter um significado estatístico importante, com benefício do grupo glutamina face ao controlo, quando comparamos o número total de doentes infectados durante o internamento no SMI (17 vs 31 $p = 0,01$).

Essas diferenças mantêm-se ao avaliarmos o número de episódios infecciosos durante o internamento no SMI. Enquanto no grupo glutamina havia 17 doentes infectados com 22 episódios infecciosos, correspondendo a um índice de um 0,61 novos episódios de infeção nosocomial por doente, no grupo controlo tínhamos 31 doentes infectados, com 47 episódios infecciosos correspondendo a um índice de 1,3 novos episódios de infeção nosocomial por doente.

Ao analisarmos o risco de infeção entre os dois grupos verificámos que, para os doentes do grupo controlo, este é 1,5 vezes superior após o início da nutrição parentérica (IC 95%, 0,91-2,45) e 1,82 vezes superior durante o tempo de permanência no SMI (IC 95%, 1,26-2,63).

Observámos neste estudo que o cálculo do risco (RR) do efeito da glutamina no aparecimento de novas complicações infecciosas é de 0,68 (IC 95% 0,42-1,08) após o início da nutrição parentérica e de 0,26 (IC 95%, 0,11-0,62) durante o tempo de permanência no SMI.

Assim, os doentes aos quais administrámos glutamina por via parentérica tiveram menos infeções nosocomiais (47%) do que aqueles incluídos no grupo controlo (81%), tendo esta diferença um significado estatístico importante ($p=0,01$).

Esta redução do número de episódios infecciosos é conseguida sobretudo à custa da redução da incidência de pneumonias (Tabela VIII).

Tabela VIII – Episódios infecciosos por local de origem da infecção

Episódios Infecciosos	Total	GLT	CTR	p
Pneumonias Nosocomiais	44	12	32	< 0,05
Bacteriémias	7	3	4	ns
Infecções Urinárias	9	4	5	ns
Infecções cateteres centrais	3	1	2	ns
Infecções local cirúrgico	6	2	4	ns

Análise estatística feita pelo teste do χ^2 (teste de Fisher) * p < 0,05

Quando comparamos os grupos deste estudo verificamos que o número de pneumonias do grupo controlo é quase o dobro do número de pneumonias do grupo de glutamina, assumindo esta diferença um significado estatístico importante (p < 0,05). Embora a prevalência de infecções com origem noutros locais (corrente sanguínea, vias urinárias ou locais cirúrgicos), mantenha um predomínio no grupo controlo, não assumem diferenças tão marcantes quanto aquelas que têm origem pulmonar.

Apresentando os resultados através da taxa de incidência de infecções, tal como definida pelo *Centers for Disease Control and Prevention*, para avaliar o efeito do tempo de internamento sobre o número de infecções, verificamos que o aparelho respiratório é a localização predominante das infecções, tanto no grupo glutamina quanto no controlo, logo seguida das bacteriémias e das infecções urinárias (Tabela IX).

Tabela IX – Taxa de incidência de infecções (relação entre o número de infecções e o tempo de internamento)

	Total	GLT	CTR	p
Pneumonias nosocomiais (1000/dias ventilação) *	10	7,5	13	< 0,05
Infecções urinárias (1000/dias sonda vesical) **	4,2	4	4,5	ns
Infecções cateter (1000/dias cateter) ***	0,8	0,5	1	ns

Análise estatística feita pelo teste do χ^2 (teste de Fisher) * p < 0,05

* $\frac{\text{N}^\circ \text{ pneumonias associadas a ventilador}}{\text{N}^\circ \text{ dias ventilação}} \times 1000$

** $\frac{\text{N}^\circ \text{ sondas vesicais infectadas}}{\text{N}^\circ \text{ dias sondas vesicais}} \times 1000$

*** $\frac{\text{N}^\circ \text{ de cateteres centrais infectados}}{\text{N}^\circ \text{ dias cateteres centrais}} \times 1000$

Classificando a gravidade da infecção durante o internamento verificamos que o número de doentes que mostrava compromisso hemodinâmico com necessidade de aminas vasopressoras era maior no grupo controlo, face ao grupo com glutamina, sem que esta diferença assumia significado estatístico (Tabela X).

Tabela X - Classificação da gravidade do quadro infeccioso séptico durante o internamento

	Total	Glutamina	Controlo	p
Sépsis Grave	30	13 (29%)	17(35%)	ns
Choque Séptico	18	8 (17%)	10 (21%)	ns

Análise estatística feita pelo teste do χ^2 (teste de Fisher) * p < 0,05

Tabela XI - Número de isolamentos bacteriológicos classificados por Gram

	Total	Glutamina	Controlo	p
Gram -	44	12	27	< 0,05
Gram +	25	8	17	< 0,05

Análise estatística feita pelo teste do χ^2 (teste de Fisher) * p < 0,05

Nos diversos produtos biológicos enviados para o laboratório por suspeita de infecção, registámos um predomínio de bactérias Gram negativas sobre as Gram positivas (Tabela XI), com uma diferença estatística importante.

Comparativamente ao grupo glutamina, o grupo controlo apresentava um maior número de isolamentos feitos tanto em germens Gram positivos como negativos.

Tabela XII – Gérmenes identificados nos diversos episódios infecciosos

	GLUTAMINA (22)	CONTROLO (47)	p
MRSA	8 (36%)	17 (36%)	1
Pseudomonas ae	8 (36%)	13 (28%)	0,57
Acinetobacter	4 (18%)	3 (6%)	0,19
Enterobacter		3 (6%)	
E Coli		2 (4%)	
Enterococos faecium		3 (6%)	
Serratia		1 (2%)	
Proteus		1 (2%)	
Klebsiella		1 (2%)	
Candida	2 (10%)	3 (6%)	0,65

Teste do chi quadrado bicaudal, resultados expressos em número total e percentagem em cada grupo
MRSA – *Staphylococcus aureus* metilino-resistente; *Pseudomona ae* – *Pseudomonas aeruginosa*;
E Coli – *Escherichia coli*

Os *Staphylococcus aureus* metilino-resistentes constituem os germes mais frequentemente isolados nos diversos meios de cultura, tanto no grupo glutamina quanto no controlo, logo seguidos das *Pseudomonas aeruginosa* e do *Acinetobacter baumannii* (Tabela XII).

De salientar o aumento do número de infeções por bactérias Gram negativas no grupo controlo (27 vs 12) comparativamente ao grupo glutamina.

Os fungos, responsáveis por 7% do total das infeções, têm uma prevalência semelhante em ambos os grupos, isolados em 2 episódios no grupo glutamina e 3 episódios no grupo controlo.

3.5.3. Marcadores de Infecção

A análise dos marcadores sistémicos (clínicos e laboratoriais) que usámos para o diagnóstico de infecção mostra que estes resultados são bastante sensíveis mas pouco específicos, pois podem estar presentes em várias outras situações não infecciosas [438, 439].

1. Leucócitos

Quadro 1. Leucócitos (n° células $\times 10^9/L$) evolução do 1^o ao 10^o dia

Resultado expresso em medianas e percentis (25%;75%)

	TOTAL	GLUTAMINA	CONTROLO	p
Dia 1	13,3 [10,1-16,7]	12,4 [9-15,5]	14,3 [11,5-17,4]	0,10
Dia 5	12,1 [9,8-17,1]	11,8 [9,4-15,5]	13,1 [9,6-18,7]	0,18
Dia 10	10,4 [10,4-15,9]	10,9 [8,2-13]	11,2 [10,4-17,8]	0,22

Análise estatística feita pelo teste U de Mann-Whitney * $p < 0,05$

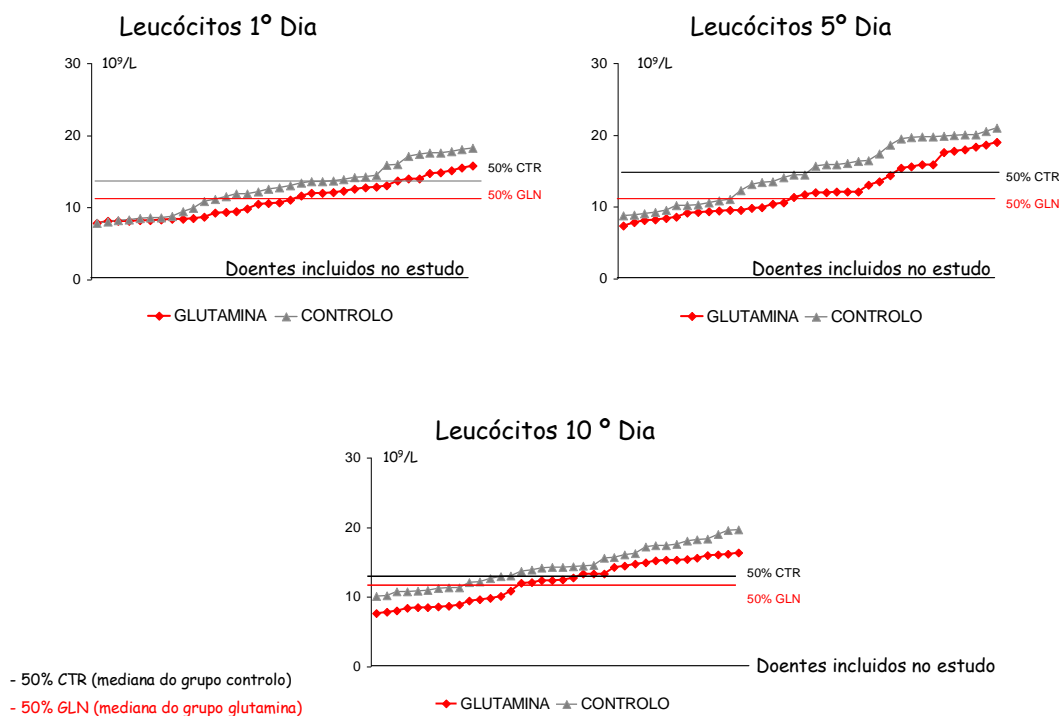


Figura.1 Representação gráfica dos leucócitos dos diversos doentes incluídos no estudo, distribuídos por ordem crescente de valores. Evolução do número de leucócitos entre o 1^o, 5^o e 10^o dia no grupo glutamina e no grupo controlo.

Durante o período de estudo houve uma redução do número total de leucócitos em ambos os grupos, embora essa redução tenha sido mais importante no grupo glutamina do que no grupo controlo.

De salientar, que durante o estudo, houve uma redução em todos os quartis no grupo glutamina comparativamente ao controlo.

Na figura 1 mostramos a distribuição dos leucócitos dos diversos doentes do estudo, apresentados por ordem crescente de valores em cada um dos grupos. A mediana do grupo controlo foi sempre superior à do grupo glutamina, sendo a diferença entre os grupos mais evidente ao 5º dia do estudo, sem contudo atingir diferença com significado estatístico, para depois se reduzir ao 10º dia.

2. Temperatura

Quadro 2. Temperatura (°C) evolução do 1º ao 10º dia (medianas)

Resultado expresso em medianas e percentis (25%;75%)

	TOTAL	GLUTAMINA	CONTROLO	p
Dia 1	37,5 [37-38,1]	37,6 [37-38,5]	37,5 [37-38,1]	0,91
Dia 5	38 [37,5-38,5]	37,8 [37,3-38,5]	38 [37,5-38,5]	0,41
Dia 10	38 [37,5-38,4]	37,5 [37,2-38]	38,1 [38-38,5]	< 0,05 *

Análise estatística feita pelo teste U de Mann-Whitney * p < 0,05

Verificámos uma diferença nas medianas das temperaturas ao longo do período de estudo, com uma redução desses valores para o grupo glutamina, com significado estatístico ao 10º dia comparativamente ao grupo controlo.

Na figura 2, que representa a distribuição da temperatura dos doentes incluídos no estudo por ordem crescente de valores, salientamos a redução da temperatura no grupo glutamina, cuja mediana era inicialmente superior à do grupo controlo para depois recuperar gradualmente e ao 10º dia se situar abaixo do mesmo grupo controlo, desta vez com uma diferença estatisticamente significativa.

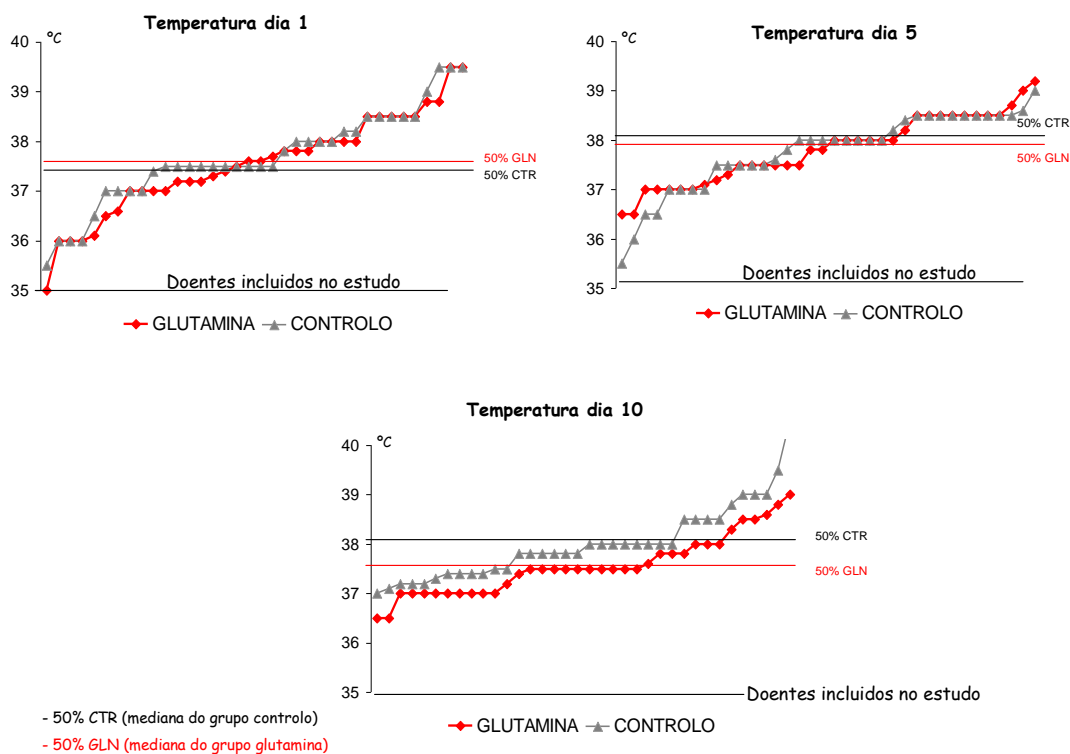


Figura 2. Representação gráfica da temperatura dos diversos doentes incluídos no estudo distribuída por ordem crescente de valores. Evolução da temperatura entre o 1º, 5º e 10º dia no grupo glutamina e no grupo controlo.

3. Proteína C reactiva

Quadro 3. Proteína C reactiva (mg/dl) evolução do 1º ao 10º dias (medianas)

Resultado expresso em medianas e percentis (25%;75%)

	TOTAL	GLUTAMINA	CONTROLO	p
Dia 1	13,9 [8,5-19,1]	15 [8,8-17,9]	13,2 [8-20,5]	0,58
Dia 5	13,9 [11,4-17,1]	12,9 [8,4-16]	14,4 [12,4-17,1]	0,09
Dia 10	14,7 [10,5-17,3]	11 [6,9-16]	15,6 [13,6-18,2]	0,001 *

Análise estatística feita pelo teste U de Mann-Whitney * p < 0,05

A proteína C reactiva (PCR) é uma proteína de síntese hepática estimulada por citocinas pró-inflamatórias (IL-6), que permanece aumentada em situações infecciosas [440, 441].

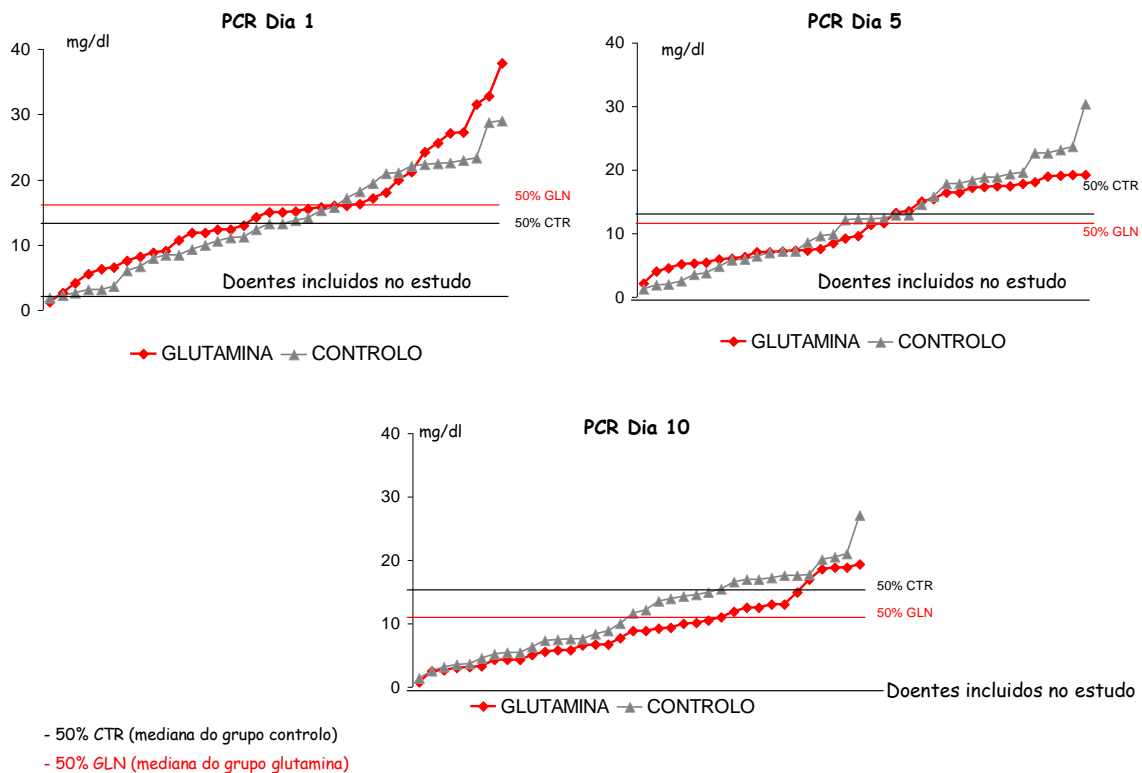


Figura 3. Representação gráfica da Proteína C reactiva (PCR) dos diversos doentes incluídos no estudo, distribuída por ordem crescente de valores. Evolução da PCR entre o 1º, 5º e 10º dia no grupo glutamina e no grupo controlo.

Verificámos uma redução gradual da PCR ao longo do tempo de estudo com benefícios para o grupo glutamina face ao grupo controlo. Tal diferença assume logo ao 5º dia um significado estatisticamente importante, que se acentua no 10º dia de estudo (Quadro 3).

Esse aspecto é evidenciado na figura 3, que mostra uma redução dos valores mais elevados da PCR do 1º ao 5º dia, e dos valores médios do 5º ao 10º dia, beneficiando o grupo glutamina. Os valores da PCR dos diversos doentes do estudo agrupados por ordem crescente, mostram uma melhoria gradual e significativa da mediana do grupo glutamina face ao controlo, à medida que o tempo do estudo vai decorrendo.

3.5.4. Avaliação do estado nutricional e evolução metabólica

Todos os doentes foram avaliados do ponto de vista nutricional. É rotina do SMI pesar e medir os doentes no momento da admissão, permitindo-nos, calcular o Índice de Massa Corporal (IMC). O uso do IMC para avaliação do estado nutricional em doentes graves de Medicina Intensiva é um parâmetro pouco sensível, sobretudo porque o peso avaliado é geralmente sobrevalorizado pelo excesso de água extra-celular [435]. Por isso usámos nesta relação o peso habitual do doente, conseguido por informação junto dos seus familiares.

Os valores médios de IMC encontrados (Tabela XIII) não foram diferentes entre os grupos GLN ($26,3 \text{ Kg/m}^2$) e controlo ($26,7 \text{ Kg/m}^2$), sugerindo um estado de excesso de peso ou pré-obesidade [442, 443].

O valor médio do perímetro braquial situou-se próximo do percentil 50, traduzindo um estado nutricional normal [444].

Quando analisámos a distribuição do estado nutricional resultante da avaliação feita pelos diversos métodos usando o IMC ou o PB e os comparámos, verificámos que o número de doentes malnutridos no momento da admissão não eram coincidentes, quer no global quer individualmente. Assim a avaliação pelo IMC identificou 6 doentes com $\text{IMC} < 20$ (8,3%), distribuídos por patologias médicas e cirúrgicas, sem predomínio entre os grupos. Por sua vez quando usávamos o PB, verificámos que 10 doentes (13,8%), seis do grupo GLN e quatro do grupo controlo, apresentavam PB inferior ao percentil 15, traduzindo malnutrição grave, constituída, na sua maioria, por doentes do foro cirúrgico. Só num destes doentes existia simultaneamente uma relação idêntica entre os dois marcadores de malnutrição, com o IMC de 16 Kg/m^2 e o PB < 15 . Catorze doentes (19,4%), seis do grupo GLN e oito do grupo controlo, apresentavam um $\text{IMC} \geq 30$, traduzindo um estado de obesidade.

Tabela XIII – Estado nutricional dos doentes no momento do internamento

	Glutamina	Controlo	p
Peso	73,7 ± 19,1 Kg	74,7 ± 18,9 Kg	ns
Altura	1,67 m	1,67 m	ns
IMC	26,3 ± 4,1 Kg/m ²	26,7 ± 4,3 Kg/m ²	ns
PB	28,2 ± 2,4 cm	29 ± 3,1 cm	ns
Percentil do PB	43,2 ± 23,5	46,5 ± 24,1	ns

(médias ± DP)

Evolução Metabólica

Randomizámos para este estudo, os doentes que até às 48 horas de internamento no SMI mantinham a impossibilidade de utilização do tubo digestivo para a administração de nutrientes.

Calculámos para cada doente o aporte calórico diário a administrar, tendo em conta as recomendações antes apontadas.

Verificámos que não existem diferenças significativas entre os dois grupos, quer no total das médias das calorias administradas ao longo dos dias do estudo, quer na evolução gradual da quantidade de calorias administradas que foi aumentando ao longo do tempo (Tabela XIV), das 20 Kcal/Kg iniciais até às 23 Kcal/Kg ao 10^o dia. O aporte calórico médio foi de 22 Kcal/Kg/dia com 1.5 gr/Kg/dia de proteínas.

Os gramas de azoto administrados também não variaram entre os grupos de estudo, com uma média de 17,7 g de azoto diário para o grupo glutamina e de 17,9 g para o grupo controlo.

Em relação ao suporte nutricional estávamos perante dois grupos idênticos, com um aporte isocalórico e isoazotado.

Tabela XIV - Média do total de calorias administradas ao longo do estudo
(Kcal/d)

	Glutamina	Controlo	p
Dia 1	1462,8 Kcal (19,9 Kcal/Kg/dia)	1523,3 Kcal (20,5 Kcal/Kg/dia)	ns
Dia 5	1586,6 Kcal (21,4 Kcal/Kg/dia)	1603,4 Kcal (22 Kcal/Kg/dia)	ns
Dia 10	1684,5 Kcal (22,5 Kcal/Kg/dia)	1723,3 Kcal (23 Kcal/Kg/dia)	ns

Tabela XV – Mediana dos balanços azotados acumulados ao longo do tempo

(representação em medianas e quartis 25 e 75)

	Total	Glutamina	Controlo	p
Admissão no SMI	-102 (-60/-166)	-102 (-60/-139)	-100 (-55/-183)	0,91
Dia 1 do estudo	-123 (-64/-191)	-127 (-83/-166)	-118 (-60/-233)	0,70
Dia 5 do estudo	-132 (-76/-219)	-125 (-76/-210)	-150 (-76/-243)	0,18
Dia 10 do estudo	-139 (-77/-209)	-134 (-68/-189)	-143 (-83/-221)	0,77
Alta do SMI	-110 (-67/-179)	-103 (-64/-178)	-118 (-67/-182)	0,72

Análise estatística feita pelo teste U de Mann-Whitney * p < 0,05

É curioso observar que os balanços azotados entre os grupos são muito idênticos no momento da admissão e da inclusão no estudo (Tabela XV), mas ao 5º dia após o início do suporte nutricional verifica-se uma diferença com um balanço azotado menos negativo (sobretudo do quartil mais elevado) no grupo glutamina confirmando uma tendência, ainda que sem significado estatístico importante. Essa tendência perde-se depois ao longo do tempo, com a recuperação mais lenta do grupo controlo, sendo a média dos balanços azotados no momento da alta do SMI, quase igual entre os grupos.

Procurámos alguma associação entre evolução dos balanços azotados e a infecção, através da análise da relação entre doentes infectados e não infectados em cada grupo e evolução dos balanços azotados (Tabela XVI).

Ao longo de todo o estudo a ausência de infecção fez-se acompanhar de balanços azotados menos negativos, esboçando mesmo uma tendência de benefício no momento da alta para o grupo sem infecção, embora sem significado estatístico.

Tabela XVI – Relação entre a média dos balanços azotados e a infecção no grupo glutamina e controlo (representação em medianas e quartis 25 e 75)

	Sem Infecção	Com Infecção	p
Balanço Azotado dia 0	-98 (-64/-124)	-103 (-59/-181)	0,80
Balanço Azotado dia 1	-104 (-77/-196)	-128 (-62/-193)	0,20
Balanço Azotado Dia 5	-127 (-72/-215)	-132 (-82/-221)	0,35
Balanço Azotado Dia 10	-135 (-59/-224)	-142 (-80/-199)	0,80
Balanço Azotado Alta	-91 (-69/-158)	-131 (-64/-190)	0,20

Análise estatística feita pelo teste U de Mann-Whitney * p < 0,05

3.5.5. Avaliação da Falência Multiorgânica - SOFA (Sequential Organ Failure Assessment)

Constitui objectivo da Medicina Intensiva estabilizar e tratar falências orgânicas potencialmente reversíveis. Daí que tenha todo o sentido a existência de um instrumento que nos permita avaliar o grau de falências existentes em cada doente, quantificá-las e verificar a sua evolução ao longo do internamento.

Alguns estudos publicados referem que a glutamina reduz a morbilidade [304, 445-447] de doentes internados em SMI. Existe uma relação directa entre o score de SOFA e a mortalidade [448].

Tabela XVII – Avaliação do SOFA ao longo do período do estudo

Resultado expresso em medianas e percentis (25%;75%)

	SOFA Dia 1			SOFA Dia 5			SOFA Dia 10		
	GLN	CTR	p	GLN	CTR	p	GLN	CTR	p
SOFA Respir.	3 [2;3]	3 [2;3]	0,96	2 [2;3]	2 [2;3]	0,79	2 [1,2;3]	2 [2;3]	0,18
SOFA Circul.	2 [1;2]	2 [1;3]	0,47	1 [0;2]	2 [0;2]	0,37	1 [1;2]	0,5 [0;2]	0,91
SOFA Neuro.	1 [0;1]	0 [0;1]	0,19	0 [0;1]	0 [0;0]	---	0 ([0;0]	0 [0;0]	---
SOFA Hemat.	0 [0;0]	0 [0;0]	---	0 [0;0]	0 [0;0]	---	0 [;0]	0 [0;1]	0,08
SOFA Hepát.	1 [0;1]	0[0;2]	0,65	0 [0;1]	0 [0;2]	0,87	0	0	---
SOFA Renal	0 [0;1]	0 [0;1]	0,46	0 [0;0]	0 [0;1]	0,43	0 [0;0]	0 [0;1]	0,09
SOFA Total	6,5 [5;8]	6,4[5;8]	0,9	5,5 [3;7]	5,5 [4;7]	0,57	4 [3;5]	5 [3;7]	0,15

Análise estatística feita pelo teste U de Mann-Whitney * p < 0,05

Quando analisámos a avaliação do registo de SOFA durante o período do estudo (Tabela XVII), verificámos que disfunção e falência orgânica foram mais importantes no início do estudo (dia 1), o que é traduzido por medianas de SOFA superiores em ambos os grupos. Registou-se, no fim da intervenção terapêutica (dia 10), uma redução do número de órgãos em falência, mais evidente no grupo glutamina 6,5 [5;8] vs 4 [3;5] do que no grupo controlo 6,4 [5;8] vs 5 [3;7]. Estas diferenças do SOFA total são pequenas e conseguidas, sobretudo, à custa da diminuição do número de falências respiratórias e hepáticas.

Na avaliação por scores de órgãos verificamos que o predomínio das alterações respiratórias e hemodinâmicas são determinantes para o valor do score final.

As diferenças entre o primeiro e o último dia do estudo foram alcançadas pela estabilização destas duas falências, com predomínio da correção respiratória no grupo glutamina (com uma tendência importante, mas sem atingir grau de significância estatística) e da função hemodinâmica no grupo controlo.

Na análise do score total de SOFA registámos uma melhoria gradual das disfunções orgânicas ao longo do tempo, com benefícios para o grupo glutamina, particularmente nos quartis mais elevados onde assume uma tendência estatística importante na diferença entre o 1º e o 10º dia, também sem atingir um grau de significado estatístico.

Estes valores foram superiores aos de outros estudos multicêntricos que incluíam SMI portugueses, que apresentavam valores médios de SOFA de $4,5 \pm 3,3$ para o SOFA inicial e de $3 \pm 3,3$ para o Delta SOFA [448].

O delta SOFA, obtido pela diferença entre o SOFA máximo e o SOFA inicial, reflecte o grau de disfunção ou falência que aparece após a admissão no SMI.

Tabela XVIII – Delta SOFA entre o 1º, 5º e 10º dia do estudo

Resultado expresso em medianas e percentis (25%;75%)

	Δ SOFA 1-5			Δ SOFA 1-10		
	GLN	CTR	p	GLN	CTR	p
SOFA Respir	-1 [0;0]	0 [0;0]	0,0	-2 [-3;1]	0 [-1;1]	0,08
SOFA Circulat	2 [2;3]	0 [-1;0]	< 0,05	1 [0;2]	-1 [-1;0]	0,0
SOFA Neurol	0 [0;1]	0 [-1;0]	0,0	0 [0;1]	0 [-1;0]	0,0
SOFA Hemat	0 [0;0]	0 [0;0]	0,41	0 [0;0]	0 [0;0]	0,52
SOFA Hepát	0 [0;1]	0 [0;0]	< 0,05	1 [0;1]	0 [-1;1]	0,0
SOFA Renal	0 [0;0]	0 [0;0]	< 0,05	0 [0;0]	0 [0;0]	0,10
SOFA Total	-2 [-3;0]	-1 [-2;0]	0,20	-2 [-3;-1]	-2 [-3;1]	0,15

Análise estatística feita pelo teste U de Mann-Whitney * p < 0,05

Analisámos as diferenças do SOFA entre o 1º e 5º dia (Δ SOFA 1-5) e entre o 1º e 10º dia do estudo (Δ SOFA 1-10) (Tabela XVIII).

Considerámos as variações inferiores a 1 como melhoria, e as superiores a 1 como agravamento em relação ao estado anterior. Tal associação foi feita com base em estudos anteriores que mostravam uma relação entre estes graus de associação e o resultado clínico.

No grupo glutamina houve uma melhoria da falência respiratória, que se estabeleceu precocemente (Δ SOFA 1-5) e se consolidou ao longo do tempo (Δ SOFA 1-10), com uma tendência estatística importante mas sem atingir um grau de significância quando comparada com o grupo controlo.

Passou-se o oposto para a disfunção cárdio-circulatória, onde houve um agravamento precoce no grupo com glutamina (Δ SOFA 1-5) relativamente ao controlo, atingindo esta diferença, um significado estatístico importante. Esta diferença perdia significado no Δ SOFA 1-10, embora continuasse a beneficiar o grupo controlo face ao grupo com glutamina.

Houve uma estabilização mais rápida no grupo glutamina, com um score total Δ SOFA 1-5 com mediana de -2 e uma amplitude maior entre percentis [-3;0] comparativamente ao grupo controlo, traduzindo uma redução mais acentuada no número de órgãos em falência.

Da mesma forma verificámos que o score total para o Δ SOFA 1-10 confirma a recuperação mais rápida das falências no grupo glutamina comparativamente ao controlo.

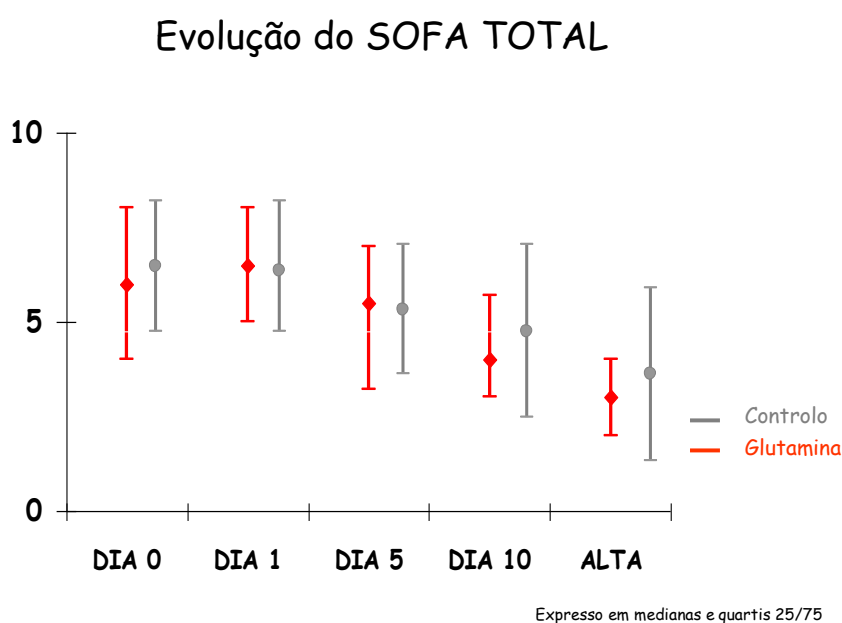


Figura 4. Evolução do SOFA Total ao longo do tempo de permanência no SMI

A disfunção de órgãos no início do tratamento traduz um conjunto de fenómenos biológicos, genéticos, imunes e hemodinâmicos ampliados pela presença de co-morbilidades e pelas intervenções antes do internamento no SMI.

A figura 4 dá-nos uma perspectiva da evolução do SOFA total ao longo do tempo de permanência dos doentes no SMI. Verificámos que as medianas do SOFA subiram discretamente entre a entrada no SMI e a inclusão no estudo mas, a partir daí, registámos um decréscimo até ao momento da alta, mais acentuado no grupo glutamina do que no grupo controlo, mas sem diferença estatística significativa ($p=0,10$).

O grupo controlo além de apresentar valores de medianas mais elevados tem, tanto no 10º dia do estudo como no momento da alta, uma grande amplitude de distribuição da amostra ao longo dos quartis, com elevados valores de SOFA nos quartis mais altos, traduzindo maior grau de disfunção.

Os doentes que vieram a falecer apresentavam *scores* individuais mais elevados, traduzindo uma clara relação entre o aumento do *score* e a mortalidade.

3.5.6. Tempo de Internamento

São vários os factores que influenciam o tempo de internamento. O elevado *score* de gravidade desta população, o grau de falência multiorgânica instalada, o quadro inflamatório mantido, traduzido de forma indirecta pela incapacidade de equilibrar o balanço azotado destes doentes em qualquer um dos braços do estudo.

Apesar do número de infecções ser mais elevado no grupo controlo, os tempos de internamento não registam diferenças para o grupo glutamina (Tabela XIX).

Tabela XIX -Tempo de internamento SMI e no Hospital (dias)

	Glutamina	Controlo	p
Tempo de internamento no SMI	18,4	18,2	0,76
Tempo de internamento no Hospital	52,6	49,5	0,64

3.5.7. Mortalidade

O grupo glutamina teve sempre uma menor taxa de mortalidade (tabela XX) quer no SMI, quer no Hospital quer a longo prazo (6 meses), embora só nesta última apresente uma diferença com significado estatístico importante quando comparada com o grupo controlo.

Tabela XX - mortalidade no SMI, no Hospital e 6 meses após o internamento, comparando os grupos glutamina e controlo

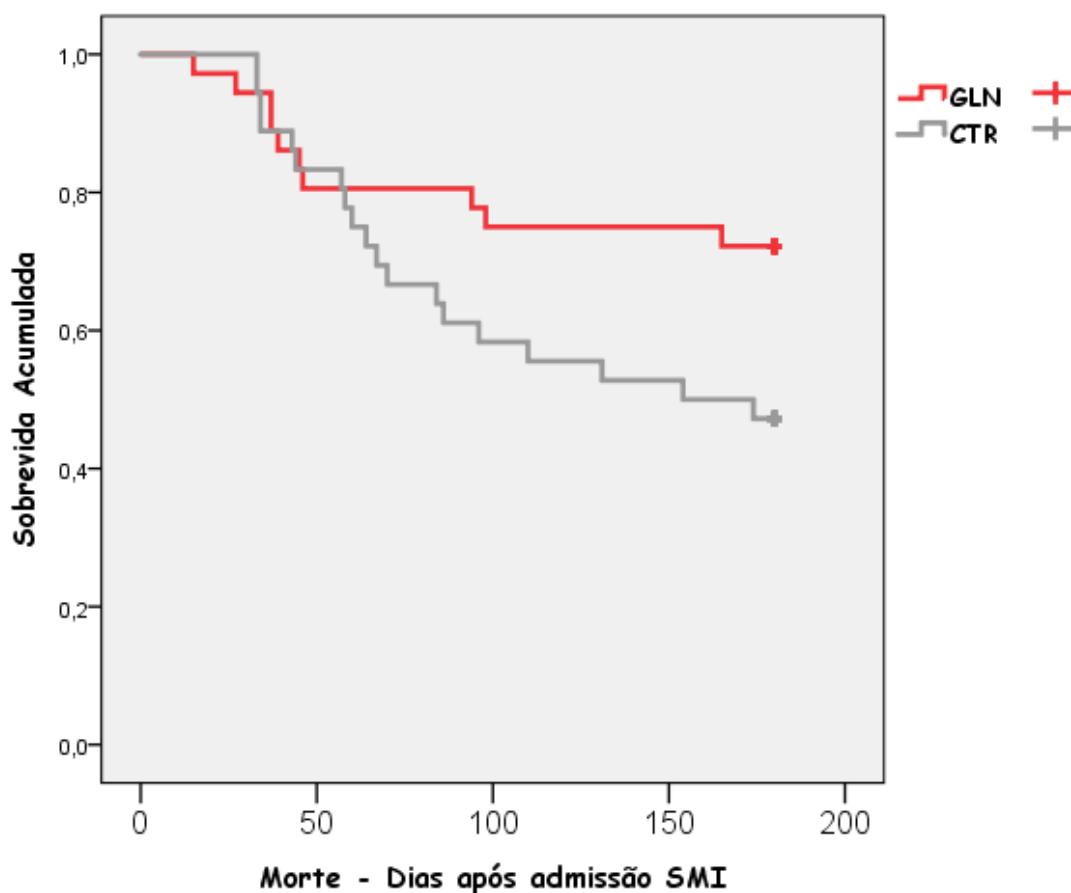
	Glutamina	Controlo	p
Mortalidade SMI	5 (14%)	8 (22%)	0,54
Mortalidade Hospital	8 (22%)	12 (33%)	0,43
Mortalidade 6 Meses	10 (28%)	16 (44%)	0,04

Análise estatística usando o teste exacto de Fisher, com valores significância para $p < 0,05$

A análise da curva de sobrevivência de Kaplan-Meyer (Figura 5) mostra uma melhoria significativa da sobrevida aos 180 dias no grupo glutamina, quando o comparamos com o controlo ($p = 0,04$ Mantel-Cox).

Verificámos não existirem diferenças significativas de sobrevida entre os dois grupos, quer no SMI quer no Hospital.

Figura 5. Curva de sobrevivência de Kaplan-Meyer



Curva de Kaplan-Meyer, análise feita pelo método de Mantel-Cox com $p 0,04$

3.5.8. Estudo das Populações e Sub-populações Linfocitárias

Os linfócitos constituem componentes fundamentais quer da resposta inata, quer da resposta celular, mediada pelo sistema de defesa orgânico.

No capítulo inicial delineámos os fundamentos do sistema imune e a forma como se articula após uma agressão.

Inúmeros relatos publicados na literatura associam um estado de imunodepressão à gravidade da agressão de doentes de Medicina Intensiva.

A glutamina exerce um papel primordial na proliferação de diversos tipos de células, particularmente naquelas com rápidos ciclos celulares, como os linfócitos [150, 324, 356, 449] os enterócitos [450] e as células tumorais [219, 451].

O grupo de Yamauchi demonstrou que era possível fazer proliferar *in vitro* células de Caco-2, suplementando o meio com glutamina, arginina ou nucleótidos [452].

A glutamina é um dos aminoácidos fornecedores de grupos azotados (amida) necessários à formação dos anéis de purina e pirimidina. Usando L-glutamina marcada com $5N^{15}$, verificávamos um aumento de novos nucleótidos com a incorporação de glutamina marcada, sendo esta incorporação estimulada pela arginina, confirmando os efeitos destes dois aminoácidos na estimulação da síntese de nucleótidos.

A glutamina activa vias de sinalização extra-celular responsáveis pela regulação de kinases (ERK e JNK) que, estimuladas por factores de crescimento, se veêm envolvidas na activação de factores de transcrição dependentes de AP-1 e c-Jun, que regulam a expressão dos genes envolvidos na divisão celular [340].

Os doentes randomizados para o estudo realizaram colheitas ao 1º, 5º e 10º dia para estudo das populações e sub-populações linfocitárias.

Descreveremos de seguida os resultados que obtivemos ao longo do período do estudo para cada um dos grupos.

Como atrás referimos, todos os resultados de populações e sub-populações linfocitárias serão apresentados em percentagens da expressão antigénica à superfície das células de defesa orgânica que estudámos, excepção feita aos leucócitos que são apresentados em número absoluto.

Tabela XXI. LINFÓCITOS (número de células por mm³) – evolução do 1º ao 10º dia. Resultados expressos em medianas e percentis [25-%75%]

	TOTAL	GLUTAMINA	CONTROLO	p
Dia 1	690 [380-1012]	715 [389-1084]	585 [373-926]	0,65
Dia 5	658 [424-1025]	810 [436-1083]	628 [342-836]	0,10
Dia 10	700 [435-1035]	892 [549-1295]	561 [365-890]	0,01 *

Análise estatística feita pelo teste U de Mann-Whitney * p < 0,05

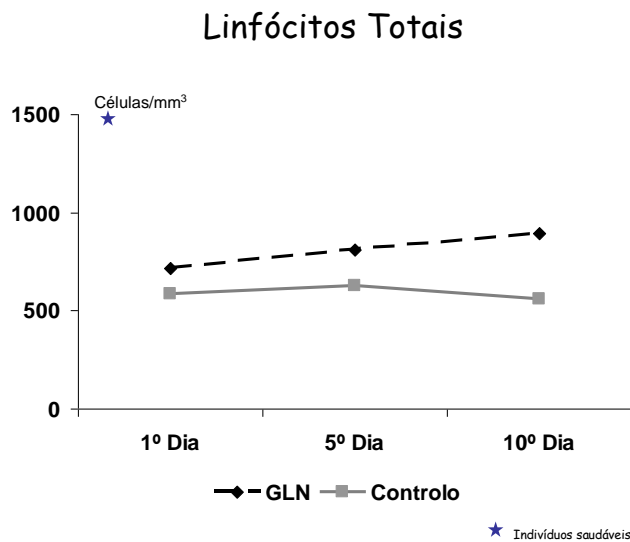


Figura 6. Distribuição dos linfócitos totais ao longo do tempo

Comparativamente aos valores da população em geral, existe neste grupo de doentes graves uma linfopenia, que persiste durante todo o tempo do estudo. Esta é menos acentuada no grupo glutamina comparativamente ao controlo. Esta recuperação do grupo glutamina face ao controlo apresenta a partir do 5º dia do início da terapêutica uma tendência de benefício que se converte em diferença estatisticamente significativa a partir do 10º dia.

Tabela XXII. LINFÓCITOS CD3 (%) - evolução do 1º ao 10º dia.

Resultados expressos em medianas e percentis [25-%75%]

	TOTAL	GLUTAMINA	CONTROLO	p
Dia 1	74,3 [61,5-79,5]	74,3 [64,9-79,5]	72,9 [60,2-80,8]	0,55
Dia 5	73,8 [65,2-79,8]	73,1 [65,2-79]	71,8 [65-78,4]	0,58
Dia 10	74,9 [61,1-81,6]	79,6 [68,3-85,4]	68,7 [58,5-75,1]	0,04 *

Análise estatística feita pelo teste U de Mann-Whitney * p < 0,05

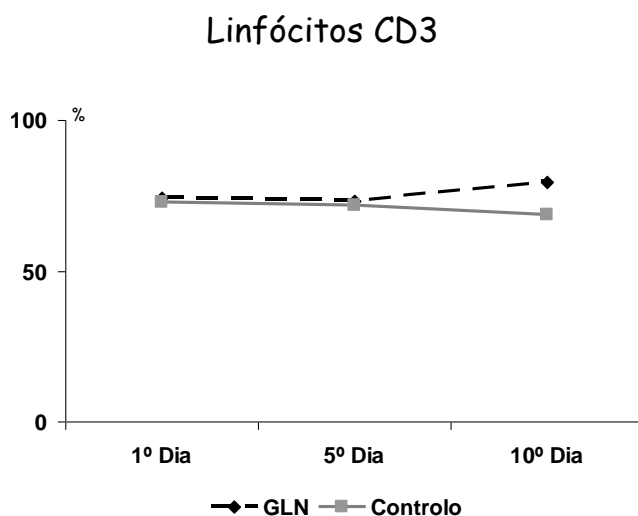


Figura 7. Distribuição dos linfócitos CD3 ao longo do tempo

As moléculas do complexo CD3 estão presentes à superfície de timócitos, de linfócitos T e de células T natural killer (NK), onde são essenciais para garantirem a funcionalidade do receptor das células T, fundamental para o reconhecimento antígeno. Logo que o receptor é activado, exercem um importante papel na transdução do sinal para activação linfocitária.

Registámos um aumento da população TCD3 no grupo glutamina comparativamente ao controlo, que assume um significado estatístico importante ao 10º dia após o início do suporte nutricional (79,6% [68,3-85,4] vs 68,7% [58,5-75, 1] ; p < 0,05).

Tabela XXIV. LINFÓCITOS CD4 (%) - evolução do 1º ao 10º dia

Resultados expressos em medianas e percentis [25-%75%]

	TOTAL	GLUTAMINA	CONTROLO	p
Dia 1	44,1 [33-51,2]	43,3 [33,4-49,1]	44,8 [31-57,3]	0,63
Dia 5	42,4 [32,4-51,7]	43,9 [33,6-50,1]	40 [30-52,4]	0,34
Dia 10	42,7 [31,1-51,3]	48,5 [39-55]	40,3 [25,6-52]	0,05 *

Análise estatística feita pelo teste U de Mann-Whitney * $p < 0,05$

Linfócitos CD4

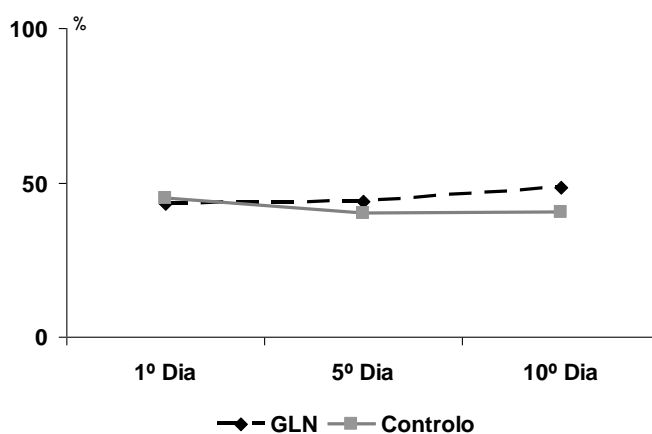


Figura 8. Distribuição dos linfócitos CD4 ao longo do tempo

Os antígenos exógenos apresentados em associação com moléculas HLA II são reconhecidos pelos linfócitos TCD4, activando-os. Estes linfócitos activados designam-se por células Thelper (Th) com capacidade de auxiliarem outras células de resposta à agressão antigénica.

Os linfócitos Th1, produzem IFN γ e IL-2 que como vimos anteriormente, são necessários à diferenciação daquelas células, amplificando a resposta inflamatória.

Habitualmente os doentes graves em particular se infectados, cursam com uma diminuição dos linfócitos TCD4+ tendo por isso uma reduzida capacidade de resposta ao estímulo mitogénico [453, 454].

Ambos os grupos estão abaixo do limite da normalidade, traduzindo um estado de depressão imunológica, característico do CARS. Apesar disso, existe uma tendência para recuperação dos TCD4 no grupo glutamina a partir do 5º dia comparativamente ao grupo controlo (43,9% [33,6-50,1] vs 40% [30-52,4]; p=0,34), que assume significado estatisticamente importante ao 10º dia após o início do estudo (48,5% [39-55] vs 40,3% [25,6-52]; p=0,05).

Tabela XXV. LINFÓCITOS CD8 (%) - evolução do 1º ao 10º dia.

Resultados expressos em medianas e percentis [25-%75%]

	TOTAL	GLUTAMINA	CONTROLO	p
Dia 1	21,5 [15,9-31]	23,4 [16,1-32,8]	21,3 [14,6-27,3]	0,19
Dia 5	20,9 [15,6-29,1]	21,7 [19,3-32,3]	19,4 [14,4-27,6]	0,28
Dia 10	22,3 [16,9-29,8]	22,3 [18,5-32,2]	19,1 [15,1-28,5]	0,10

Análise estatística feita pelo teste U de Mann-Whitney * p < 0,05

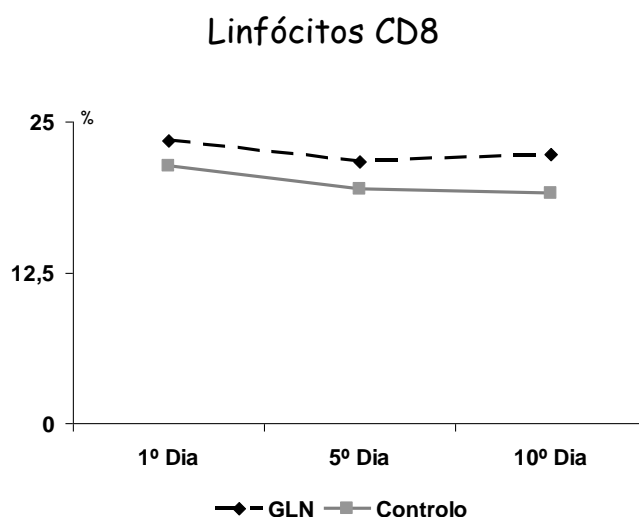


Figura 9. Distribuição dos linfócitos CD8 ao longo do tempo

Os linfócitos TCD8, designados por T citotóxicos, têm a capacidade de destruírem células infectadas por antígenos intra-celulares, células tumorais ou

células de enxertos de transplante. À superfície destas células T existem receptores que reconhecem antígenos apresentados por moléculas HLA I. No grupo glutamina registamos uma pequena descida do 1º para o 5º dia, logo seguida de uma recuperação para níveis séricos semelhantes aos do 1º dia. No grupo controlo há uma descida constante do 1º ao 10º dia. Esta descida, condiciona ao 10º dia após o início do estudo uma diferença entre os grupos, que se traduz numa tendência estatística que beneficia o grupo glutamina que mantêm os níveis séricos dos linfócitos T citotóxicos apesar da agressão (glutamina: 22,3% [18,5-32,2] vs controlo:19,1% [15,1-28,5] p= 0,10).

Tabela XXVI. LINFÓCITOS CD19 (%) - evolução do 1º ao 10º.

Resultados expressos em medianas e percentis [25%-75%]

	TOTAL	GLUTAMINA	CONTROLO	p
Dia 1	13,6 [8,3-22,5]	15 [10-23,6]	13,1 [6,9-18,6]	0,28
Dia 5	12,2 [7,5-18,2]	13,5 [8,8-18,7]	11,5 [6,3-15,3]	0,15
Dia 10	10,4 [7,5-17,5]	12,9 [9,6-19,4]	9,8 [4,8-15,3]	0,10

Análise estatística feita pelo teste U de Mann-Whitney * p < 0,05

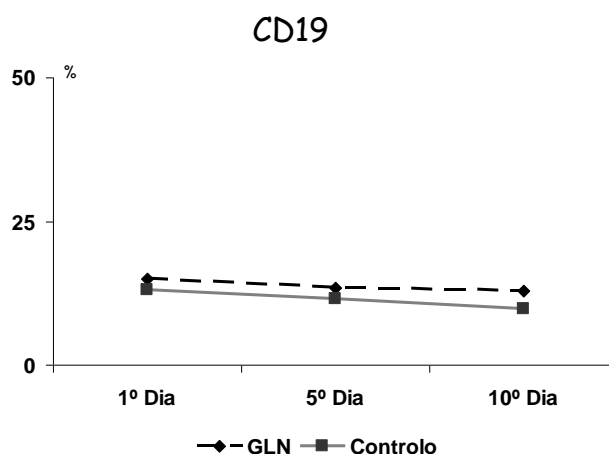


Figura 10. Distribuição dos linfócitos CD19 ao longo do tempo

É um marcador presente à superfície dos linfócitos B maduros, contribuindo para a regulação do seu desenvolvimento, activação e diferenciação.

Observámos que enquanto no grupo glutamina houve uma manutenção da expressão CD19 à superfície dos linfócitos, aproximando-se dos níveis séricos da população normal, no grupo controlo houve uma descida marcada que conferiu à comparação entre os grupos uma diferença, embora sem significado estatístico, aparente logo ao 5º dia (glutamina: 13,5% [8,8-18,7] vs controlo: 11,5% [6,3-15,3]; $p=0,15$), que se manteve ao longo do estudo até ao 10º dia após o início do suporte nutricional (glutamina: 12,9% [9,6-19,4] vs controlo: 9,8% [4,8-15,3]; $p=0,10$).

Tabela XXVII. LINFÓCITOS CD25 (%) - evolução do 1º ao 10º dia

Resultados expressos em medianas e percentis [25%-75%] dias (medianas)

	TOTAL	GLUTAMINA	CONTROLO	p
Dia 1	24,9 [18,5-31,2]	23,9 [18-31,1]	26 [19-32,1]	0,49
Dia 5	25,7[18,1-34,4]	25,3 [19,1-32,5]	26,4 [17-35,9]	0,51
Dia 10	26,3 [20-35,3]	28,1 [21-38,9]	23,9 [17,9-32,9]	0,12

Análise estatística feita pelo teste U de Mann-Whitney * $p < 0,05$

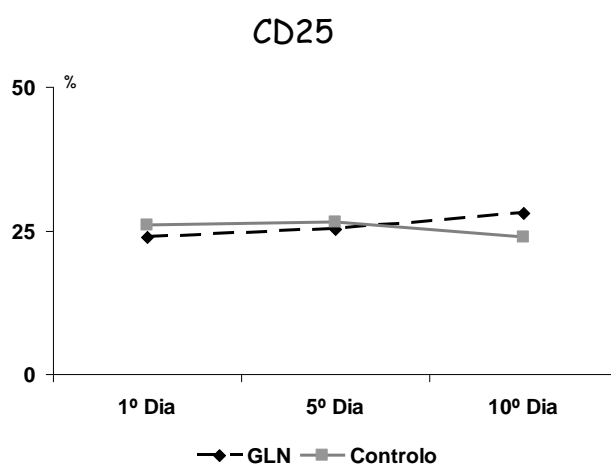


Figura 11. Distribuição dos linfócitos CD25 ao longo do tempo

Presente à superfície de linfócitos T e B activados por estimulação antigénica, células NK, algumas células dendríticas e alguns macrófagos.

Funcionalmente é o receptor da cadeia α da IL-2, é por isso considerado um marcador de activação linfocitária.

No grupo controlo o número de linfócitos com expressão CD25 desceu durante todo o estudo.

Já no grupo glutamina há um aumento gradual do número de linfócitos que expressam à sua superfície receptores para CD25, assumindo a diferença para o grupo controlo ao 10º dia após o início do suporte nutricional uma tendência estatística (28,1% [21-38,9] vs 23,9% [17,9-32,9]; $p=0,12$).

Tabela XXVIII. LINFÓCITOS CD25CD3 (%) - evolução do 1º ao 10º dia
Resultados expressos em medianas e percentis [25-75%]

	TOTAL	GLUTAMINA	CONTROLO	p
Dia 1	22 [15-29]	20 [13-28]	23 [17-31]	0,14
Dia 5	22 [16-31]	23 [18-31]	21 [15-32]	0,44
Dia 10	26 [15-34]	30 [20-35]	21 [10-33]	0,04 *

Análise estatística feita pelo teste U de Mann-Whitney * $p < 0,05$

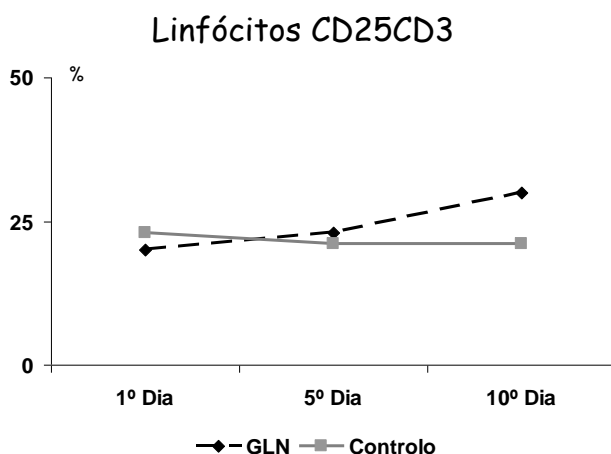


Figura 12. Distribuição dos linfócitos CD25CD3 ao longo do tempo

A percentagem de células T activadas CD25+ CD3+ foi superior no grupo glutamina, com significado estatístico importante ao 10º dia de terapêutica (30% [20-35] vs 21% [10-33] ; p=0,04), comparativamente ao grupo controlo.

Tabela XXIX. LINFÓCITOS CD25CD4 (%) - evolução do 1º ao 10º dia
Resultados expressos em medianas e percentis [25%-75%]

	TOTAL	GLUTAMINA	CONTROLO	p
Dia 1	19,7 [15,2-26]	18 [11,9-22,5]	20,2 [17,8-26,5]	0,13
Dia 5	20,2 [15,4-26,8]	18,6 [15,4-20,7]	23,5 [15-29]	0,08
Dia 10	22 [14,9-25,5]	16,3 [10,9-24,5]	22,8 [17,7-31,2]	0,09

Análise estatística feita pelo teste U de Mann-Whitney * p < 0,05

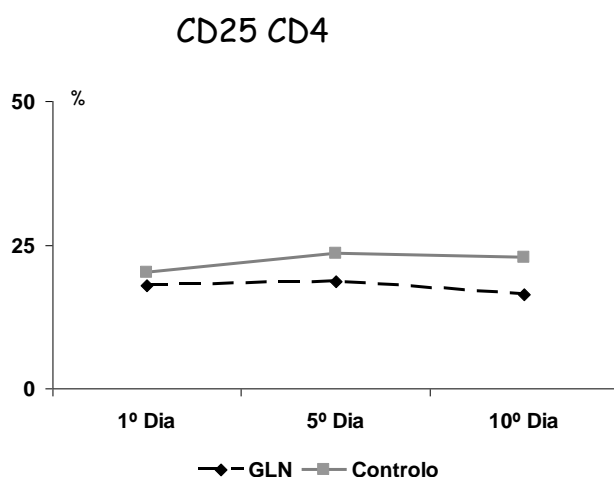


Figura 13. Distribuição dos linfócitos CD25CD4 ao longo do tempo

A expressão TCD4+ CD25+ caracteriza a população de células T reguladoras, produtoras de TGF- β e IL-10, com importante papel na redução do número e da activação de células linfocitárias

Há uma diferença significativa na percentagem de linfócitos TCD4+ que expressam CD25+ entre os grupos de estudo, com aumento deste tipo de células no grupo controlo face ao grupo glutamina. Esta diferença assume logo

ao 5º dia uma tendência estatística favorecedora do grupo controlo (18,6% [15,4-20,7] vs 23,5% [15-29] p=0,08) que persiste ao 10º dia de suporte nutricional (16,3% [10,9-24,5] vs 22,8% [17,7-31,2]; p=0,09).

Tabela XXX. LINFÓCITOS CD4CD25high CD127 (%) - evolução do 1º ao 10º dia. Resultados expressos em medianas e percentis [25-75%]

	TOTAL	GLUTAMINA	CONTROLO	p
Dia 1	4,4 [3,6-5,7]	4,7 [4,1-5,6]	3,8 [2,9-5,8]	0,38
Dia 5	4,5 [3,4-6,3]	4,3 [3,1-5,6]	4,8 [3,6-6,4]	0,23
Dia 10	4,5 [2,9-6,7]	3,3 [2,7-4,6]	5,8 [3,7-8,6]	0,009 *

Análise estatística feita pelo teste U de Mann-Whitney * p < 0,05

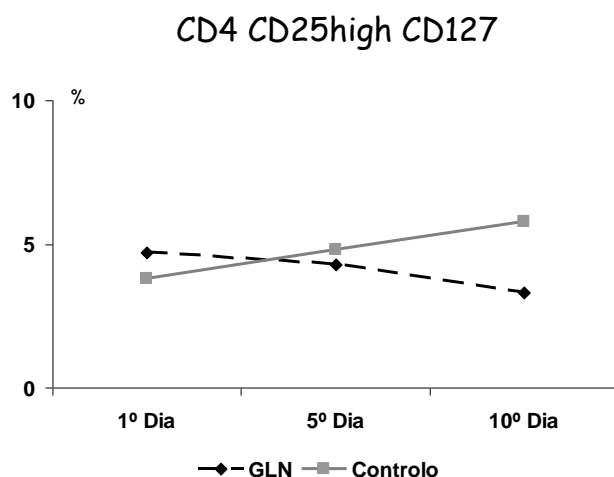


Figura 14. Distribuição dos linfócitos CD4CD25 high CD127 ao longo do tempo

A expressão TCD4 CD25high CD127 caracteriza a população de células T reguladoras com elevada afinidade pelo complexo CD25.

As células Treg FOXP3 suprimem a actividade proliferativa e a resposta mediada por citocinas, das T naife, macrófagos, células dendríticas, NK, NK-T e células B de uma forma Ag inespecífica [50]. O objectivo é claro, limitar a hiperactividade do sistema imunológico característico do SIRS, através da

secreção de citocinas “anti-inflamatórias” e do aumento da apoptose das células de defesa. Contudo quando esta resposta fisiológica é exagerada, há um aumento da susceptibilidade às infecções.

Verificámos existirem diferenças entre os dois grupos, com redução do número de linfócitos T supressores no grupo glutamina e aumento destes no grupo controlo. Tal diferença assume um significado estatístico importante pelo 10º dia após o início do suporte nutricional (5,8% [3,7-8,6] vs 3,3% [2,7-4,6]; $p=0,009$).

Tabela XXXI. LINFÓCITOS CD25CD69 (%) - evolução do 1º ao 10º dia
Resultados expressos em medianas e percentis [25-%75%]

	TOTAL	GLUTAMINA	CONTROLO	p
Dia 1	3,3 [2,2-4,2]	2,4 [1,6-3,4]	3,4 [2,7-4,7]	0,01 *
Dia 5	3,5 [2,5-4,7]	3,4 [2,6-3,9]	3,5 [2,3-4,8]	0,90
Dia 10	4,7 [3,5-5,9]	4,9 [3,6-7,1]	4,7 [2-5,9]	0,18

Análise estatística feita pelo teste U de Mann-Whitney * $p < 0,05$

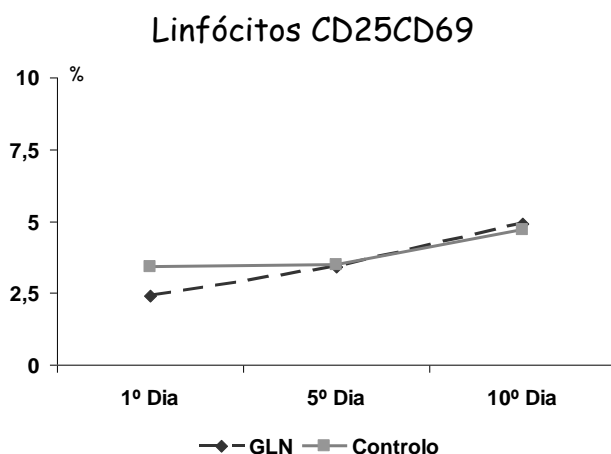


Figura 15. Distribuição dos linfócitos CD25CD69 ao longo do tempo

Verificamos que o grupo glutamina tinha inicialmente uma redução dos valores de expressão CD25CD69, comparativamente ao grupo controlo, tendo esta diferença um significado estatístico importante (2,4% [1,6-3,4] vs 3,4% [2,7-4,7]; $p=0,01$). Essa diferença entre os dois grupos foi perdendo significância, à medida que decorria o tempo de estudo.

Após o início do suporte nutricional parentérico, o grupo glutamina foi aumentando gradualmente a expressão linfocitária CD25CD69, assumindo este aumento um significado estatístico entre o 1º e 10º dia de tratamento ($p < 0,05$).

No grupo controlo, embora registássemos uma diferença entre o início e o fim do período de estudo, esta não assume qualquer significado estatístico ($p=0,54$).

Esta dupla expressão CD25CD69, traduz um sinal positivo para activação e proliferação linfocitária T.

Tabela XXXII. LINFÓCITOS CD25CD127 (%) - evolução do 1º ao 10º dia
 Resultados expressos em medianas e percentis [25-%75%]

	TOTAL	GLUTAMINA	CONTROLO	p
Dia 1	14 [11-19]	15 [10-21]	14 [13-19]	0,81
Dia 5	16 [11-21]	14 [9-19]	18 [15-22]	0,07 *
Dia 10	18 [13-25]	13 [10-19]	21 [14-28]	0,007 *

Análise estatística feita pelo teste U de Mann-Whitney * p < 0,05

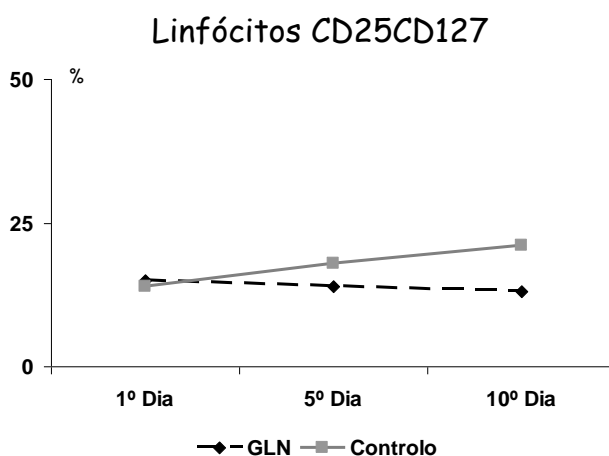


Figura 16. Distribuição dos linfócitos CD25CD127 ao longo do tempo

A expressão CD25 CD127 à superfície dos linfócitos caracteriza um sub-grupo das células T reguladoras.

Verificamos um aumento da percentagem destas células no grupo controlo, comparativamente ao grupo glutamina, com expressão significativa logo ao 5º dia após o início do suporte nutricional (18% [15-22] vs 14% [9-19]; p=0,07), acentuando essa diferença no fim do período de estudo (13% [10-19] vs 21% [14-28]; p=0,007).

Tabela XXXIII. Células Dendríticas (%) - evolução do 1º ao 10º dia

Resultados expressos em medianas e percentis [25%-75%]

	TOTAL	GLUTAMINA	CONTROLO	p
Dia 1	2 [1,2-3,8]	2 [1,2-4,9]	2 [1,2-3,1]	0,52
Dia 5	2,6 [1,4-5,2]	2,7 [1,3-5,3]	2,6 [1,5-4,9]	0,67
Dia 10	2,5 [1,2-5,4]	3,1 [1,6-5,8]	1,9 [1,1-4,8]	0,11

Análise estatística feita pelo teste U de Mann-Whitney * p < 0,05

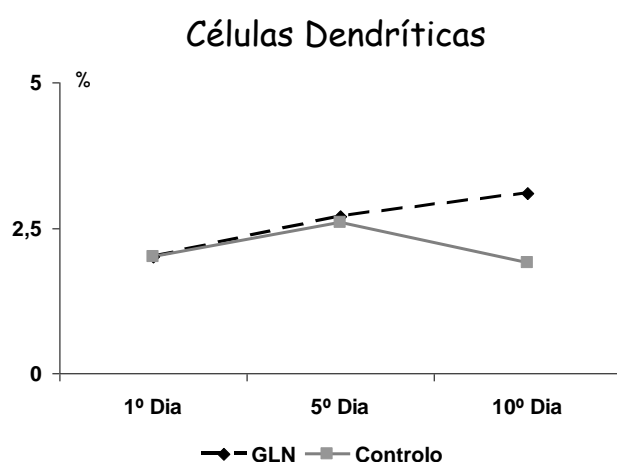


Figura 17. Distribuição das células dendríticas ao longo do tempo

As células dendríticas têm um papel primordial na coordenação entre a imunidade inata e a celular, necessária para um correcto funcionamento da resposta à agressão durante um processo inflamatório.

Entre os dois grupos do estudo, não existem diferenças no valor basal de células dendríticas circulantes (2% [1,2-4,9] vs 2% [1,2-3,1]; p= 0,52). Mas, à medida que o estudo decorre, observamos um aumento gradual do seu número no grupo glutamina e uma manutenção do valor inicial no grupo controlo. Esta diferença atinge uma tendência estatística pelo 10º dia de terapêutica, com benefício do grupo glutamina sobre o controlo (3,1% [1,6-5,8] vs 1,9% [1,1-4,8] p=0,11).

Tabela XXXIV. HLA DR (%) - evolução do 1º ao 10º dia

Resultados expressos em medianas e percentis [25-%75%]

	TOTAL	GLUTAMINA	CONTROLO	p
Dia 1	23,9 [18-28,3]	23,7 [17,8-27]	24,7 [18,3-32]	0,25
Dia 5	21,7 [15-29,8]	22,4 [16,5-26,5]	18,1 [14-29,3]	0,42
Dia 10	21,5 [16,4-29,5]	23,1 [17,1-28,3]	17,6 [13,7-28,2]	0,12

Análise estatística feita pelo teste U de Mann-Whitney * p < 0,05

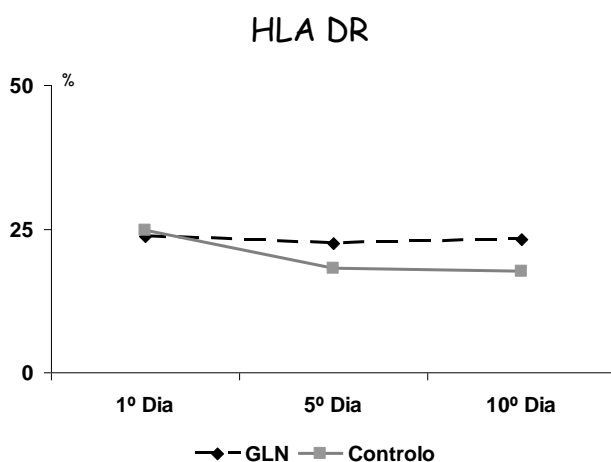


Figura 18. Distribuição dos linfócitos HLADR ao longo do tempo

A expressão HLA DR à superfície das células apresentadoras de antígeno (macrófagos, células dendríticas, células B e também nos linfócitos T activados e nas células NK activadas) é necessária para o reconhecimento e activação dos linfócitos T helper, tendo por isso um papel fundamental na resposta imune específica à infecção [455-458].

O valor basal da expressão HLA DR à superfície dos linfócitos é semelhante em ambos os grupos não havendo diferença estatística entre eles (23,7 [17,8-27] vs 24,7 [18,3-32] p=0,25). Este valor é significativamente inferior ao valor basal da população normal, traduzindo uma incapacidade de estimulação linfocitária característica dos estados de imunodepressão existente em doentes críticos.

Mas, à medida que o estudo decorre, verificamos uma manutenção dessa expressão no grupo glutamina e uma discreta diminuição no grupo controlo, assumindo ao 10º dia uma tendência estatística ($p=0,12$) que favorece o grupo glutamina.

Tabela XXXV. LINFÓCITOS HLADR CD3 (%) - evolução do 1º ao 10º dia
Resultados expressos em medianas e percentis [25-75%]

	TOTAL	GLUTAMINA	CONTROLO	p
Dia 1	9,7 [6,3-15]	9,3 [5,1-18,9]	10,4 [7,1-14,2]	0,69
Dia 5	10 [5,8-15,7]	9,4 [5,3-21,2]	10,1 [6,3-14,6]	0,96
Dia 10	12,4 [7-21,7]	19,1 [8,5-32,8]	10,3 [6-14,7]	0,003 *

Análise estatística feita pelo teste U de Mann-Whitney * $p < 0,05$

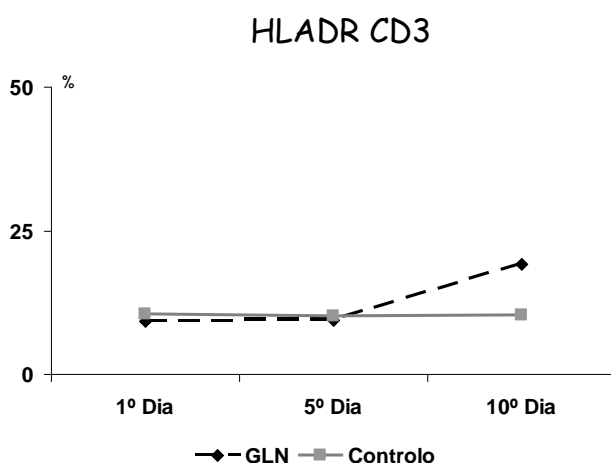


Figura 19. Distribuição dos linfócitos HLADR CD3 ao longo do tempo

A dupla marcação celular positiva para HLA DR CD3+ traduz a apresentação antigénica à população de células T, reflectindo a sua activação tardia.

Ao 10º dia, registámos um aumento significativo de HLA DR CD3+ no grupo glutamina (19,1% [8,5-32,8] vs 10,3% [6-14,7; $p=0,003$), comparativamente ao grupo controlo.

Tabela XXXVI. LINFÓCITOS HLADR CD25 CD3 (%) - evolução do 1º ao 10º dia. Resultados expressos em medianas e percentis [25-%75%]

	TOTAL	GLUTAMINA	CONTROLO	p
Dia 1	2,5 [1,4-4,8]	2,5 [1,2-4]	2,5 [1,4-5,8]	0,92
Dia 5	2,6 [1,3-5,5]	2,8 [1,2-5,7]	2,6 [1,5-5,3]	0,87
Dia 10	3,1 [1,8-5]	3,4 [1,9-5,5]	3,1 [1,6-5]	0,48

Análise estatística feita pelo teste U de Mann-Whitney * p < 0,05

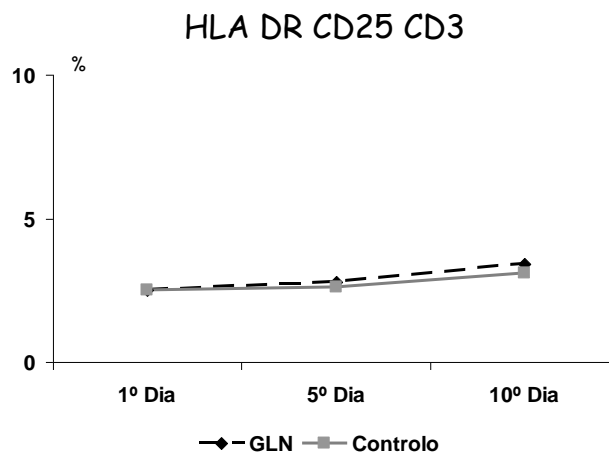


Figura 20. Distribuição dos linfócitos HLADRCD25CD3 ao longo do tempo

Marcador de apresentação antigénica e de activação de células linfocitárias T. Não houve diferenças significativas entre os grupos em estudo.

Tabela XXXVII. LINFÓCITOS HLADR CD69 CD3 (%) - evolução do 1º ao 10º dia. Resultados expressos em medianas e percentis [25-75%]

	TOTAL	GLUTAMINA	CONTROLO	p
Dia 1	1,7 [0,5-2,5]	1,7 [0,5-2,7]	1,6 [0,6-2,5]	0,83
Dia 5	1,5 [0,7-2,4]	1,6 [0,7-2,4]	1,5 [0,7-2,7]	0,86
Dia 10	1,4 [0,9-3,1]	1,4 [0,6-3,1]	1,4 [0,9-3]	0,78

Análise estatística feita pelo teste U de Mann-Whitney * p < 0,05

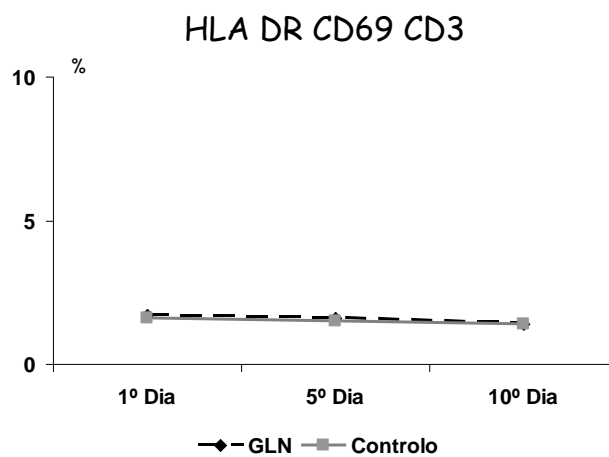


Figura 21. Distribuição dos linfócitos HLADRCD69CD3 ao longo do tempo

Marcador de apresentação antigénica e de activação precoce de células linfocitárias T.

Não houve diferenças significativas entre os grupos em estudo.

Tabela XXXVIII. LINFÓCITOS HLADR Lys CD95 (%) - evolução do 1º ao 10º dia. Resultados expressos em medianas e percentis [25-%75%]

	TOTAL	GLUTAMINA	CONTROLO	p
Dia 1	1,4 [0,7-3,4]	1,8 [0,8-2,5]	1,6 [0,6-2,5]	0,72
Dia 5	1,9 [1,1-4,8]	1,6 [0,7-2,4]	1,5 [0,7-2,7]	0,69
Dia 10	3,1 [1,2-6,6]	1,4 [0,6-3,1]	1,4 [0,9-3]	0,40

Análise estatística feita pelo teste U de Mann-Whitney * p < 0,05

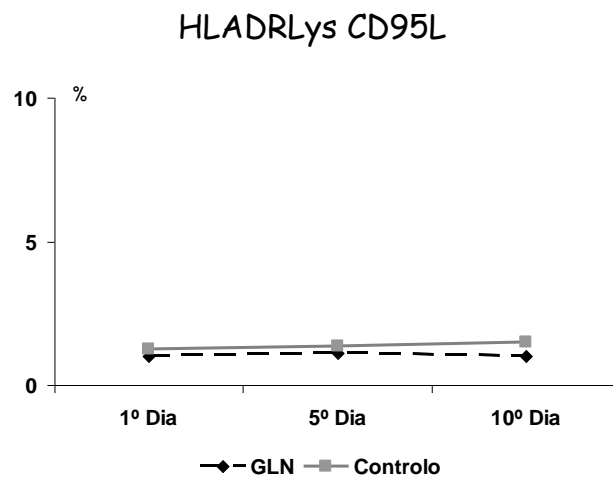


Figura 22. Distribuição dos linfócitos HLADRLysCD95 ao longo do tempo

Não existem diferenças entre os dois grupos ao longo do tempo do estudo.

Tabela XXXIX. LINFÓCITOS HLADRLysCD95L (%) - evolução do 1º ao 10º dia. Resultados expressos em medianas e percentis [25-%75%]

	TOTAL	GLUTAMINA	CONTROLO	p
Dia 1	1,1 [0,7-2]	1 [0,7-1,5]	1,2 [0,7-2,9]	0,29
Dia 5	1,2 [0,6-2,1]	1,1 [0,9-2]	1,3 [0,5-2,6]	0,36
Dia 10	1,2 [0,4-2]	1 [0,4-1,6]	1,5 [0,4-3,2]	0,11

Análise estatística feita pelo teste U de Mann-Whitney * p < 0,05

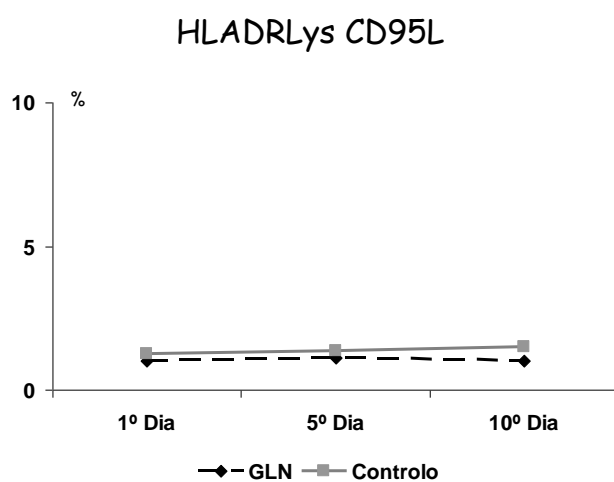


Figura 23. Distribuição dos linfócitos HLADRLysCD95L ao longo do tempo

Não existem diferenças entre os grupos na expressão HLADRLys CD95L à superfície das células linfocitárias.

Tabela XL. HLADR (CD14) CD95L (%) - evolução do 1º ao 10º dia

Resultados expressos em medianas e percentis [25-%75%]

	TOTAL	GLUTAMINA	CONTROLO	p
Dia 1	3,5 [2,1-6,6]	3,3 [2,1-6,2]	3,6 [2-6,8]	0,63
Dia 5	4,2 [2,4-6,6]	3,8 [2,2-6,6]	4,3 [2,9-6,6]	0,45
Dia 10	5,4 [2,6-8,4]	3,9 [2,1-7,5]	6,3 [4,2-8,9]	0,02 *

Análise estatística feita pelo teste U de Mann-Whitney * p < 0,05

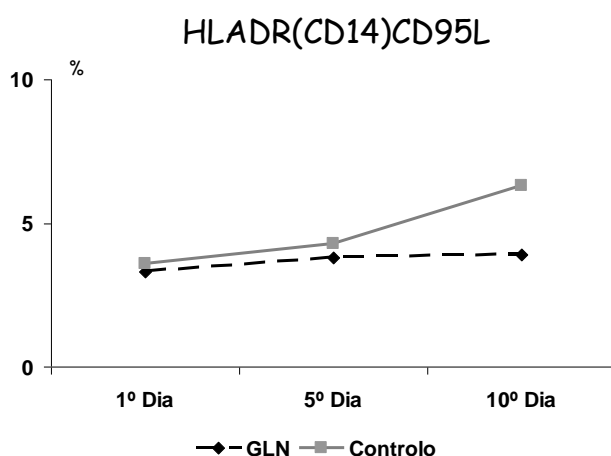


Figura 24. Distribuição dos HLADR(CD14)CD95L ao longo do tempo

A percentagem de monócitos activados com marcação para CD95L era idêntica no início em ambos os grupos.

Durante o período de estudo, o grupo glutamina manteve estes valores enquanto o grupo controlo registou uma elevação gradual ao longo do tempo, assumindo um significado estatístico importante pelo 10º dia (3,9% [2,1-7,5] vs 6,3% [4,2-8,9]; p=0,02).

Isto traduz o aumento da apoptose de monócitos activados no grupo controlo com consequente diminuição no número de monócitos HLA DR.

Tabela XLI. CD14 (%) - evolução do 1º ao 10º dia.

Resultados expressos em medianas e percentis [25%-75%]

	TOTAL	GLUTAMINA	CONTROLO	p
Dia 1	5,3 [3,2-6,9]	4,9 [2,7-6,6]	5,5 [4,2-7]	0,13
Dia 5	5,5 [3,6-7,1]	5,7 [3,5-7,4]	5,1 [3,6-6,9]	0,43
Dia 10	6,4 [2,4-9,5]	7,4 [4,4-11,2]	4,7 [1,9-7,1]	0,01 *

Análise estatística feita pelo teste U de Mann-Whitney * p < 0,05

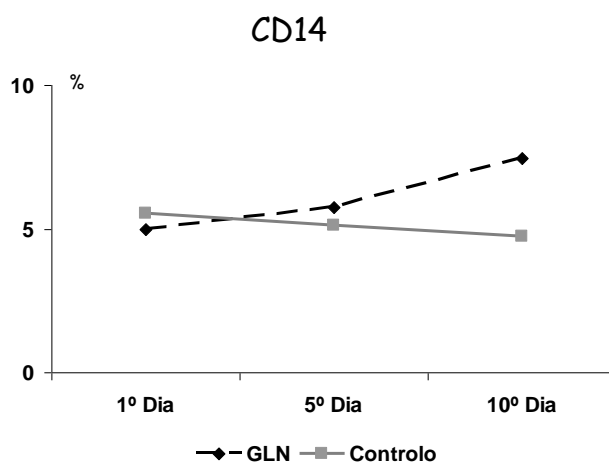


Figura 25. Distribuição dos CD14 ao longo do tempo

Marcador da superfície de monócitos que se correlaciona com o grau de maturação e actividade destes.

Os monócitos circulantes podem desde que tenham estímulo apropriado, migrarem para os locais de inflamação e diferenciarem-se como células apresentadoras de antígenos, ou em alternativa colonizarem diversos órgãos aí funcionando como macrófagos residentes.

Verificámos que enquanto no grupo glutamina houve um aumento gradual no número de monócitos, no grupo controlo houve uma redução, atingindo ao 10º dia uma diferença estatisticamente significativa (7,4% [4,4-11,2] vs 4,7% [1,9-7,1]; p=0,01).

Tabela XLII. CD14 HLADR (%) - evolução do 1º ao 10º dias (medianas)

Resultados expressos em medianas e percentis [25-%75%]

	TOTAL	GLUTAMINA	CONTROLO	p
Dia 1	32,8 [25,6-51,6]	29 [23,1-46,7]	37 [27-62]	0,11
Dia 5	37,5 [27-54,5]	39 [27,5-57,4]	34 [24,7-53]	0,28
Dia 10	36,2 [24,4-58,3]	54 [33,4-81,6]	26 [17-41]	0,001 *

Análise estatística feita pelo teste U de Mann-Whitney * p < 0,05

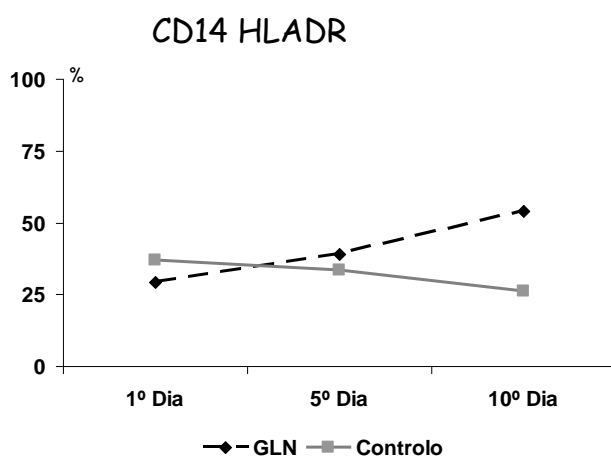


Figura 26. Distribuição dos CD14 HLADR ao longo do tempo

Como já atrás referimos, a expressão HLA DR à superfície dos monócitos é um elo de ligação entre a imunidade inata e a celular através da activação das células T, necessária para garantir uma plena resposta imunitária.

A expressão HLA DR à superfície dos monócitos (CD14) ao 10º dia após o início do suporte nutricional, é significativamente superior no grupo glutamina comparativamente ao controlo. De salientar ainda neste grupo, a recuperação funcional dos monócitos entre o 1º e o 10º dia, praticamente duplicando o seu valor inicial.

Tabela XLIII. CD14 CD95 (%) - evolução do 1º ao 10º dias (medianas)

Resultados expressos em medianas e percentis [25-%75%]

	TOTAL	GLUTAMINA	CONTROLO	p
Dia 1	97,9 [93,4-99,1]	98,2 [93,5-98,9]	96,6 [92-99,5]	0,51
Dia 5	97,2 [94-98,7]	98,1 [88,2-99,3]	96,1 [94,3-98]	0,45
Dia 10	97 [89-99]	97,3 [91,3-98,9]	95 [88-99,2]	0,52

Análise estatística feita pelo teste U de Mann-Whitney * p < 0,05

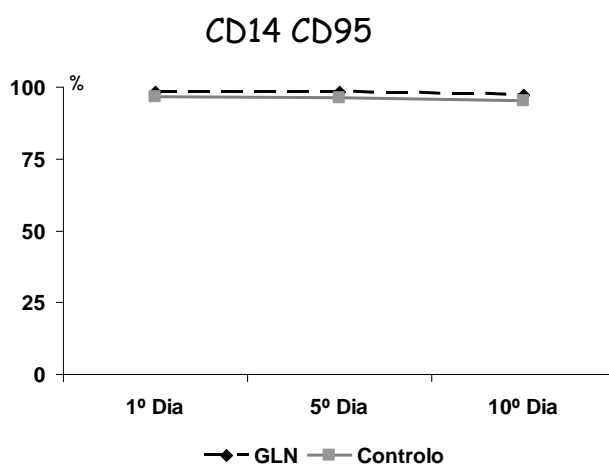


Figura 27. Distribuição dos CD14CD95 ao longo do tempo

A expressão CD95 (marcação para apoptose) à superfície dos monócitos é elevada em ambos os grupos, sem diferenças significativas entre eles ao longo do período de estudo.

Tabela XLIV. CD14 CD95L (%) - evolução do 1º ao 10º dias (medianas)

Resultados expressos em medianas e percentis [25-%75%]

	TOTAL	GLUTAMINA	CONTROLO	p
Dia 1	4,4 [2,9-8,4]	4,4 [2,5-6,7]	4,4 [3,1-9,2]	0,69
Dia 5	5,1 [3-10]	4,3 [2,4-9,5]	5,8 [3,5-10,2]	0,13
Dia 10	7 [3,5-10,8]	4,1 [2,7-8,6]	9,2 [4,5-12,3]	0,002 *

Análise estatística feita pelo teste U de Mann-Whitney * p < 0,05

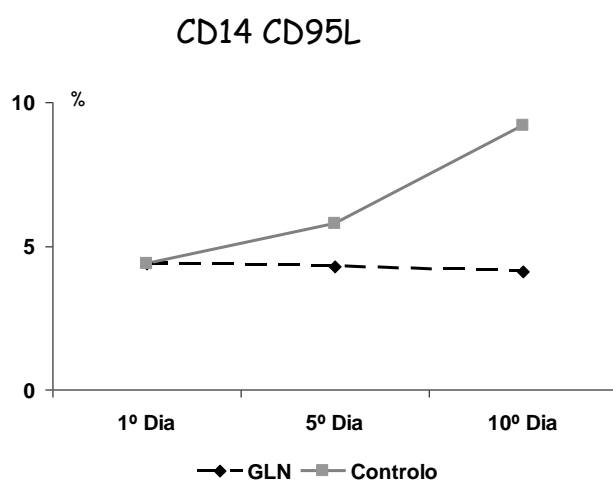


Figura 28. Distribuição dos CD14CD95L ao longo do tempo

A expressão CD95L à superfície dos monócitos, traduz activação apoptótica.

A percentagem de células monocíticas em apoptose é significativamente superior no grupo controlo comparativamente ao grupo glutamina. Esta acção foi-se estabelecendo gradualmente ao longo do tempo, como uma tendência inicialmente ao 5º dia (5,8 [3,5-10,2] vs 4,3 [2,4-9,5]; p= 0,13), para ao 10º dia apresentar um significado estatístico importante (9,2 [4,5-12,3] vs 4,1 [2,7-8,6]; p=0,002).

Este aumento da apoptose no grupo controlo será responsável pela redução significativa do número de monócitos circulantes, constituindo uma marca da imunodepressão (CARS) que se segue à resposta inflamatória (SIRS) que acompanha uma agressão, característica desta população de doentes críticos.

Tabela XLV. LINFÓCITOS CD45RA (%) - evolução do 1º ao 10º dia.

Resultados expressos em medianas e percentis [25%-75%]

	TOTAL	GLUTAMINA	CONTROLO	p
Dia 1	50 [39,4-58,9]	53,7 [40,1-59,2]	48,5 [37,8-58,6]	0,62
Dia 5	46,7 [37,1-57]	53,9 [38,9-59,7]	44,8 [33,9-52,9]	0,05 *
Dia 10	46,3 [35,4-55,9]	58,6 [36,9-58,5]	44,5 [34,1-53,3]	0,05 *

Análise estatística feita pelo teste U de Mann-Whitney * p < 0,05

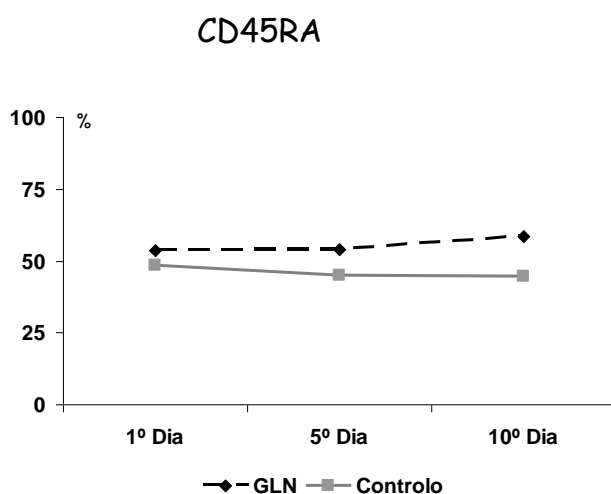


Figura 29. Distribuição dos linfócitos CD45RA ao longo do tempo

A expressão CD45RA identifica uma população de células T naife.

Existe uma redução global do número de células T naife, face aos valores habituais em indivíduos saudáveis, levando-nos a pensar ser este um dos sinais tradutores da depressão imunitária em que os nossos doentes se encontram.

Há uma diferença entre os grupos, enquanto no grupo glutamina a expressão CD45 à superfície dos linfócitos T foi subindo gradualmente ao longo do estudo, no grupo controlo houve uma descida. Estas diferenças assumem um significado estatístico importante logo ao 5º dia (53,9% [38,9-59,7] vs 44,8% [33,9-52,9] p= 0,05), que se mantêm ao 10º dia depois da intervenção terapêutica (58,6% [36,9-58,5] vs 44,5% [34,1-53,3] p=0,05).

Tabela XLVI. LINFÓCITOS CD45RA CD3 (%) - evolução do 1º ao 10º dia
 Resultados expressos em medianas e percentis [25-%75%]

	TOTAL	GLUTAMINA	CONTROLO	p
Dia 1	26 [19,1-35,2]	24,5 [18,2-34,6]	26,4 [19,7-36,4]	0,83
Dia 5	29,3 [19,8-35,8]	30,5 [23-35,8]	28,5 [14,2-36,3]	0,32
Dia 10	27,6 [19,2-40]	33,5 [21,2-40,2]	23,3 [15-38,7]	0,02 *

Análise estatística feita pelo teste U de Mann-Whitney * p < 0,05

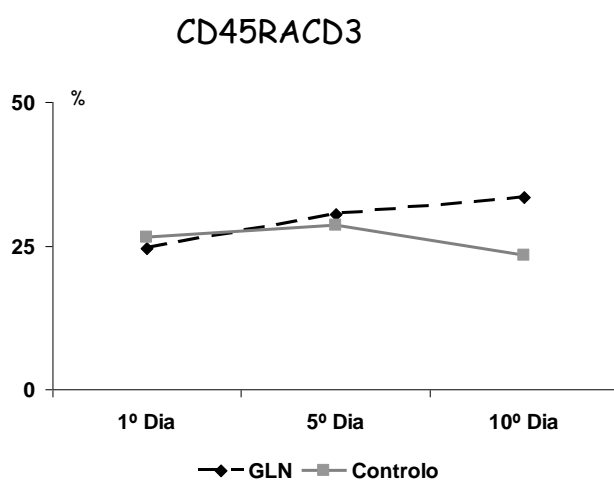


Figura 30. Distribuição dos linfócitos CD45RACD3 ao longo do tempo

Quando analisamos a dupla marcação da expressão CD45RACD3, verificamos uma diferença entre os dois grupos do estudo que adquire um significado estatístico importante pelo 10º dia com um aumento beneficiando o grupo glutamina face ao controlo (33,5% [21,2-40,2] vs 23,3% [15-38,7]; p=0,02).

Tabela XLVII. LINFÓCITOS CD45RA CD4 (%) - evolução do 1º ao 10º dia

Resultados expressos em medianas e percentis [25-%75%]

	TOTAL	GLUTAMINA	CONTROLO	p
Dia 1	16,4 [9,3-22,2]	16,4 [16,7-22,8]	16,4 [8,4-21]	0,76
Dia 5	17,4 [12-21,4]	14,5 [11-21,3]	17,7 [12-21,8]	0,87
Dia 10	15 [10,7-18,9]	15,8 [10,7-19,3]	14,2 [10,6-19,6]	0,58

Análise estatística feita pelo teste U de Mann-Whitney * p < 0,05

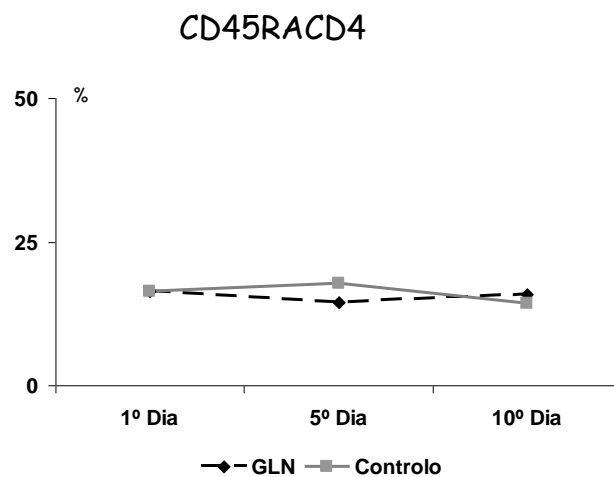


Figura 31. Distribuição dos linfócitos CD45RACD4 ao longo do tempo

Para a dupla expressão CD45RA CD4 não existem diferenças entre os grupos.

Tabela XLVIII. LINFÓCITOS CD45RACD25CD3 (%) - evolução do 1º ao 10º dia. Resultados expressos em medianas e percentis [25-%75%]

	TOTAL	GLUTAMINA	CONTROLO	p
Dia 1	4,9 [3-8,5]	4,6 [2,9-7,8]	6,3 [3,2-8,7]	0,67
Dia 5	5,4 [2,5-8]	5,1 [2,6-6,7]	7 [2,2-9,2]	0,41
Dia 10	5,2 [2,5-7,9]	5,2 [2,6-8,2]	5,2 [2,1-7,6]	0,63

Análise estatística feita pelo teste U de Mann-Whitney * p < 0,05

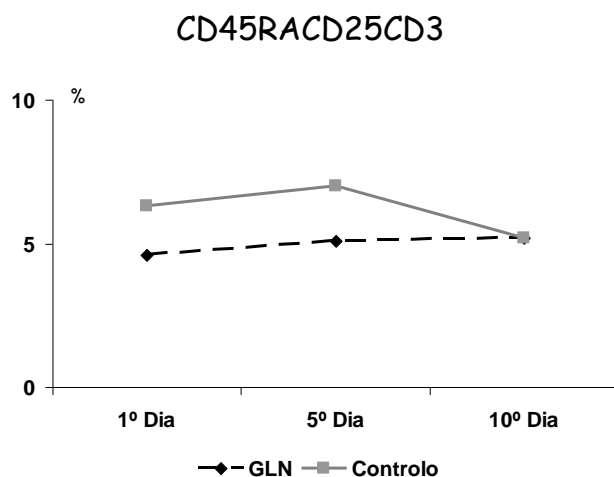


Figura 32. Distribuição dos linfócitos CD45RACD25CD3 ao longo do tempo

A população CD45RACD25CD3, traduz a activação das células T naife.

Há uma diferença entre os grupos que embora não apresente um significado estatístico, nos parece relevante atendendo à tendência diferente entre eles.

Assim, enquanto no grupo glutamina verificamos um aumento gradual do 1º para o 10º dia do estudo (de 4,6% [2,9-7,8] para 5,2% [2,6-8,2]), no grupo controlo registamos o inverso com redução daquela expressão ao longo do tempo (de 6,3 [3,2-8,7] para 5,2 [2,1-7,6]).

Tabela XLIX. LINFÓCITOS CD127CD4 (%) - evolução do 1º ao 10º dia
 Resultados expressos em medianas e percentis [25-%75%]

	TOTAL	GLUTAMINA	CONTROLO	p
Dia 1	31,8 [22,7-40]	30,1 [24,4-39,1]	32,6 [20,1-40]	0,97
Dia 5	30,8 [24-37,8]	29,9 [25,4-37,7]	31 [21,6-37,8]	0,75
Dia 10	31,7 [22,6-40,3]	34,8 [23,4-39,5]	27,6 [19,5-42,1]	0,47

Análise estatística feita pelo teste U de Mann-Whitney * p < 0,05

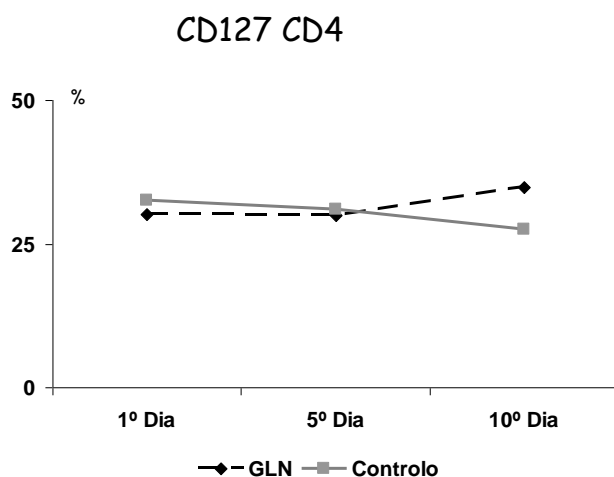


Figura 33. Distribuição dos linfócitos CD127CD4 ao longo do tempo

Verificámos no grupo controlo, entre o primeiro e o 10º dia do estudo, uma redução da expressão CD127 CD4 à superfície das células linfocitárias, enquanto no grupo glutamina havia um discreto aumento no mesmo período de tempo.

Apesar disso, não havia uma diferença estatística entre os dois grupos.

Tabela L. CD95HLADR CD14 (%) - evolução do 1º ao 10º dia.

Resultados expressos em medianas e percentis [25-%75%]

	TOTAL	GLUTAMINA	CONTROLO	p
Dia 1	27,2 [23,4-49,5]	26,5 [23,9-48,2]	27,3 [22,1-51,7]	0,95
Dia 5	31,2 [21,9-50,4]	33,9 [22,5-49,7]	31,2 [21,4-51,1]	1
Dia 10	32,2 [23,4-43,2]	34,1 [28,7-48,9]	30 [18-43,2]	0,31

Análise estatística feita pelo teste U de Mann-Whitney * p < 0,05

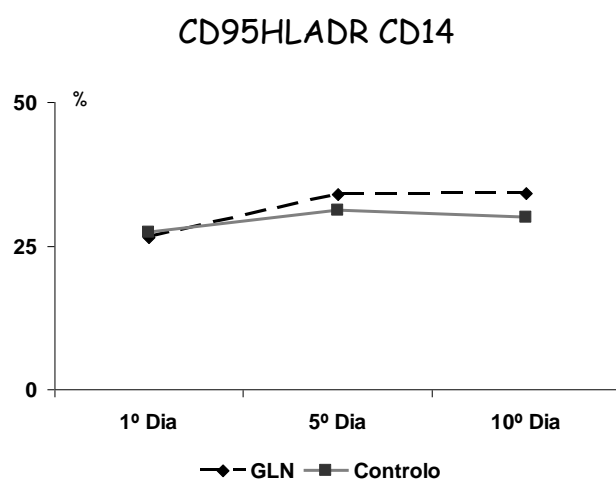


Figura 34. Distribuição dos linfócitos CD95HLADRCD14 ao longo do tempo

Na marcação antigénio Fas (CD95) à superfície dos monócitos activados, verificamos uma discreta subida em ambos os grupos sem diferenças significativas entre eles.

Tabela LI. LINFÓCITOS CD95CD95L (%) - evolução do 1º ao 10º dia

Resultados expressos em medianas e percentis [25%-75%]

	TOTAL	GLUTAMINA	CONTROLO	p
Dia 1	0,4 [0-0,9]	0,4 [0-1]	0,4 [0,2-0,9]	0,72
Dia 5	0,4 [0,2-1,3]	0,5 [0,2-0,9]	0,3 [0,1-1,7]	0,83
Dia 10	0,5 [0,2-2,1]	0,3 [0,1-0,8]	0,7 [0,2-2,6]	0,07

Análise estatística feita pelo teste U de Mann-Whitney * p < 0,05

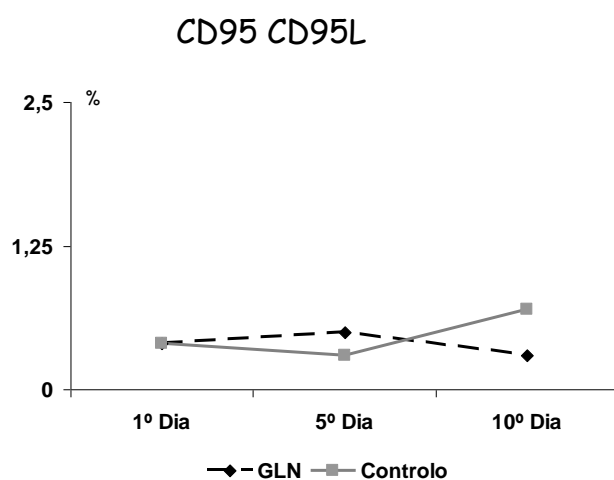


Figura 35. Distribuição dos linfócitos CD95CD95L ao longo do tempo

Na expressão de activação do marcador apoptótico Fas pelo seu ligante à superfície das células linfocitárias, verificamos que enquanto o grupo glutamina regista uma tendência para a diminuir, no grupo controlo pelo contrário a tendência é para o seu aumento ao longo do tempo, assumindo ao 10º dia uma diferença com significado estatístico entre os dois grupos (0,3% [0,1-0,8] vs 0,7% [0,2-2,6] p=0,07).

Tabela LII. LINFÓCITOS CD69 (%) - evolução do 1º ao 10º dia.

Resultados expressos em medianas e percentis [25-%75%]

	TOTAL	GLUTAMINA	CONTROLO	p
Dia 1	19,3 [13,3-25,2]	18,7 [11,9-26,2]	20,3 [15,1-24,7]	0,88
Dia 5	18,2 [12,6-26,5]	18 [14,4-25,2]	18,3 [11,2-26,7]	0,40
Dia 10	19,6 [13,8-25,3]	21,7 [16,5-22,3]	17,5 [11,2-25,5]	0,10

Análise estatística feita pelo teste U de Mann-Whitney * p < 0,05

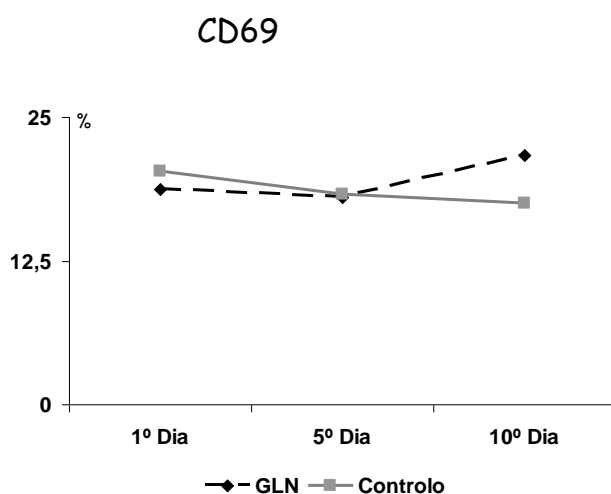


Figura 36. Distribuição dos linfócitos CD69 ao longo do tempo

A expressão CD69 à superfície das células linfocitárias identifica o potencial de activação precoce destas células.

Existem diferenças entre os dois grupos do estudo. Enquanto no grupo glutamina há um aumento ao longo do tempo, no grupo controlo há uma manutenção dos valores iniciais. Estas diferenças com benefício para a glutamina, assumem-se como uma tendência ao 10º dia (21,7% [16,5-22,3] vs 17,5% [11,2-25,5])% p =0,10) após o início da intervenção.

O aumento da expressão CD69 no grupo glutamina parece traduzir de igual forma a maior capacidade destes linfócitos em serem activados precocemente comparativamente ao grupo controlo.

Tabela LIII. LINFÓCITOS CD69CD3 (%) - evolução do 1º ao 10º dia.

Resultados expressos em medianas e percentis [25-%75%]

	TOTAL	GLUTAMINA	CONTROLO	p
Dia 1	7,6 [4,7-10,4]	7,6 [4,6-10,5]	7,4 [4,7-10,2]	0,92
Dia 5	8,2 [4,9-10,9]	8,9 [5,6-11]	8,1 [3,8-10,4]	0,40
Dia 10	7,6 [4,4-11,6]	8,6 [6-12,6]	6,7 [3,9-10,3]	0,09

Análise estatística feita pelo teste U de Mann-Whitney * p < 0,05

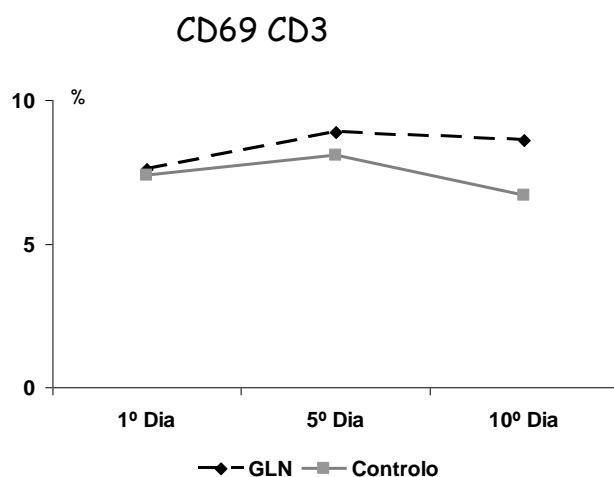


Figura 37. Distribuição dos linfócitos CD69CD3 ao longo do tempo

Para a dupla expressão CD69CD3, tradutora da activação precoce de timócitos, verificamos que entre o 1º e o 10º dia do estudo, houve um discreto aumento no grupo glutamina e, uma redução no grupo controlo. Esta diferença entre grupos, assume um significado estatístico ao 10º dia com benefício do grupo glutamina face ao controlo (8,6% [6-12,6] vs 6,7% [3,9-10,3]; p=0,09).

Tabela LIV. LINFÓCITOS CD69CD4 (%) - evolução do 1º ao 10º dias (medianas)

	TOTAL	GLUTAMINA	CONTROLO	p
Dia 1	4,3 [2,9-6]	4,5 [3,4-6]	4,3 [1,6-6]	0,27
Dia 5	4,6 [3,2-5,8]	4,2 [2,7-6,3]	4,7 [3,4-5,4]	0,92
Dia 10	4,7 [3-7,5]	5,7 [3,5-8]	3,2 [2,1-6,9]	0,04 *

Análise estatística feita pelo teste U de Mann-Whitney * p < 0,05

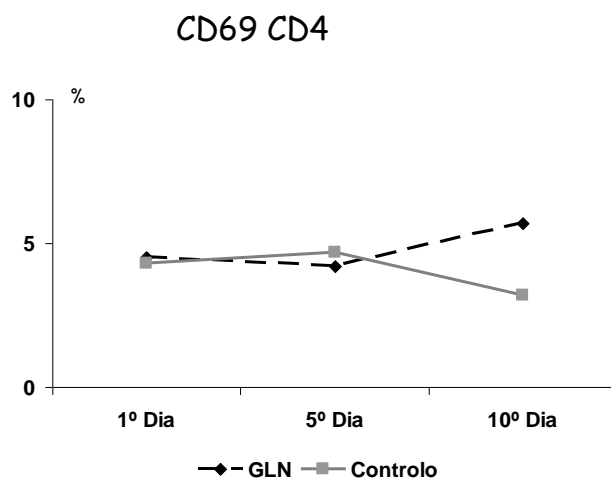


Figura 38. Distribuição dos linfócitos CD69CD4 ao longo do tempo

A expressão CD69CD4, traduz potencial de activação para os linfócitos TCD4. Enquanto no grupo glutamina registámos uma subida gradual ao longo do estudo, no grupo controlo verificávamos uma descida ao longo do tempo. Esta diferença assumia um significado estatístico entre os dois grupos, com benefício para o grupo glutamina ao 10º dia do estudo.

Tabela LV. LINFÓCITOS CD28 (%) - evolução do 1º ao 10º dia.

Resultados expressos em medianas e percentis [25-%75%]

	TOTAL	GLUTAMINA	CONTROLO	p
Dia 1	44,8 [23,7-56,1]	45,4 [25,1-57,5]	44,8 [22,2-56,1]	0,77
Dia 5	43,8 [33,3-62,4]	44,4 [40,8-53,5]	42 [21,6-63,7]	0,73
Dia 10	46 [30,7-58,6]	50,7 [41,7-59,8]	36,2 [12-53]	0,04 *

Análise estatística feita pelo teste U de Mann-Whitney * p < 0,05

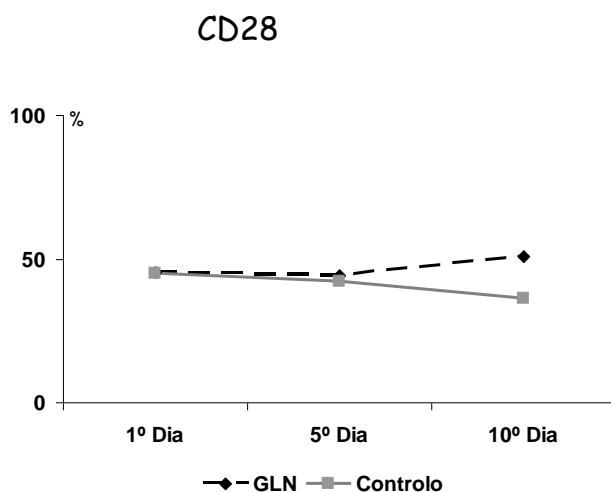


Figura 39. Distribuição dos linfócitos CD28 ao longo do tempo

A expressão CD28 à superfície das células linfocitárias traduz uma capacidade de co-estimulação, através da interacção com os receptores CD80 e CD86 presentes nas células apresentadoras de antígenos, necessária à activação das células T.

No grupo glutamina verificamos ao longo do tempo, um aumento de linfócitos com expressão CD28, enquanto no grupo controlo essa expressão não se modifica. Tal diferença atinge um significado estatisticamente relevante ao 10º dia após o início do suporte nutricional, com benefício para o grupo glutamina face ao controlo.

Tabela LVI. LINFÓCITOS CD28CD8 (%) - evolução do 1º ao 10º dia

Resultados expressos em medianas e percentis [25%-75%]

	TOTAL	GLUTAMINA	CONTROLO	p
Dia 1	11,2 [6,6-16,6]	11,4 [6,4-16,4]	11,2 [7,6-16,6]	0,85
Dia 5	11,2 [7-15,5]	12,4 [8,3-16,8]	9,3 [6-14]	0,08
Dia 10	12,5 [9,4-14,4]	14 [12-17]	9,5 [5,3-13,3]	0,002 *

Análise estatística feita pelo teste U de Mann-Whitney * p < 0,05

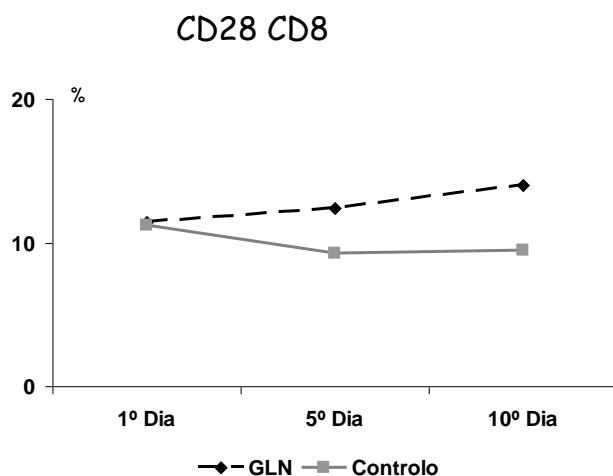


Figura 40. Distribuição dos linfócitos CD28CD8 ao longo do tempo

A dupla expressão CD28CD8, tradutora de um potencial de co-estimulação para os linfócitos T citotóxicos, vai gradualmente aumentando ao longo do tempo no grupo glutamina e reduzindo no grupo controlo.

Esta diferença assume uma tendência de benefício ao 5º dia para o grupo glutamina, que se consolida ao 10º dia, como uma diferença estatisticamente significativa comparativamente ao grupo controlo.

Tabela LVII. LINFÓCITOS CD26 (%) - evolução do 1º ao 10º dia.

Resultados expressos em medianas e percentis [25-%75%]

	TOTAL	GLUTAMINA	CONTROLO	p
Dia 1	27,9 [17,4-33,2]	27,5 [12,4-32]	29,4 [18,1-33,9]	0,35
Dia 5	28,1 [24,2-33,8]	27,8 [23,2-39]	29,2 [24,3-33,6]	0,57
Dia 10	27,4 [20,7-36,8]	34,3 [21-39,1]	26,7 [20,4-34,3]	0,12

Análise estatística feita pelo teste U de Mann-Whitney * p < 0,05

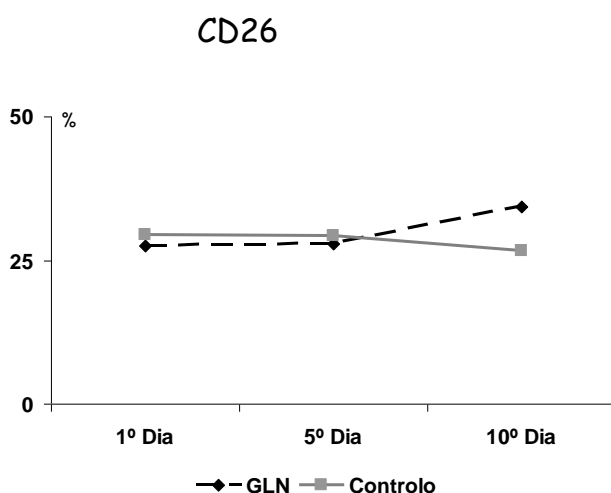


Figura 41. Distribuição dos linfócitos CD26 ao longo do tempo

A expressão CD26 à superfície dos linfócitos é responsável pela activação destes. É para além disso, o receptor funcional do colagénio, o que facilita a chegada de células T activadas aos locais de inflamação.

Verificamos um aumento gradual na expressão CD26 em ambos os grupos, muito embora ela seja mais precoce (desde o 5º dia) e mais importante no grupo glutamina comparativamente ao controlo. Não existem diferenças estatisticamente significativas entre os grupos.

Tabela LVIII. LINFÓCITOS CD26CD28 (%) - evolução do 1º ao 10º dia.

Resultados expressos em medianas e percentis [25-%75%]

	TOTAL	GLUTAMINA	CONTROLO	p
Dia 1	28,1 [19,1-35,5]	26,1 [15,6-34,4]	29,1 [19,6-40,5]	0,26
Dia 5	28,3 [21-34]	25,7 [20,3-32,5]	28,5 [21-42]	0,88
Dia 10	29,9 [21,6-37,4]	32,5 [20,1-36,6]	25,9 [21,6-38,1]	0,49

Análise estatística feita pelo teste U de Mann-Whitney * p < 0,05

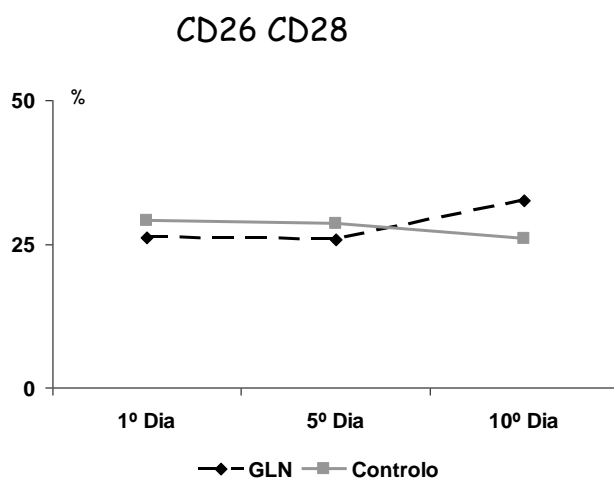


Figura 42. Distribuição dos linfócitos CD26CD28 ao longo do tempo

Ao longo do tempo há um aumento da dupla expressão de activação linfocitária CD26CD28 no grupo glutamina mas não no grupo controlo. Mas, este aumento não é suficiente para atingir significado estatístico ao 10º dia.

Tabela LIX. LINFÓCITOS CD26CD25 (%) - evolução do 1º ao 10º dia.

Resultados expressos em medianas e percentis [25-%75%]

	TOTAL	GLUTAMINA	CONTROLO	p
Dia 1	10,3 [7,3-13,7]	8,7 [7-11,5]	12 [8-14,6]	0,13
Dia 5	11,5 [7,6-14,3]	9,1 [6,8-11,7]	12 [9,7-16,3]	0,04 *
Dia 10	12 [8,5-15,2]	12,1 [8,5-15,6]	12 [8,5-15,2]	0,80

Análise estatística feita pelo teste U de Mann-Whitney * p < 0,05

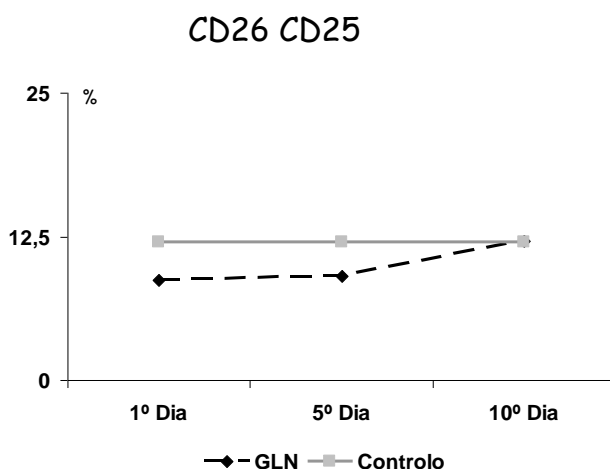


Figura 43. Distribuição dos linfócitos CD26CD25 ao longo do tempo

Nos primeiros dias após a inclusão no estudo há uma diferença entre os grupos, com o grupo glutamina a apresentar um valor significativamente inferior.

Durante o período de avaliação o grupo controlo não modifica o valor da expressão inicial, enquanto no grupo glutamina se regista uma recuperação, atingindo ao 10º dia um valor idêntico ao do grupo controlo. Apesar de em números absolutos esta recuperação ser importante, não é suficiente para ter um grau de significância estatística.

Há assim uma capacidade de recuperação importante induzida pela glutamina sobre os linfócitos T activados por moléculas de co-estimulação e por receptores da IL-2.

Tabela LX. LINFÓCITOS CD56 (%) - evolução do 1º ao 10º dia.

Resultados expressos em medianas e percentis [25-%75%]

	TOTAL	GLUTAMINA	CONTROLO	p
Dia 1	7,8 [4,8-10,8]	8 [4,7-10,1]	7,3 [4,8-11,7]	0,94
Dia 5	7,9 [4-13,4]	8,6 [4,2-15,2]	8,3 [5,3-11,9]	0,87
Dia 10	9,1 [4,3-17,4]	9,5 [4,7-17,2]	7,2 [4,8-11,5]	0,07

Análise estatística feita pelo teste U de Mann-Whitney * p < 0,05

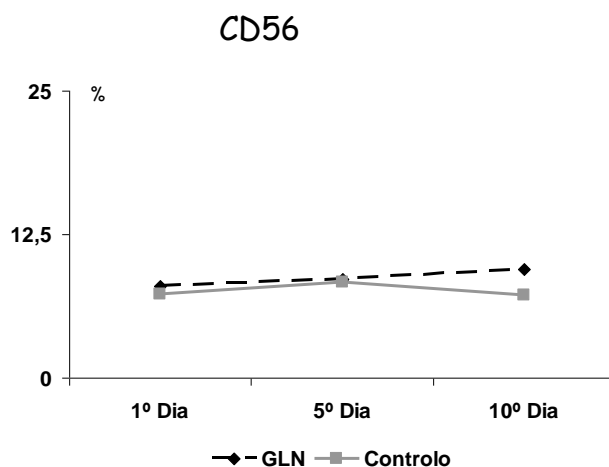


Figura 44. Distribuição dos linfócitos CD56 ao longo do tempo

A expressão CD56 é um marcador de células NK, traduzindo a capacidade citotóxica sobre as células infectadas, independentemente da pré-estimulação e do reconhecimento HLA.

Verificamos neste estudo um aumento da expressão CD56 ao longo do tempo inicialmente (5º dia) em ambos os grupos, mas depois, enquanto o grupo glutamina continua a aumentar, o grupo controlo regride para próximo dos valores iniciais.

Ao 10º dia existem diferenças entre os grupos suficientemente fortes para assumirem uma tendência, muito próxima do significado estatístico.

Tabela LXI. LINFÓCITOS CD56CD3 (%) - evolução do 1º ao 10º dia.

Resultados expressos em medianas e percentis [25-75%]

	TOTAL	GLUTAMINA	CONTROLO	p
Dia 1	3,5 [1,9-8,6]	3,7 [1,6-6,7]	3,3 [2,1-8,6]	0,85
Dia 5	4,9 [2,8-9,3]	4,8 [3,5-8,3]	5,2 [2,3-10,9]	0,81
Dia 10	4,4 [2,6-7,6]	5,8 [2,7-7,8]	4 [1,6-7,5]	0,34

Análise estatística feita pelo teste U de Mann-Whitney * p < 0,05

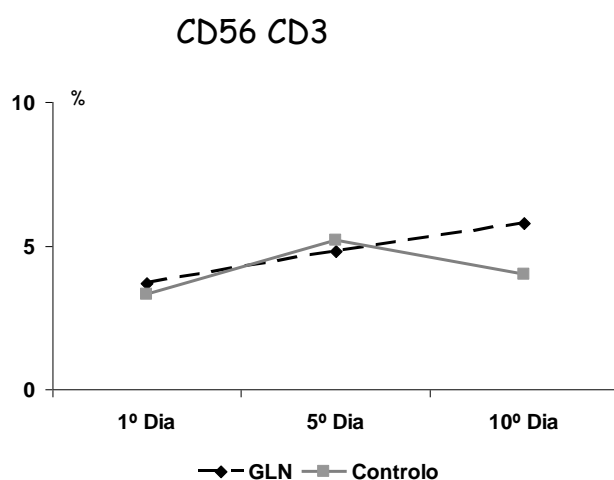


Figura 45. Distribuição dos linfócitos CD56CD3 ao longo do tempo

Estas células são linfócitos T que co-expressam RCT (receptores células T) e marcadores de células NK com uma dupla função na imunidade inata e celular. Assim que são activadas produzem de imediato citoquinas Th1 e Th2 like [459] Estas células foram apelidadas de CIK cells (*citokyne induced killer cells*) com citotoxicidade aumentada sobre células tumorais [460].

Verificamos ao 5º dia do estudo um aumento da dupla expressão CD56 CD3 em ambos os grupos, sem diferenças entre eles. Mas depois, até ao 10º dia, enquanto o grupo glutamina mantêm essa tendência crescente, o grupo controlo reduz essa expressão para próximo dos valores iniciais. A diferença entre os grupos não é suficiente para alcançar grau de significância estatística.

Tabela LXII. LINFÓCITOS CD56CD8 (%) - evolução do 1º ao 10º dia

Resultados expressos em medianas e percentis [25-%75%]

	TOTAL	GLUTAMINA	CONTROLO	P
Dia 1	3,8 [1,5-6,3]	3,9 [1,8-6]	3,5 [1,4-7]	0,69
Dia 5	3,3 [2-5,1]	3,9 [2,3-5,6]	3,1 [1,6-5]	0,13
Dia 10	3,9 [1,9-6,4]	4,6 [3-8,5]	3,1 [1,3-5,4]	0,01 *

Análise estatística feita pelo teste U de Mann-Whitney * p < 0,05

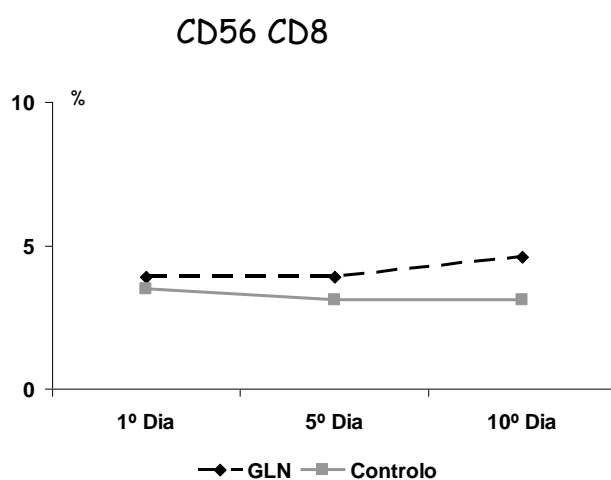


Figura 56. Distribuição dos linfócitos CD56CD8 ao longo do tempo

A dupla marcação CD56CD8 traduz a activação de linfócitos citotóxicos por células NK.

Verificamos um aumento da expressão CD56CD8 no grupo glutamina, comparativamente ao grupo controlo em que os valores dessa expressão se mantêm praticamente imutáveis ao longo do tempo. Esta diferença entre os grupos, com benefício desse aumento para a glutamina, assume significado estatístico pelo 10º dia de terapêutica (4,6% [3-8,5] vs 3,1% [1,3-5,4]; p=0,01).

Tabela LXIII. LINFÓCITOS CD16 (%) - evolução do 1º ao 10º dia.

Resultados expressos em medianas e percentis [25-%75%]

	TOTAL	GLUTAMINA	CONTROLO	p
Dia 1	17 [10,4-29]	16,7 [9,8-27,1]	19 [11,8-31,5]	0,42
Dia 5	23,9 [14,1-29,7]	22,8 [14,6-30,3]	24,4 [13,2-29,7]	0,94
Dia 10	21,8 [12,1-32,4]	22,5 [14,6-32,9]	21,6 [11,2-30,7]	0,51

Análise estatística feita pelo teste U de Mann-Whitney * p < 0,05

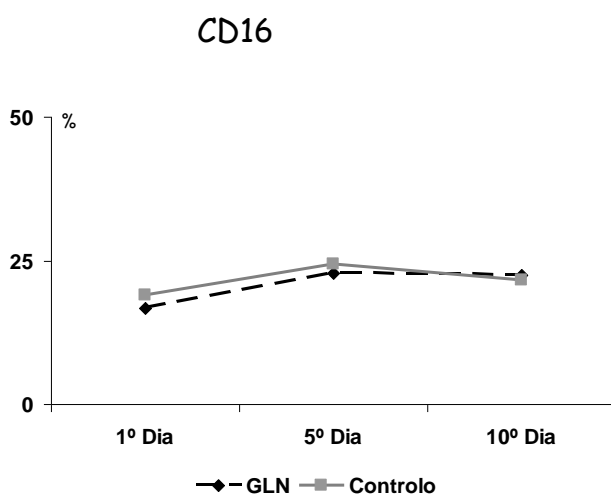


Figura 57. Distribuição dos linfócitos CD16 ao longo do tempo

As células NK circulantes, são activadas por quimiocinas (CXCR1 e CX3CR1) libertadas por células endoteliais e células da imunidade inata presentes nos tecidos inflamados, sendo rapidamente recrutadas para os tecidos lesados [461].

Constituem um subgrupo de linfócitos citotóxicos capazes de reconhecerem e destruírem as células tumorais ou infectadas por vírus sem sensibilização prévia (sem activação CD8⁺).

O CD16 é um dos três subtipos de receptor Fc-IgG expressos à superfície de macrófagos e células NK, é um mediador citotóxico contra a IgG presente à

superfície das células alvo [462, 463]. A ligação CD16 com ligand específico FcγG activa a desgranulação das células NK com libertação de enzimas líticas (perfurinas e granzinas) que destruirão as células infectadas [464, 465].

Verificamos que entre o 1º e o 5º dia do estudo houve um aumento da expressão de CD16 tanto no grupo glutamina como no grupo controlo.

Do 5º ao 10º dia, verificámos uma manutenção dos valores dessa expressão no grupo glutamina e uma redução no grupo controlo, embora as diferenças não atingissem grau de significado estatístico.

Tabela LXIV. LINFÓCITOS CD16CD3 (%) - evolução do 1º ao 10º dia.

Resultados expressos em medianas e percentis [25-%75%]

	TOTAL	GLUTAMINA	CONTROLO	p
Dia 1	7,9 [1,1-13,5]	9,5 [1,8-13,5]	7,8 [0,8-13,5]	0,61
Dia 5	8,7 [3,5-13,3]	9,2 [3,9-12,6]	7,7 [3,2-14,8]	0,97
Dia 10	9,3 [4,8-10,6]	12,9 [5,5-16,8]	8,4 [3,3-8,4]	0,36

Análise estatística feita pelo teste U de Mann-Whitney * p < 0,05

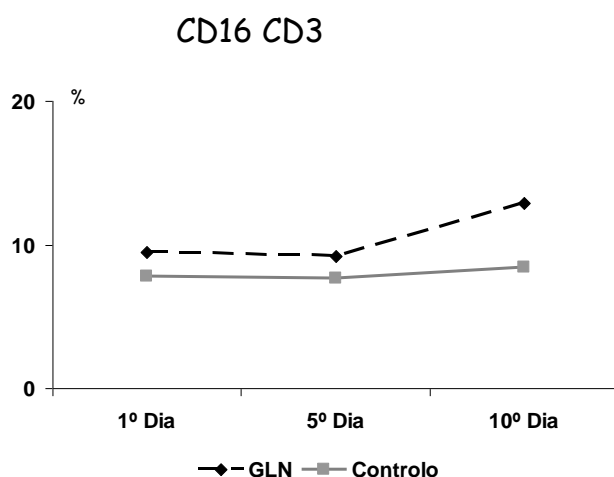


Figura 58. Distribuição dos linfócitos CD16CD3 ao longo do tempo

Registámos um aumento da expressão CD16CD3 em ambos os grupos ao longo do estudo. Mas, enquanto esse aumento se apresentava discreto no grupo controlo, era muito mais evidente no grupo glutamina. Apesar disso as diferenças entre os grupos ao 10º dia não mostravam sinais de significado estatístico relevante. (glutamina:12,9 [5,5-16,8] vs controlo: 8,4 [3,3-8,4] p 0,36).

Tabela LXV. LINFÓCITOS CD16CD8 (%) - evolução do 1º ao 10º dia.

Resultados expressos em medianas e percentis [25-%75%]

	TOTAL	GLUTAMINA	CONTROLO	p
Dia 1	2,7 [0,5-4,7]	3 [0,4-5,4]	2,4 [0,5-3,6]	0,77
Dia 5	3,2 [0,8-5,3]	3,5 [1,1-7,7]	1,7 [0,7-4,9]	0,14
Dia 10	3,3 [0,8-5,6]	4,5 [1,1-7,4]	2,3 [0,8-5,2]	0,10

Análise estatística feita pelo teste U de Mann-Whitney * p < 0,05

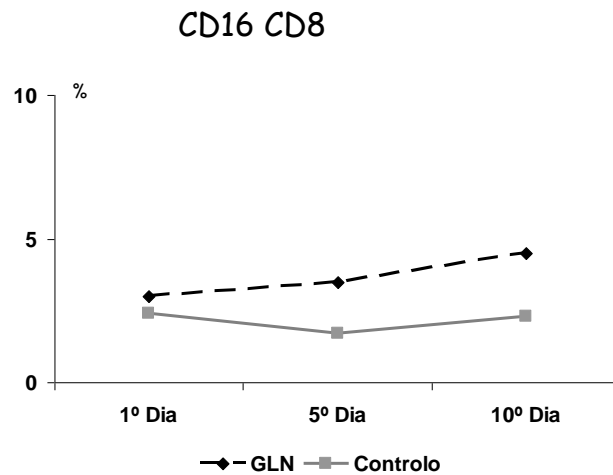


Figura 59. Distribuição dos linfócitos CD16CD8 ao longo do tempo

A dupla expressão CD16CD8 à superfície das células linfocitárias aumenta a eficácia do controlo e destruição de células infectadas por microrganismos intracelulares, quer expressem moléculas HLA I ou não.

Durante o período do estudo, há um aumento gradual e constante da dupla expressão CD16CD8 no grupo glutamina comparativamente ao controlo, esboçando ao 10º dia de estudo uma tendência estatisticamente importante com benefício para o grupo glutamina face ao controlo.

Tabela LXVI. LINFÓCITOS CD16CD56 (%) - evolução do 1º ao 10º dia
Resultados expressos em medianas e percentis [25-%75%]

	TOTAL	GLUTAMINA	CONTROLO	p
Dia 1	6,3 [3,9-10,5]	5,8 [3,9-8,6]	6,5 [23,9-11,5]	0,66
Dia 5	7 [4,8-8,8]	6,8 [5-9,2]	7 [4,6-8,8]	0,62
Dia 10	6,8 [3,3-11,5]	8,4 [4,8-11,9]	4,8 [2,8-9,4]	0,14

Análise estatística feita pelo teste U de Mann-Whitney * $p < 0,05$

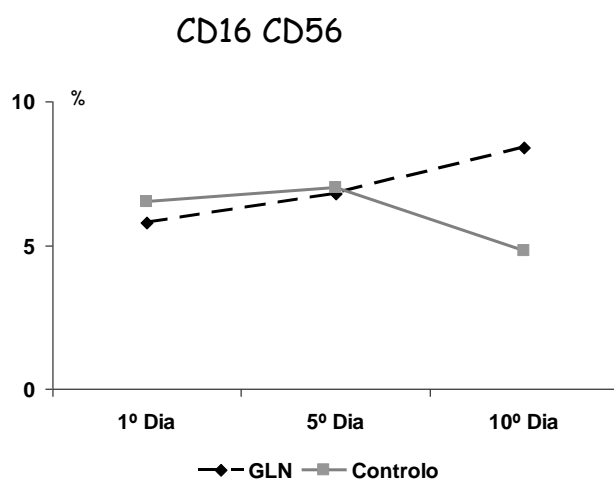


Figura 59. Distribuição dos linfócitos CD16CD56 ao longo do tempo

A dupla expressão CD16 CD56 caracteriza a população de células NK com capacidade de identificar HLA I, estas moléculas expressas à superfície de

todas as células inibem as NK, mas se ausentes como acontece nas células infectadas, activam-nas.

Os dois grupos tiveram comportamento diferente durante o estudo. Enquanto no grupo glutamina se registou um aumento ao longo do tempo, no grupo controlo houve uma redução.

Embora a diferença final ao 10º dia entre os dois grupos, revele uma tendência importante que beneficia positivamente o grupo glutamina (8,4 [4,8-11,9] vs 4,8 [2,8-9,4]; $p=0,14$), não é suficiente para assumir grau de significância estatística.

Tabela LXVII. CXCR3 (%) - evolução do 1º ao 10º dia.

Resultados expressos em medianas e percentis [25-%75%]

	TOTAL	GLUTAMINA	CONTROLO	p
Dia 1	16,7 [12,6-22,8]	16,6 [12,4-20,5]	17,7 [13,1-23]	0,68
Dia 5	14,2 [10,9-22,1]	14,8 [11,9-22,1]	13,8 [9,6-22]	0,29
Dia 10	18,3 [11,6-24,2]	20,3 [13,1-24,5]	13,5 [10,7-21,5]	0,05 *

Análise estatística feita pelo teste U de Mann-Whitney * $p < 0,05$

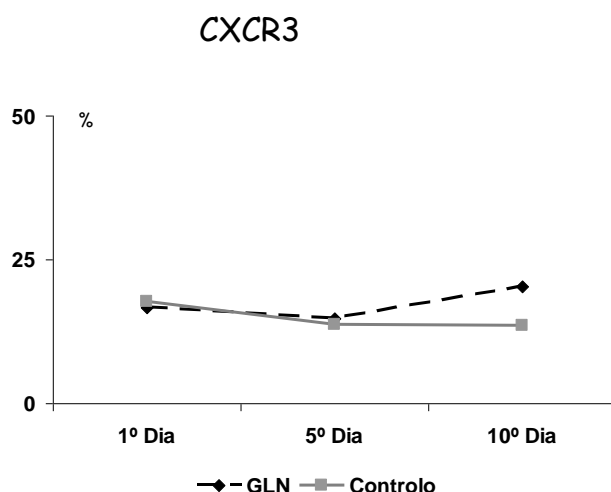


Figura 60. Distribuição das quimiocinas CXCR3 ao longo do tempo

Quimiocinas envolvidas na coordenação dos processos inflamatórios, exercendo um papel fundamental na migração e na interacção das células linfocitárias T quer no compartimento linfóide quer nos territórios periféricos que influenciarão o comportamento de células T efectoras, reguladoras e de memória.

A localização destes receptores de quimiocinas nos locais de inflamação facilitará a migração de linfócitos activados para os locais da agressão [466, 467].

Verificámos no grupo glutamina, ao longo do tempo do estudo, um aumento da expressão dos receptores de quimiocinas CXCR3 à superfície das células linfocitárias, enquanto no grupo controlo houve uma descida desta expressão. Esta diferença assume significado estatístico ao 10^o dia de intervenção terapêutica com benefício para o grupo glutamina face ao controlo (20,3% [13,1-24,5] vs 13,5 [10,7-21,5] p 0,05).

Tabela LXVIII. CXCR3 CD4 (%) - evolução do 1º ao 10º dia (medianas)

Resultados expressos em medianas e percentis [25-%75%]

	TOTAL	GLUTAMINA	CONTROLO	p
Dia 1	8,1 [6-11,4]	9 [6,1-10,6]	7,9 [5,6-12,3]	0,91
Dia 5	7,4 [5-11,3]	7,2 [5,1-11,2]	8,3 [4,7-12,1]	0,89
Dia 10	8,2 [5,4-12]	9,3 [6,7-12,5]	7,5 [4,8-10,6]	0,14

Análise estatística feita pelo teste U de Mann-Whitney * p < 0,05

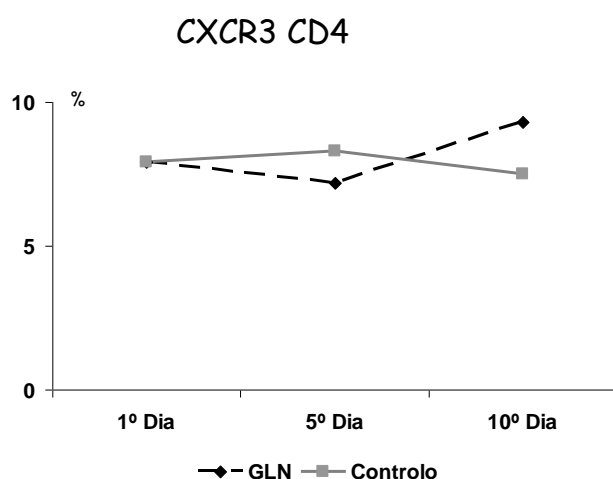


Figura 61. Distribuição das quimiocinas CXCR3CD4 ao longo do tempo

A expressão de receptores CXCR3 à superfície dos linfócitos TCD4 (Th1), rapidamente induzida após activação das células T naife pelas células apresentadoras de antígenos, traduz uma melhor capacidade de migração tecidual destas células T efectoras para os locais de inflamação e, naturalmente um melhor controlo do foco infeccioso. Esta capacidade de estimulação é mediada pela acção de citocinas (IFN γ) libertadas durante activação das células T.

No grupo glutamina, verificámos uma elevação da expressão CXCR3 à superfície dos linfócitos TCD4, enquanto no grupo controlo não havia diferenças (figura 61).

Apesar de ao 10º dia se registar uma diferença entre os grupos, com benefício para o grupo suplementado com glutamina, esta não chegou para alcançar um significado estatístico relevante (Tabela LXVIII).

Tabela LXIX. CXCR3 CD14 (%) - evolução do 1º ao 10º dia.

Resultados expressos em medianas e percentis [25%-75%]

	TOTAL	GLUTAMINA	CONTROLO	p
Dia 1	7,9 [5-11,4]	7 [4,9-11,1]	8,1 [5,4-11,6]	0,51
Dia 5	8,6 [5,8-13,5]	9,2 [5,8-15,5]	8,3 [3,7-10,7]	0,30
Dia 10	9,3 [9,3-14,2]	10,7 [8,8-16,5]	6,7 [5-10]	0,01 *

Análise estatística feita pelo teste U de Mann-Whitney * p < 0,05

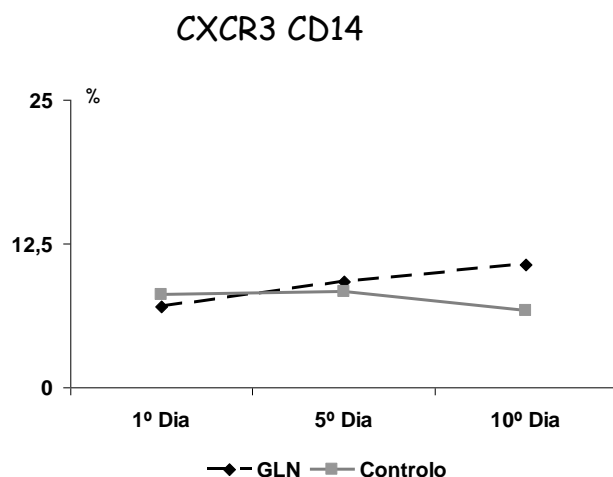


Figura 62. Distribuição das quimiocinas CXCR3 CD14 ao longo do tempo

A expressão CXCR3 à superfície dos monócitos permite uma melhor mobilização destes para os locais de agressão e, naturalmente melhor possibilidade de controlar o agente que a provocou.

No grupo glutamina há uma elevação gradual da expressão CXCR3 CD14 do 1º ao 10º dia de tratamento, enquanto no grupo controlo há um decréscimo ao 10º dia dos valores inicialmente presentes.

Esta diferença entre grupos apresenta ao 10º dia um carácter estatisticamente significativo, com benefício para o grupo glutamina comparativamente ao controlo.

Tabela LXX. CCR5 (%) - evolução do 1º ao 10º dia.

Resultados expressos em medianas e percentis [25%-75%]

	TOTAL	GLUTAMINA	CONTROLO	p
Dia 1	2,7 [1,7-4]	2,4 [1,3-3,4]	3 [1,9-4,6]	0,21
Dia 5	3,4 [1,3-7,3]	3,3 [1,3-9,4]	3,4 [1,1-7]	0,64
Dia 10	3,2 [1,8-7]	3,5 [1,9-8,1]	3,2 [1,7-5,6]	0,54

Análise estatística feita pelo teste U de Mann-Whitney * p < 0,05

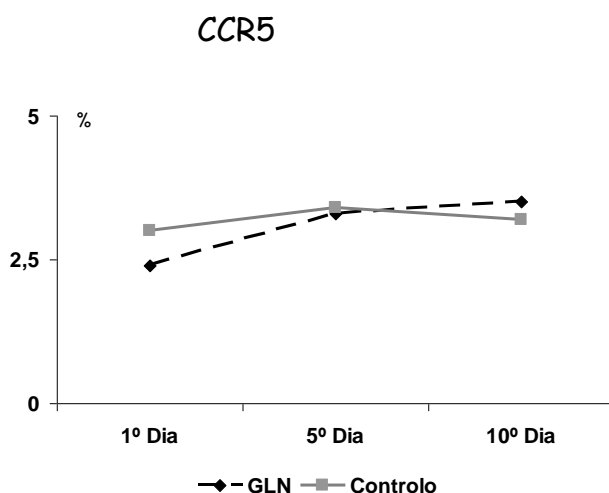


Figura 63. Distribuição das quimiocinas CCR5 ao longo do tempo

Embora inicialmente o grupo glutamina apresentasse uma expressão de CCR5 inferior ao grupo controlo depois, com o evoluir do estudo, registámos uma recuperação. Assim, a partir do 5º dia, os grupos eram já idênticos. Ao longo do estudo não houve diferenças estatísticas entre os grupos.

Tabela LXXI. CCR5 CD4 (%) - evolução do 1º ao 10º dia.

Resultados expressos em medianas e percentis [25-75%]

	TOTAL	GLUTAMINA	CONTROLO	p
Dia 1	0,6 [0,3-1,4]	0,6 [0,3-1,4]	0,8 [0,3-1,6]	0,68
Dia 5	0,6 [0,3-1,3]	0,6 [0,2-1,5]	0,5 [0,3-1,2]	0,52
Dia 10	0,6 [0,3-1,5]	0,7 [0,4-1,6]	0,6 [0,3-1,4]	0,38

Análise estatística feita pelo teste U de Mann-Whitney * p < 0,05

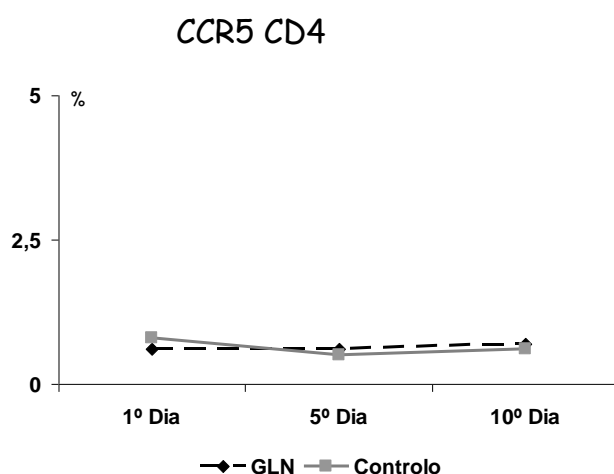


Figura 64. Distribuição das quimiocinas CCR5CD4 ao longo do tempo

Na expressão de CCR5 à superfície dos linfócitos TCD4 não houve diferenças entre os dois grupos ao longo do estudo.

A glutamina não parece assim modificar a expressão de receptores CCR5 à superfície dos linfócitos T efectores.

Tabela LXXII. CCR5 CD14 (%) - evolução do 1º ao 10º dia (medianas)

Resultados expressos em medianas e percentis [25-%75%]

	TOTAL	GLUTAMINA	CONTROLO	p
Dia 1	4,3 [3,1-7,9]	4,5 [2,9-8,3]	4,1 [3,1-7,2]	0,72
Dia 5	5,2 [2,6-8,5]	5,4 [3,2-8,5]	3,3 [2,4-7,4]	0,16
Dia 10	5,2 [3,1-9,8]	5,7 [3,5-11,8]	5 [2,9-7,8]	0,26

Análise estatística feita pelo teste U de Mann-Whitney * p < 0,05

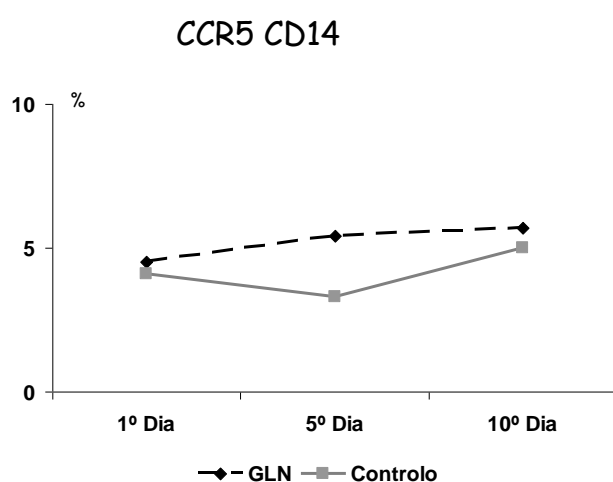


Figura 65. Distribuição das quimiocinas CCR5CD14 ao longo do tempo

Durante a maturação dos monócitos, diferentes mecanismos de sinalização regulam a expressão de receptores de quimiocinas [468], fazendo aumentar o número de células que expressam CCR5 [469].

Verificámos entre o primeiro e o 10º dia uma subida nos dois grupos de estudo, sem diferenças significativas entre si. De salientar que essa subida foi mais precoce, sendo evidente logo ao 5º dia, no grupo glutamina comparativamente ao grupo controlo.

Tabela LXXIII. CXCR3 CCR5 (%) - evolução do 1º ao 10º dia (medianas)

Resultados expressos em medianas e percentis [25-%75%]

	TOTAL	GLUTAMINA	CONTROLO	p
Dia 1	1,1 [0,7-2]	0,9 [0,6-1,8]	1,2 [0,7-2]	0,32
Dia 5	1,3 [0,6-2,4]	1,4 [0,6-2,4]	1,3 [0,6-2,5]	0,81
Dia 10	1,1 [0,5-2]	1,5 [0,5-3,1]	0,8 [0,5-1,5]	0,01 *

Análise estatística feita pelo teste U de Mann-Whitney * p < 0,05

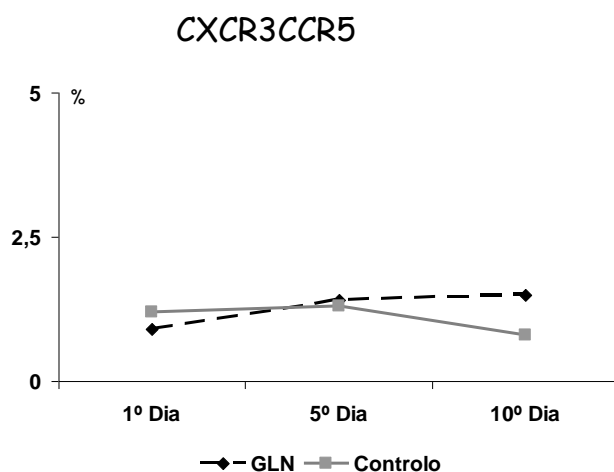


Figura 66. Distribuição das quimiocinas CXCR3CCR5 ao longo do tempo

As quimiocinas desempenham um papel fundamental na migração das células efectoras para os locais de agressão [470-472].

Na análise da dupla expressão de receptores de quimiocinas à superfície dos linfócitos, verificamos um aumento no grupo glutamina comparativamente ao controlo com uma diferença estatisticamente significativa ao 10º dia do estudo.

Tabela LXXIV. CXCR3 CCR5 CD4 (%) - evolução do 1º ao 10º dia (medianas)

Resultados expressos em medianas e percentis [25-%75%]

	TOTAL	GLUTAMINA	CONTROLO	p
Dia 1	0,3 [0,1-0,6]	0,2 [0,02-0,6]	0,4 [0,1-0,7]	0,13
Dia 5	0,3 [0,1-0,8]	0,3 [0,1-1]	0,3 [0,1-0,6]	0,41
Dia 10	0,3 [0,02-1]	0,3 [0-1]	0,2 [0,1-1]	0,84

Análise estatística feita pelo teste U de Mann-Whitney * p < 0,05

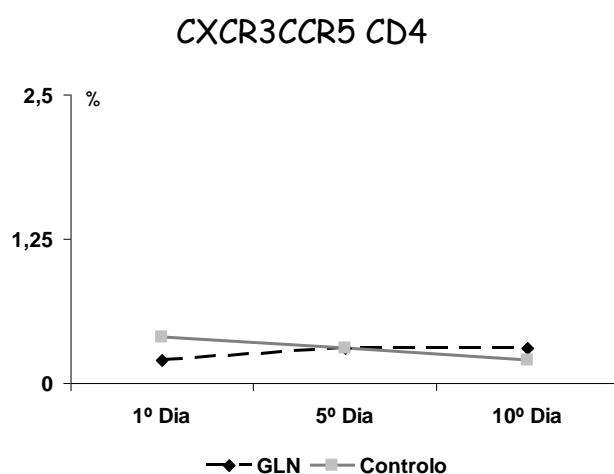


Figura 67. Distribuição das quimiocinas CXCR3CCR5CD4 ao longo do tempo

Durante o tempo que decorreu o estudo não houve modificação dos valores da expressão de receptores CXCR3CCR5 à superfície dos linfócitos TCD4, sendo esta ausência de expressão idêntica no grupo glutamina e controlo.

Estes resultados mostram uma perturbação da migração Th1 para os locais de inflamação que a glutamina não consegue corrigir.

Tabela LXXV. CXCR3CCR5 CD14 (%) - evolução do 1º ao 10º dia (medianas)

Resultados expressos em medianas e percentis [25-%75%]

	TOTAL	GLUTAMINA	CONTROLO	p
Dia 1	1,5 [1-2,6]	1 [0,9-2,1]	1,6 [1-3,4]	0,52
Dia 5	1,9 [1,2-3]	1,9 [0,8-2,9]	1,8 [1,2-3]	0,99
Dia 10	1,4 [1-2,8]	1,7 [1-2,9]	1,4 [0,8-2]	0,32

Análise estatística feita pelo teste U de Mann-Whitney * p < 0,05

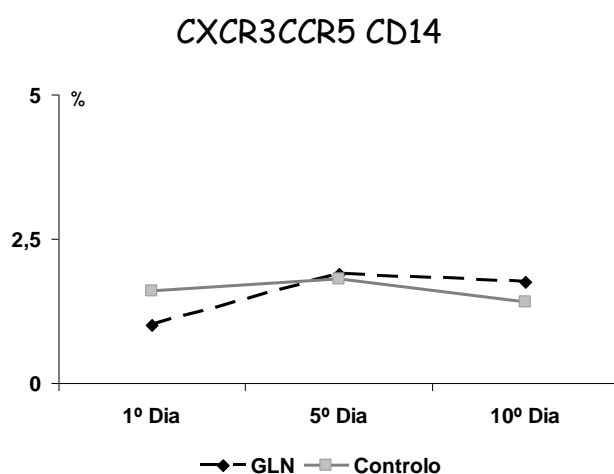


Figura 68. Distribuição das quimiocinas CXCR3CCR5CD14 ao longo do tempo

Embora o grupo glutamina tenha demonstrado uma recuperação na dupla expressão CXR3CCR5 à superfície dos monócitos, quando comparado com o grupo controlo, não havia diferença estatisticamente significativa entre eles.

3.5.9 Análise Estatística Multivariada e Métodos de Exploração Multidimensionais

Realizámos uma análise estatística multivariada através da avaliação de componentes principais categóricas (CatPCA), seleccionando as componentes principais capazes de explicar uma percentagem apreciável dos dados originais. Usámos o coeficiente alfa de Cronbach como indicador de consistência entre as variáveis integrantes das diversas dimensões independentes, devendo o seu valor ser superior a 0,700.

O conjunto de variáveis seleccionadas permitiu definir quatro dimensões independentes ($r = 0,000$; $p = 1,000$ entre todos os pares de variáveis) com elevada fiabilidade em termos de consistência interna de cada uma, avaliada através do coeficiente alfa de Cronbach (dimensão 1: $\alpha_C = 0,864$; dimensão 2: $\alpha_C = 0,840$; dimensão 3: $\alpha_C = 0,774$; dimensão 4: $\alpha_C = 0,717$), permitindo explicar cerca de 30,92% da variabilidade encontrada com todas as variáveis consideradas.

O grupo de estudo (glutamina) aparece na dimensão 3 relacionado em sentido inverso com os biomarcadores CD14 e CD56 ao 1º dia, CD25CD3 ao 5º dia, CD4 e HLADR(CD14) CD95L ao 10º dia, e também com o número de infecções no SMI e Mortalidade SMI, ou seja, a Glutamina aparece associada a valores mais baixos de CD14 e CD56 ao 1º dia, CD25CD3DOA ao 5º dia, CD4 e HLADR(CD14) CD95L ao 10º dia, menor nº de infecções e mortalidade em SMI; por outro lado, doentes com Glutamina apresentam valores mais elevados de CD8 ao 1º e ao 5º dia, valores mais elevados de HLADR ao 5º e ao 10º dia, e valores mais elevados de CD14HLADR ao 10º dia (Figura 69).

Tabela LXXVI – Análise de Componentes Principais Categóricas (Dimensão 3)

Variável	Score
CD14 Dia 1	,192
CD14 HLADR Dia 10	-,333
CD25CD3 Dia 1	,516
CD25CD3 Dia 5	,441
CD25 Dia 1	,545
CD25 Dia 5	,485
CD4 Dia 10	,427
CD56 Dia 1	,252
CD8 Dia 1	-,461
CD8 Dia 5	-,505
CD8 Dia 10	-,231
Grupo_B (GLUTAMINA)	-,371
HLADR Dia 10	-,303
HLADR Dia 5	-,344
HLADR(CD14) CD95L Dia 10	,368
INFECTADOS SMI	,230
MORTE SMI	,390

Na tabela LXXVI é possível ver quais as variáveis constituintes da dimensão 3, assim como o contributo (*score*) de cada variável e o respectivo sentido (positivo ou directo; negativo ou inverso).

Assim, a Glutamina parece reduzir o nº de infecções e mortalidade SMI e corrige os biomarcadores referidos, tendo pouca influência no conjunto das restantes variáveis.

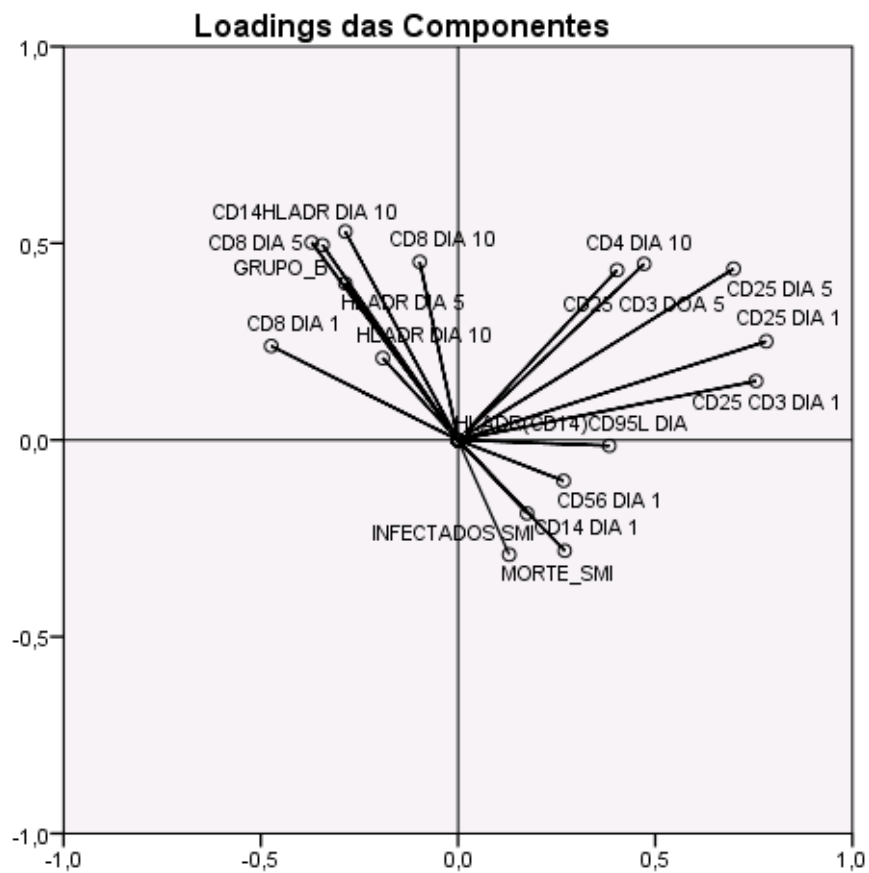


Figura 69. Representação gráfica da Análise de Componentes Principais Categóricas (CatPCA)

Para identificarmos os factores de risco independentes para a redução da infecção nosocomial, seleccionámos as variáveis significativas e usámos um modelo de regressão logística multivariada.

Tabela LXXVII – Infecção no SMI (análise de regressão logística) - Influencia da glutamina e de algumas sub-populações linfocitárias na redução da infecção no SMI ao 5º dia após o início do suporte nutricional

Variáveis	Parâmetro Avaliado	Standard Error	Teste χ^2 de Wald	df	Valor de p	Exp(B)
CD3_D5	,011	,042	,070	1	,791	1,011
GRUPO_B(1)	2,829	1,174	5,809	1	,016	16,932
CD4_D5	,043	,053	,669	1	,413	1,044
CD14_D5	,256	,183	1,941	1	,164	1,291
CD14HLADR_D5	-,025	,026	,974	1	,324	,975
CD14CD95_D5	,059	,078	,584	1	,445	1,061
IDADE	,043	,033	1,638	1	,201	1,044
Constant	-19,204	11,972	2,573	1	,109	,000

Tabela LXXVIII - Infecção no SMI (análise de regressão logística) - Influencia da glutamina e de algumas sub-populações linfocitárias na redução da infecção no SMI ao 10º dia após o início do suporte nutricional

Variáveis	Parâmetro Avaliado	Standard Error	Teste χ^2 de Wald	df	Valor de p.	Exp(B)
CD3_D10	,027	,047	,334	1	,563	1,027
GRUPO_B(1)	2,692	1,223	4,845	1	,028	14,755
CD4_D10	-,082	,047	3,094	1	,079	,921
CD14_D10	,011	,063	,033	1	,856	1,012
CD14HLADR_D10	-,094	,024	2,658	1	,048	,970
CD14CD95_D10	,011	,033	,116	1	,734	1,011
IDADE	,018	,033	,306	1	,580	1,019
Constant	-7,287	5,792	1,583	1	,208	,001

Verificámos que a glutamina ao 5º e 10º dias depois de iniciada a suplementação nutricional se relaciona de forma independente com a redução da infecção no SMI, com significado estatístico importante.

A população TCD4 e a subpopulação de monócitos CD14 HLADR ao 10º dia contribuem, em conjunto com a glutamina, para redução da infecção no SMI.

4. DISCUSSÃO

4.1. CARACTERÍSTICAS GERAIS da POPULAÇÃO ESTUDADA

As características gerais da população deste estudo são muito semelhantes, não apresentando grandes diferenças entre os dois grupos nele incluídos. Esta homogeneidade da randomização é importante, porque vai dar relevância aos resultados decorrentes da intervenção terapêutica.

As características observadas nos doentes deste estudo também não são muito diferentes daquelas que habitualmente apresentam os doentes internados no SMI, permitindo-nos afirmar que além de homogênea a amostra é representativa da população que habitualmente tratamos.

Não existem diferenças entre a idade habitual dos doentes internados no SMI, com uma mediana de 64 anos, e a dos doentes incluídos neste estudo em qualquer um dos braços (60,1 grupo glutamina vs 62,7 grupo controlo).

Há um predomínio do sexo masculino sobre o feminino (78 vs 22% no grupo glutamina e de 75 vs 25% no grupo controlo), característica do SMI, onde a distribuição habitual por género é de 67 vs 33% respectivamente.

Nestes últimos anos a população de doentes graves internada nos SMI modificou o seu perfil que, passou a ser caracterizado pelo aumento do escalão etário e das co-morbilidades, que complicam a agressão que motivou o internamento no SMI. Verificámos, neste estudo, que há um maior numero de co-morbilidades na população randomizada para o grupo glutamina (n = 41) do que no grupo controlo (n = 37), apesar desta diferença não possuir grau de significância estatística.

A distribuição global por patologias no momento da admissão é um pouco diferente da habitual, em que predomina a patologia médica (54,3%) sobre a cirurgica e a traumática com 22% cada uma (dados SMI-HUC 2011). No nosso estudo há uma inversão desta relação, com aumento das populações cirúrgica e traumática sobre a médica; tal alteração decorre das características do desenho do estudo que inclui doentes com tubo digestivo não funcionante nas primeiras 48 horas, prevendo que esta incapacidade se prolonga por período superior a 5 dias. Esta situação é muito mais frequente em doentes com

patologia cirúrgica ou traumática do que em doentes com patologia médica, explicando assim a dominância de patologia cirúrgica e traumática sobre a médica no estudo que agora apresentamos.

Na distribuição por patologias entre os grupos de estudo (controlo vs glutamina), verificámos ser igual no grupo médico (25% para cada um) e ligeiramente diferente entre os grupos cirúrgico e traumático, com predomínio da patologia cirúrgica no grupo controlo (47 vs 39%) e da patologia traumática no grupo com glutamina (36 vs 28%), sem que qualquer destas diferenças apresente um carácter estatisticamente significativo.

A população incluída no estudo era composta por doentes graves, com discreto aumento dos valores médios dos índices de gravidade no grupo glutamina sobre o controlo, evidenciados no *SAPS II* [$49,8 \pm 8,48$ vs $46,3 \pm 12,7$; $p=0,24$] e *SAPS III* [$76 \pm 11,0$ vs $73,6 \pm 14,3$; $p=0,41$], mas sem diferenças estatisticamente significativas entre os grupos. De salientar que, enquanto a média habitual do *SAPS II* no SMI – HUC = $46 \pm 6,51$ é muito semelhante à do estudo, a do *SAPS III* = $65 \pm 10,3$ é discretamente inferior, atestando assim a gravidade dos doentes incluídos neste estudo.

Os valores médios do *APACHE II* de $21 \pm 4,07$ e de $21,5 \pm 5,43$ e do *SAPS II* de $49,8 \pm 8,48$ e de $46,3 \pm 12,7$ respectivamente para o grupo glutamina e controlo, foram superiores aos descritos em estudos multicêntricos realizados em UCI's portuguesas por Moreno e colaboradores [448, 473].

Uma das dificuldades que temos habitualmente em Medicina Intensiva é a avaliação do estado nutricional dos doentes no momento da admissão, porque a maioria dos índices utilizados tem em conta o peso do doente. Apesar de pesarmos o doente no momento da admissão e durante o internamento, o valor obtido é sobrevalorizado, a maioria das vezes por retenção hídrica marcada. Tentámos ultrapassar isso recorrendo à avaliação do perímetro braquial, parâmetro antropométrico validado numa população de doentes graves [435].

Não havia diferenças entre as medianas nos dois grupos, quer com o IMC, quer com o PB. De facto, embora a generalidade dos doentes tivesse uma distribuição de avaliação do estado nutricional dentro dos parâmetros da normalidade (IMC entre 20 e 27 Kg/m²), um terço dos doentes apresentava-se malnutrido no momento da admissão (sobretudo doentes cirúrgicos), tanto no

sentido da desnutrição (PB < 15) 13,8% como da obesidade (IMC > 30) 19,4%, não havendo diferenças entre os grupos mas acentuando a necessidade de terapêutica nutricional urgente.

Para compreendermos a verdadeira dimensão da desnutrição calórico-proteica, teremos que definir se estamos a pensar em *deficit* (subnutrição que tem uma prevalência de 5,3% na população em geral), ou em excesso de peso e obesidade (com uma prevalência respectivamente de 33,8 e 19,4%). Habitualmente, quando nos referimos a malnutrição pretendemos falar de subnutrição, embora não possamos esquecer que ambas as situações (subnutrição e obesidade) representam estados calórico-proteicos aquém do desejável, e por isso entendidas como estados de malnutrição. Ambas condicionam aumento da morbimortalidade em doentes sujeitos a *stress* metabólico.

Neste estudo verificámos que os resultados obtidos para a prevalência da obesidade são coincidentes com os da literatura. Mas, quando analisamos o estado de subnutrição da nossa população, verificamos que este é superior ao da média da população em geral, particularmente quando utilizamos o perímetro braquial para a avaliar, traduzindo um estado que poderá influenciar o prognóstico por aumento da morbimortalidade.

Não existem muitos relatos da prevalência da malnutrição em doentes de MI, sendo uma das razões a dificuldade em avaliá-la de forma correcta [474]. Alguns dos estudos publicados procuram ultrapassar esta falha recorrendo à combinação entre parâmetros antropométricos e bioquímicos [475, 476]. Ainda assim, continuavam a sobrestimar a proporção de doentes normo ou supranutridos, mercê da utilização de um valor de peso exagerado pelo excesso de água intersticial.

A malnutrição bloqueia o sistema imune, suprimindo diversas funções fundamentais para a proteção eficaz contra agentes patogénicos. Esta malnutrição pode dever-se à redução da ingestão calórica, de macronutrientes ou de micronutrientes. Nos países desenvolvidos, dos quais fazemos parte, a malnutrição aparece particularmente em grupos de doentes idosos, ou portadores de co-morbilidades que limitam a absorção ou utilização metabólica eficaz dos nutrientes ingeridos. Neste estudo verificámos que a maior parte dos doentes desnutridos (IMC < 20) eram casos cirúrgicos complicados, com

longos períodos de incapacidade funcional do tubo digestivo, sem correção nutricional antes ou depois da cirurgia.

Estudos no Homem demonstraram que determinados nutrientes são essenciais para a funcionalidade do sistema imune (aminoácidos essenciais, glutamina, ácidos gordos essenciais, vitaminas A, B12, B6, ácido fólico, vitaminas C e E, zinco, cobre, ferro e selénio) e que, administrando os nutrientes em falta, restauramos essa funcionalidade. [477].

As características até agora apontadas ilustram bem a população incluída no estudo: idosa, com várias co-morbilidades, com uma percentagem não desprezível de doentes malnutridos e por isso com maior risco de infecção, sujeita a diversas técnicas invasivas e ao uso de antibioterapia sistémica que predispõem à colonização e sobreinfecção nosocomial.

Às características antes descritas associa-se a agressão que motivou o internamento, conferindo a estes doentes um alto índice de gravidade, com risco de mortalidade elevado.

4.2. RESPOSTA CLÍNICA à TERAPÊUTICA INSTITUÍDA

4.2.1. Equilíbrio Nutricional

Verificámos que não foi possível equilibrar o balanço azotado em qualquer dos grupos estudados, quer durante o período de estudo, quer durante o resto do internamento no SMI.

Existem diversas referências publicadas que confirmam que o uso de 0,2 a 0,5 g/Kg/dia de glutamina melhora o balanço azotado [302, 312, 478-480], mas embora o grupo glutamina evidenciasse um balanço azotado mais equilibrado do que o grupo controlo, logo aparente a partir do 5º dia de randomização, as diferenças não apresentaram significado estatístico.

A incapacidade de equilibrar o balanço azotado está relacionada com a gravidade clínica e a manutenção de processos inflamatórios (síntese de proteínas de fase aguda) e metabólicos (manutenção de células do sistema imune) ávidos em aminoácidos. A prevalência de patologia cirúrgica (associada a complicações como deiscências, fístulas, abscessos) e de patologia traumática, ambas relacionadas com intensos processos catabólicos de

elevado consumo quer de nutrientes, quer de energia, contribuem para o desequilíbrio do balanço proteico durante o tempo de internamento no SMI.

A infecção teve um papel importante na manutenção do desequilíbrio dos balanços azotados ao longo do tempo, provavelmente resultando da libertação de mediadores inflamatórios. O grupo infectado teve sempre balanços azotados mais negativos ao longo do tempo de permanência no SMI, e se bem que essas diferenças entre os grupos infectados/não infectados nunca fossem estatisticamente significativas, esboçavam uma tendência de benefício para o grupo sem infecção no momento da alta.

Será lícito por isso especular, que a maior taxa de infecções no grupo controlo fosse responsável pelo balanço azotado mais negativo que observámos quando comparado com o do grupo com glutamina.

O objectivo do suporte proteico durante a fase aguda é proporcionar alguns aminoácidos que o organismo não tem capacidade de sintetizar ou não consegue produzir em quantidades suficientes, e que são fundamentais para vários processos metabólicos, mantendo assim a funcionalidade dos diversos órgãos e minimizando a depleção de massa magra muscular, verdadeira reserva funcional de suporte à agressão. A glutamina é um desses aminoácidos.

A relação habitual da concentração de glutamina livre entre o território muscular e plasmático é de 32:1, com um *turnover* diário de 1 g/Kg/dia que é dez vezes superior à ingestão diária, acentuando o papel fundamental da síntese endógena para manter adequados níveis séricos [481]. Em doentes críticos aumentam as necessidades de glutamina consumida pelas células do sistema imune e nos processos de reparação celular, enquanto a sua produção se vê comprometida pela imobilidade, pela insulino-resistência e pela estimulação da actividade proteolítica lisossómica e proteossómica por aumento da expressão de genes que controlam a actividade daquelas enzimas [482]. Este desequilíbrio faz com que o aporte exógeno seja fundamental, tornando este aminoácido condicionalmente essencial nestas circunstâncias [268].

Na tentativa de perceber a relação entre a administração de glutamina exógena a doentes graves e a sua utilização no metabolismo muscular esquelético, o grupo de Wernerman *et al.* verificou que a administração de níveis crescentes

de glutamina (0,28, 0,57 e 0,86 g/Kg/dia) por via parentérica durante 5 dias, fazia aumentar proporcionalmente os níveis séricos desta a partir das 24 horas, de uma forma dose dependente, mas não aumentava o teor de proteínas musculares [268]. Esta discrepância é aparente pois os compartimentos (muscular e sérico) não são totalmente independentes, existindo uma discreta correlação estatística no início e fim do estudo entre os níveis de concentração de glutamina livre sérica e muscular. Numa análise *post-hoc* do estudo verificava-se uma redução em 30% da excreção de 3-metilhistidina na urina do grupo suplementado com glutamina, sugerindo uma diminuição da degradação de proteínas musculares.

Não foi o nosso objectivo neste estudo atingir o equilíbrio dos balanços azotados, pois sabemos que muitas vezes só se alcança após alta do SMI, com a recuperação gradual do processo clínico e a entrada em período de anabolismo.

Apesar de verificarmos que a glutamina e a ausência de infecção se correlacionavam com balanços azotados menos negativos, a dimensão da amostra não nos permitiu alcançar diferenças com significado estatístico importante.

4.2.2. Resposta à Infecção

A prevenção das infecções nosocomiais é um objectivo importante que se associa à redução do tempo de internamento, do tempo de ventilação e da terapêutica antibiótica, diminui os efeitos secundários, os custos e as multirresistências [483].

Internamos com frequência no SMI doentes provenientes de outras enfermarias do Hospital, alguns com infecções nosocomiais que complicam a agressão inicial. Decidimos incluir estes doentes no estudo, o que pode ser criticável quando realizamos um ensaio destinado a avaliar o risco de infecção, mas entendemos que, se o não fizéssemos, não estávamos a estudar a população de doentes que habitualmente tratamos. Pretendemos aproximar-nos o mais possível da realidade, garantindo assim que não excluíamos os doentes mais graves, que seriam aqueles que mais iriam beneficiar da modulação imunológica resultante da terapêutica com glutamina.

A randomização foi-nos favorável, fazendo com que igual número de doentes infectados figurassem à partida em cada grupo, contribuindo para garantir a homogeneidade da amostra.

A taxa habitual de doentes infectados no momento do internamento no SMI-HUC é de 46%, número superior ao dos doentes incluídos neste estudo que era de 30%.

A nossa hipótese veio a confirmar-se, porque o número de doentes que recuperou do quadro infeccioso inicial foi significativamente maior no grupo glutamina (8/11) comparativamente ao controlo (1/11), atestando o papel importante da glutamina na mobilização das defesas orgânicas face à agressão.

Quando comparamos os doentes do estudo verificamos que, no grupo glutamina, houve uma redução significativa no número de doentes infectados após o início do suporte nutricional, (42 vs 58%). O número habitual de infecções nosocomiais durante o internamento no SMI-HUC é de 43,3% (dados relativos a 2011), discretamente superior ao do grupo glutamina (42%) e inferior ao do grupo controlo (58%).

Existem diversos factores de risco nos doentes desta amostra favorecendo a elevada incidência de infecções nosocomiais [484-486], como sejam a idade avançada, a existência de doenças crónicas subjacentes (DPOC, Diabetes Mellitus), o elevado número de falências multiorgânicas instaladas, o tempo de hospitalização antes do internamento no SMI (que é superior a 5 dias para 1/3 dos doentes incluídos neste estudo), o número de grandes cirurgias realizadas (43% do total dos doentes da amostra), a política de profilaxia de úlceras de stress com a prescrição habitual de inibidores da bomba de prótons (que facilitam a colonização do tubo digestivo por germens *Gram* negativos multirresistentes), e ainda a necessidade de usar tubos endotraqueais e sondas naso-gástricas na totalidade dos doentes, o que neutraliza os habituais mecanismos naturais protectores de barreira.

O território pulmonar é o local de infecção mais frequente quando adquirida no SMI; estes resultados não são diferentes dos diversos estudos epidemiológicos publicados para esta população [410, 487-492] em que o pulmão [493] constitui o local predominante de origem de infecções, logo seguido do abdómen e da corrente sanguínea.

Comparativamente ao controlo, a prevalência de episódios de pneumonia nosocomial foi significativamente menor no grupo glutamina (12 vs 32 episódios).

Quando analisamos o número de episódios de infecção respiratória por dias de ventilação verificamos que o grupo controlo (13 episódios por 1000 dias de ventilação) se aproxima dos valores publicados na literatura [494-497], enquanto o grupo glutamina (7,5 episódios por 1000 dias de ventilação) apresenta valores inferiores aos habituais, traduzindo o benefício da utilização deste aminoácido na redução do número de infecções respiratórias.

Quanto aos outros episódios infecciosos por local de origem, verificamos que o grupo glutamina teve sempre um menor número destes episódios comparativamente ao controlo, com origem em catéteres centrais (1 vs 2 episódios), na corrente sanguínea (3 vs 4 episódios), no local cirúrgico (2 vs 4 episódios), ou nas vias urinárias (4 vs 5 episódios), embora as diferenças não sejam significativas.

Há um claro benefício da utilização de glutamina na redução do número médio de episódios infecciosos (22 vs 47). Por isso quando estabelecemos a relação de episódios infecciosos por doente verificamos que ela é de 0,61 no grupo glutamina e de 1,30 no grupo controlo, traduzindo a importância da glutamina na redução da infecção nosocomial nesta população.

Quando avaliámos os microrganismos isolados nos diversos meios de cultura não registámos diferenças significativas entre os grupos de estudo.

Salientamos a dominância das *Pseudomonas* e do *Acinetobacter baumannii* dentro dos *Gram* negativos. Este último mostra por vezes variações regionais, uma vez que a sua prevalência é dependente de medidas de barreira para controlo dos focos de infecção e política de antibióticos (que difere de local para local), mas que tem um papel primordial no desenvolvimento de multirresistências.

Os resultados que obtivemos nesta amostra não são diferentes da distribuição habitual dos germes responsáveis pelas infecções nosocomiais no SMI-HUC, em que predominam os MRSA na população de doentes politraumatizados e as *Pseudomonas* na população de doentes cirúrgicos.

A literatura nem sempre é unânime na prevalência dos *Gram* negativos sobre os positivos como causa de infecção neste tipo de doentes, existindo alguns

estudos publicados que mostram um predomínio de gram positivos [493, 498] e outros que não evidenciam diferenças [488].

Os resultados que encontramos também não são diferentes dos publicados no EPIC II [409] em que também existia um predomínio dos *Gram* negativos face aos positivos, traduzindo a tendência de recentes estudos epidemiológicos nesta área [499, 500].

Este perfil de dominância dos microrganismos *Gram* negativos sobre os positivos é característica habitual dos doentes internados no SMI-HUC e traduzem neste estudo o maior número de doentes cirúrgicos face aos doentes do foro médico ou traumático.

O número total de doentes infectados durante o internamento foi significativamente inferior no grupo glutamina (47%) face ao controlo (81%), conferindo a esta diferença um significado estatístico importante ($p=0,01$).

Suportado pela análise de regressão logística verificámos que a glutamina está relacionada de forma independente com a redução do número de infeções no SMI, com significado estatístico importante ao 5º dia ($p = 0,01$) que se mantêm ao 10º dia após o início do suporte nutricional ($p= 0,02$).

Estes resultados vêm reforçar as conclusões de diversos estudos [131, 314, 363, 391, 392, 403] e duas consideráveis meta-análises [309, 501] que associam a administração de glutamina por via parentérica com a redução do número de intercorrências infecciosas, numa população de doentes graves.

De entre os marcadores clínicos e bioquímicos de infeção, os leucócitos não mostraram diferenças significativas entre os grupos de estudo.

Os leucócitos, isoladamente, não constituem indicadores ideais para o diagnóstico de infeção. Numerosas situações infecciosas cursam com leucopenia [502, 503], da mesma forma que a leucocitose pode estar presente em circunstâncias não infecciosas.

Por isso, a leucocitose apesar da elevada sensibilidade tem pouca especificidade, com um baixo valor predictivo para o diagnóstico de infeção [504].

A temperatura elevada ($> 38,2^{\circ}\text{C}$) tem baixo poder discriminativo para o diagnóstico de infeção; há infeções que cursam sem temperaturas elevadas [438, 505, 506]. Apesar disso, verificámos pelo 10º dia uma redução dos valores máximos de temperatura no grupo glutamina.

A presença de sinais de SIRS por si só não nos ajuda no diagnóstico de infecção [507, 508]. Mais importante é a sua evolução sequencial ao longo do tempo.

Foi isso que verificámos com a PCR, que apresentava uma redução significativa no grupo glutamina logo evidente ao 5º dia, acentuando-se essa diferença pelo 10º dia do estudo ($p=0,001$).

Havia uma boa correlação entre o aumento do valor sérico da PCR ao longo do tempo e o aparecimento de novas infecções. Pedro Póvoa *et al.* [504] associa a PCR maior do que 8,7 mg/dl a uma maior probabilidade de infecção. Verificámos que, apesar das medianas se situarem acima desses valores, os quartis inferiores mostram desde o 5º dia valores mais baixos no grupo glutamina, inferiores ao cut-off de 8,7 mg/dl já referido.

Apesar da PCR associar um baixo valor predictivo positivo a uma especificidade variável consoante os estudos, a facilidade do seu doseamento, a sua correlação com a evolução clínica da infecção e o seu baixo custo, tornam-na num indicador habitualmente utilizado no diagnóstico da infecção e na monitorização da terapêutica antibiótica [509, 510].

Whischmeyer *et al.* estudaram a morbidade infecciosa numa população de doentes queimados, nutridos por via parentérica suplementada com glutamina durante 14 dias, verificando que esta era capaz de melhorar a morbidade infecciosa traduzida pela redução do valor sérico da PCR no grupo glutamina comparativamente ao grupo controlo [314]. Outros autores encontraram resultados semelhantes, mas sem o significado estatístico do estudo antes citado [511].

4.2.3. Resposta Imunológica

A extrapolação dos resultados experimentais para a prática clínica nem sempre reflecte os benefícios que tínhamos observado, pois por vezes, as células imunes de espécies diversas respondem de forma diferente à adicção de imunonutrientes.

Para além disso, está bem caracterizada no homem a grande variabilidade da resposta imunológica, determinada pelo padrão genotípico individual, condicionando um polimorfismo do fenótipo regulador da expressão de

citoquinas e de moléculas de adesão, o que torna difícil definir o que é uma resposta normal.

Influenciam igualmente o padrão da resposta final o passado do indivíduo e a memória adquirida, bem como o perfil de hábitos e co-morbilidades.

Por isso, nem sempre é fácil antecipar os resultados de uma terapêutica imunomoduladora.

Apesar disso, há que reconhecer que, em doentes graves, as estratégias que melhoram a resposta imune se associam à redução da incidência e gravidade das infecções [477].

Embora os relatos publicados na literatura sejam pródigos na descrição global da resposta imunológica à agressão, caracterizando-a como pequenos períodos de SIRS entrecortados por longos períodos de CARS, pouco se sabe dos resultados da terapêutica imunomoduladora sobre as células de defesa imunitária.

Apesar da glutamina ser o aminoácido mais estudado das últimas décadas, a evidência publicada no homem sobre os seus efeitos moduladores da estimulação, diferenciação, proliferação e regulação da resposta imunitária são escassos e, em muitas circunstâncias, inexistentes.

Embora isso aumente o interesse do presente trabalho de investigação, dificulta e, por vezes, impede a comparação dos resultados que obtivemos na análise da expressão de marcadores celulares de linfócitos e de monócitos com os de outros estudos.

Tendo em conta as limitações aqui expostas, decidimos analisar os resultados em função do padrão de resposta imunológica habitual de uma população de doentes graves de Medicina Intensiva.

4.2.3.1. Resposta Linfocitária T

Nas primeiras 24 horas pós-agressão o organismo desencadeia um mecanismo de controlo negativo da resposta inflamatória (CARS) que pretende conter a magnitude inflamatória característica da fase inicial (SIRS), constituindo a resposta orgânica de adaptação a uma agressão, com o objectivo de manter a homeostase. Esta nova fase de imunodepressão [512-514] é caracterizada por anergia linfocitária, pela redução do número e da funcionalidade de monócitos e pelo aumento da apoptose responsável pela

diminuição do número de linfócitos, monócitos e macrófagos, mediadas pela elevação de citocinas anti-inflamatórias [512-518].

Esta redução física e/ou funcional de linfócitos, monócitos e polimorfonucleares (PMN) aumenta a probabilidade de infecções secundárias, que agravam o prognóstico da agressão inicial.

Este estado de imunossupressão é uma característica constante em doentes sujeitos a agressões de qualquer tipo, estando bem caracterizado na literatura, sobretudo após agressões infecciosas [519]. Tal estado compromete a evolução clínica do doente e determina o prognóstico vital [520, 521] pelo que o devemos encarar como falência orgânica, semelhante a outras que já quantificávamos, caracterizá-lo através do estudo das populações linfocitárias e eventualmente tratá-lo como a outras imunodeficiências.

Este estado de imunodeficiência funcional que se estabelece após uma agressão grave é acompanhado por uma linfocitopenia que está bem caracterizada na literatura [522-532], facilitada pela diminuição da produção de citocinas (IFN- γ e IL-2) pelas células mononucleares periféricas [533-535].

No nosso estudo verificámos que no momento da randomização havia uma diminuição global dos linfócitos, com redução do número de timócitos, e da diferenciação TCD4 e TCD8, característicos do estado de imunodepressão já referido.

Habitualmente os doentes graves, em particular se infectados, cursam com uma diminuição dos linfócitos TCD4 activados, tendo por isso uma reduzida capacidade de resposta ao estímulo mitogénico [453, 454]. Este fenómeno é agravado pela diferenciação preferencial dos restantes TCD4 em células Th2 produtoras de citocinas anti-inflamatórias das quais a IL-10 é a mais conhecida [536].

Este estado de imunodepressão inicial, comum a ambos os grupos, foi parcialmente corrigido com a suplementação de glutamina, responsável pelo aumento do número de linfócitos totais, timócitos e células TCD4 e TCD8. As diferenças entre os grupos de estudo assumiram, em algumas populações linfocitárias, um significado estatístico importante ao 10º dia após o início da suplementação.

Este benefício da glutamina que observámos no nosso estudo, já antes havia sido referido por alguns autores que demonstraram em modelos experimentais

que a suplementação nutricional com glutamina aumentava a proliferação de células T [537].

Há quase 15 anos Peter Fürst *et al.* publicaram [93] um memorável artigo de revisão sobre glutamina, no qual referiam que o sistema imunológico e a mucosa intestinal constituem os locais preferenciais de utilização ou metabolização da glutamina, precisando para isso de quantidades de glutamina diárias (10 a 13 g/dia) superiores às necessárias para influenciarem o balanço azotado ou normalizar a sua concentração sérica.

Parte da glutamina que chega às células do sistema imune não vai ser consumida em energia, mas transformada em glutamato, lactato e aspartato e usada para a síntese de macromoléculas [125], conferindo-lhe um importante papel na proliferação linfocitária, evidenciada *in vitro* após estimulação mitogénica, tanto em experimentação animal [248, 538] como no Homem [241-243].

O crescimento de linfócitos em meio de cultura é proporcional à quantidade de glutamina presente no meio. Wu e colaboradores [239] usaram, *in vitro*, um meio depletado de glutamina (0,01 mM) que iam enriquecendo gradualmente até atingir valores próximos das concentrações plasmáticas habituais (0,5 mM), verificando que níveis crescentes de glutamina se associavam ao aumento da proliferação linfocitária.

Mesmo em situações de repouso, os linfócitos têm elevada avidéz pela glutamina [255, 539], que aumenta quando são estimulados [150, 256, 257].

A redução dos níveis de glutamina sérica associa-se a limitação da proliferação linfocitária, da produção de IL-2 e de IFN- γ e à diminuição da expressão de marcadores de activação à superfície das células T, com redução do número de linfócitos TCD4. A IL-2 é necessária para garantir a expansão clonal de linfócitos T e para prevenir a apoptose, através do aumento da expressão de proteínas anti-apoptóticas (Bcl-2), contribuindo para a transformação de células T activadas em células T de memória.

A administração de glutamina permite reverter estas alterações. Estudos *in vitro* demonstram que a inclusão de glutamina num meio que contenha linfócitos T activados faz aumentar, de forma “dose-dependente”, a produção de IL-2, assim como a expressão de receptores para esta interleucina à superfície dos linfócitos, contribuindo para a sua proliferação [540].

Neste estudo verificámos que a glutamina restaura a capacidade de defesa aumentando o número de linfócitos T ao longo do tempo, com uma diferença estatisticamente importante comparativamente ao grupo controlo, para a expressão TCD3 e TCD4 ao 10^o dia de tratamento.

A quantidade de glutamina que usámos (25 gramas de glutamina/dia) estava dentro dos padrões habitualmente descritos na literatura (> 20 g/dia) para se obterem os benefícios da imunomodulação [541].

A capacidade da glutamina interferir com a actividade funcional linfocitária é patente em diversos estudos [243, 311, 312].

Doentes com carcinoma esofágico tratados com quimio e radioterapia, recuperavam mais depressa o número e a funcionalidade dos seus linfócitos quando o suporte nutricional era adjuvado com glutamina (30 g/dia) durante 28 dias [254].

A nutrição parentérica com glutamina em doentes sujeitos a transplante medular reduz o número de infecções e o tempo de internamento hospitalar, comparativamente a um outro grupo sem glutamina [389]. Num relato posterior, Ziegler *et al.* [259] demonstravam que os doentes tratados com glutamina tinham, após a alta, aumento do número de linfócitos T circulantes, sobretudo CD4 (mas não de linfócitos B ou de células NK). Os autores sugerem que a glutamina aumenta especificamente o número e a diferenciação de linfócitos T, o que conduz à redução do número de infecções.

Num grupo de doentes sujeitos a cirurgia colo-rectal por neoplasia, a nutrição parentérica suplementada com glutamina, aumentava o número e a diferenciação linfocitária após estimulação mitogénica [243], sugerindo que a glutamina ampliava a funcionalidade linfocitária de doentes em risco séptico.

Também Morlion *et al.* [136] demonstravam um aumento do número de linfócitos no pós-operatório de doentes suplementados com alanyl-glutamina.

Este é um dos poucos exemplos em que existem vários resultados de ensaios clínicos em populações de doentes graves traumáticos, médicos e cirúrgicos confirmando o benefício da glutamina no aumento da expressão TCD4 e da relação TCD4/TCD8 [311, 312, 314, 511], evidenciando o papel deste aminoácido na diferenciação preferencial de linfócitos Th1 em populações de doentes sujeitos a agressões variadas.

Verificámos que havia um aumento global dos linfócitos T naife induzido pela glutamina, traduzindo a existência de um conjunto de células linfocitárias prontas para serem estimuladas pelas células apresentadoras de antígenos e se diferenciarem em células efectoras. Tratava-se de um aumento precoce e significativo da população de linfócitos totais T naife (CD45RA CD3), sendo gradual (entre o 1^a e 10^a dia) para a estimulação de timócitos T naife activados (CD45RA CD25CD3), verificando-se o oposto no grupo controlo.

A glutamina contribuiu para manter o número de células T naife que se diferenciaram em TCD4, contrapondo o grupo controlo que registou uma diminuição entre o 1^o e o 10^o dia da intervenção imunomoduladora. Assim, o aumento do número de timócitos (CD3) T naife, associado à manutenção do número de células naife TCD4, levam-nos a concluir que a glutamina favoreceu sobretudo o aumento dos linfócitos TCD8 a partir das células T naife.

Este aumento do número de células T naife induzido pela glutamina traduz potencial para o início da activação e proliferação celular T desde que existam células estimuladoras e citoquinas promotoras das células T activadas. Verificámos na avaliação de regressão logística que a recuperação do número de linfócitos TCD4 ao 10^o dia se correlacionava de forma directa com a redução da infecção, com um valor próximo do grau de significância estatística ($p = 0,07$).

4.2.3.2. Activação e Estimulação Linfocitária T

A capacidade de apresentação antigénica das células dendríticas às células T constitui um passo fundamental para o reconhecimento de agentes agressores pelas células da imunidade celular.

As células dendríticas aumentam no pós-operatório imediato para decaírem logo depois pelo 2^o ou 3^o dia após cirurgia [542].

Verificámos que no grupo controlo havia um aumento do número de células dendríticas circulantes ao 5^o dia, que regrediam ao 10^o dia para os valores do início do estudo.

Em politraumatizados há vários relatos que apontam para a disfuncionalidade das células dendríticas [543, 544], com diminuição da produção de IL12 e incapacidade de induzirem a proliferação e diferenciação de linfócitos T.

A gravidade da agressão contribui para a diminuição das células dendríticas circulantes. Existe uma relação negativa entre valores de SAPS II elevados e o número de células dendríticas circulantes, sendo a redução destas mais acentuadas nos não sobreviventes [545].

Hotchkiss [546] estudou post-mortem o baço de doentes sépticos e politraumatizados, verificando que a sépsis causou uma redução importante da área do baço correspondente às células dendríticas foliculares.

Diversos estudos demonstram que, na população de doentes críticos, existe uma relação entre a redução do número de células dendríticas e o desenvolvimento de choque séptico [545]. Nestes doentes, o aumento de mortalidade relaciona-se com valores mais baixos de células dendríticas circulantes. Esta redução é consequência do aumento da apoptose, mediada pela caspase 3 [547].

Neste estudo verificámos que a glutamina faz aumentar o número de células dendríticas comparativamente ao grupo controlo, mas sem atingir um grau de significado estatístico.

A expressão CD25, sinalizadora do número de linfócitos T activados, está diminuída no grupo controlo.

Confirmámos no nosso estudo que, os doentes suplementados com glutamina, apresentavam um aumento importante da expressão CD25 (receptor da IL2) à superfície dos linfócitos T, traduzindo potencial estimulação. Há também aumento da expressão CD25 à superfície dos timócitos (CD3), favorável ao grupo glutamina, atingindo ao 10º dia, valores estatisticamente significativos comparativamente ao grupo controlo.

Como vimos nos capítulos iniciais, não é suficiente aumentar o número de linfócitos se não existirem moléculas de co-estimulação à superfície das células apresentadoras de antígenos e dos linfócitos T, capazes de interagir entre si e activarem os linfócitos estimulados.

O número de moléculas de co-estimulação CD69, CD28 e CD26 à superfície dos linfócitos T, estão globalmente reduzidos no grupo controlo, traduzindo uma incapacidade funcional da activação dos linfócitos estimulados.

Nesta fase de imunodepressão, predominam à superfície das células T os co-receptores inibidores (PD-1, CTLA-4 e CD47) [548]. Este aumento dos co-receptores, em especial o CTLA-4, associa-se à diminuição da expressão dos

co-receptores activadores, sobretudo CD28 ou CD3 [549]. Alguns autores [532] descrevem um estado de imunoparalísia pós-traumático caracterizado por aumento da expressão de co-receptores inibidores (PD-1, CTLA-4) e redução de receptores estimuladores à superfície dos linfócitos.

Manjuck *et al.* [523] observou que, em doentes sépticos, havia uma diminuição da resposta à toxina tetânica, que se associava à diminuição da expressão HLADR e CD86 à superfície dos monócitos e de CD28 à superfície dos linfócitos, com aumento da expressão de co-receptores inibidores (CTLA-4). A magnitude deste estado de anergia associava-se ao aumento da falência de múltiplos órgãos e de novas infecções nosocomiais.

Verificámos no grupo glutamina um aumento da expressão das moléculas de co-estimulação CD69 e CD28, com uma diferença significativa ao 10º dia face ao grupo controlo, tanto nos linfócitos TCD4 como nos TCD8, traduzindo uma capacidade funcional mantida nas principais populações linfocitárias, contribuindo para a reversão da depressão imunitária característica destes.

Da mesma forma, a expressão de receptores co-estimuladores à superfície dos linfócitos está sempre diminuída no grupo controlo, passando-se o contrário no grupo glutamina, em que registámos um aumento significativo para a dupla expressão TCD69CD3 ($p=0,09$) e TCD69CD4 ($p=0,04$), marcadores de co-estimulação precoce, favorecendo a activação de linfócitos Thelper e da expressão TCD28 ($p=0,04$) e TCD28CD8 ($p=0,002$), traduzindo potencial de activação significativo da população de linfócitos T citotóxicos.

Registámos ainda, no grupo glutamina um aumento da expressão de receptores co-estimuladores TCD26 e de linfócitos T activados que expressam CD26 (TCD26CD25), traduzindo a possibilidade de migração destes linfócitos para os tecidos periféricos, participando no controlo efectivo do processo inflamatório.

O aumento da expressão de receptores de co-estimulação (com potencial de interagirem com as moléculas da família B7 à superfície das células apresentadoras de antígenos) contribuem para estimular a resposta celular T, com aumento de produção de IL2, diferenciação das células T naífe em células T efectoras e aumento da sobrevivência dos linfócitos T.

Este aumento da capacidade de activação observado no grupo glutamina demonstra, mais uma vez, o papel deste aminoácido na correcção do estado

de anergia imunitária característica da população de doentes graves de Medicina Intensiva.

A glutamina aumenta também significativamente a expressão de marcadores de estimulação linfocitária tardia, ilustrada pela capacidade dos linfócitos reconhecerem os antígenos peptídicos, (que lhes são apresentados pelas células da imunidade inata), com aumento da expressão HLADR CD3 e HLADR CD25 CD3.

Embora a activação de linfócitos T por aumento da expressão de CD25 após a utilização de glutamina já tivesse sido referida na literatura [260, 261], o aumento significativo da co-expressão de outras moléculas de estimulação à superfície dos linfócitos induzida pela glutamina nunca antes havia sido referida.

Assim, tendo em conta o significado prognóstico que a redução de moléculas de apresentação e de co-estimulação das células linfocitárias T têm na população de doentes graves, julgamos poder concluir que a glutamina ao normalizar a expressão dessas moléculas à superfície das células T, contribuiria para a correcção da depressão imunitária e para a redução da morbimortalidade deste grupo de doentes.

A análise de regressão logística que realizámos não nos permite estabelecer uma relação clara entre a correcção da expressão de moléculas de co-estimulação e a diminuição do número de infecções na população de doentes que estudámos. Pensamos que tal facto se deve ao reduzido número de doentes incluídos neste estudo.

4.2.3.3. Activação de Monócitos

Os monócitos circulantes podem, desde que tenham estímulo apropriado, migrar para os locais de inflamação e diferenciarem-se como células apresentadoras de antígenos ou, em alternativa, colonizarem diversos órgãos aí funcionando como macrófagos residentes.

A magnitude da agressão, particularmente se associada a quadros graves de infecção, contribui para a redução da sua expressão sérica, associada sempre a piores prognósticos [550, 551].

Enquanto que no grupo controlo houve uma redução do número de monócitos ao longo do tempo de estudo, no grupo glutamina registou-se uma recuperação

dos baixos valores iniciais, atingindo ao 10^o dia uma diferença com significado estatístico comparativamente ao grupo controlo.

Julgamos que esta recuperação da população de monócitos circulantes tradutora de uma melhor capacidade de defesa imunitária, poderá ser responsável pela redução do número de episódios infecciosos registados no grupo suplementado com glutamina.

As infecções graves cursam com redução da expressão HLADR à superfície dos monócitos [454], traduzindo um estado de imunodepressão característico da CARS que compromete a apresentação antigénica aos linfócitos T [552].

No grupo controlo há uma incapacidade de apresentação antigénica tradutora de um estado de depressão imunitária, caracterizada pela impossibilidade de sensibilizar e estimular as células T com diminuição do número de células dendríticas e da expressão HLADR à superfície de linfócitos e monócitos (CD14 HLADR).

Demonstrou-se que a perda de expressão CD14 HLADR se devia a uma regulação global a nível transcripcional de todos os genes restritos do MHC II (*major histocompatibility complex class II*), e que a magnitude desta alteração afectaria o prognóstico [553].

De facto, o número e a funcionalidade dos monócitos circulantes é objecto de grande interesse por parte dos investigadores. A sua redução, tradutora de imunodepressão, constitui marcador de prognóstico de morbilidade e de mortalidade, particularmente em doentes sépticos [554].

Os monócitos de doentes sépticos mostram diminuição da produção de citocinas pró-inflamatórias (TNF α , IL 1 α , IL-6 e IL12) e da produção de IFN γ em resposta à estimulação antigénica [555, 556], aumentando por outro lado a produção de citocinas anti-inflamatórias (IL10 e IL1ra) [557-562].

Diversos estudos demonstram que a IL10 permanece elevada nos não sobreviventes [563, 564] e correlaciona-se negativamente com a capacidade de expressão de CD14 HLADR [564, 565]. Do ponto de vista molecular há um aumento da actividade mRNA IL10 [566-568]. É curioso verificar que outras citocinas anti-inflamatórias como o TGF β , não estão aumentadas nem se correlacionam com o prognóstico vital nestes doentes, conferindo assim à IL 10 um papel primordial na génese da imunodepressão em doentes sépticos [533, 556, 564, 568-570].

O aumento da produção de citocinas anti-inflamatórias pelos mononucleares vê-se ampliado pela modificação do padrão fenotípico dos linfócitos T, com predomínio dos Th2, produtores de citocinas (IL4 e IL10), que estimulam a imunidade humoral e a actividade anti-inflamatória. A reversão desta resposta Th2 melhora a sobrevida [512, 571].

A redução da expressão CD14 HLADR no grupo controlo, associado ao maior número de infecções destes doentes durante o internamento, ilustra bem o papel que estas células têm na imunodepressão característica da CARS.

Já outros autores haviam referido que após uma agressão cirúrgica os níveis de expressão de CD14 HLADR se correlacionavam com o risco de infecções sépticas [572, 573].

Também em doentes que sofreram enfarte cerebral há uma estreita relação entre o desenvolvimento de infecções e o declínio da expressão CD14 HLA DR [574].

A magnitude da redução da expressão HLA DR à superfície dos monócitos e o tempo de demora na sua recuperação, correlaciona-se também com o prognóstico de doentes politraumatizados [520], identificando aqueles com maior probabilidade de infectar ou morrer após a agressão [575].

Num estudo realizado em politraumatizados, Walsh *et al.* [576] verificou que a redução CD14 HLADR se estabelece de imediato (2º dia), recuperando muito lentamente ao longo do internamento, correlacionando-se inversamente com o *score* de gravidade que caracteriza o trauma (ISS – *Injury Severity Score*) [577] e comprometendo o prognóstico destes doentes [551, 575].

A diminuição de CD14 HLADR constitui assim, um marcador de mau prognóstico em doentes graves, associado à maior probabilidade de desenvolver SIRS e infecções com aumento do tempo de internamento e da mortalidade.

Este valor predictivo precoce torna importante a sua quantificação [520, 578] permitindo seleccionar sub-grupos de risco candidatos a terapêutica imunomoduladora [579].

Alguns autores estabeleceram níveis abaixo dos quais (< 70%) a expressão de CD14 HLADR se associava a aumento das infecções nosocomiais [580-582] após trauma, cirurgia ou pancreatite [520, 548, 562, 575, 579, 582-585].

Quando os monócitos depletados de glutamina são expostos à hipertermia, formam agregados e alteram-se morfológicamente, reduzindo a sua

capacidade fagocitária e a expressão HLADR, tornando-se mais frágeis e sujeitos à apoptose.

Neste estudo demonstramos que a glutamina estimula de forma significativa a proliferação de monócitos e o aumento da expressão HLADR à sua superfície, traduzindo uma melhor capacidade funcional na participação de apresentação antigénica às células da imunidade celular.

A glutamina tem um papel fundamental na manutenção da expressão HLA DR à superfície dos monócitos de doentes sujeitos a cirurgia electiva, comprovado quer por experiências *in vitro* com redução destas células monocitárias quando colocados num meio com glutamina em baixas concentrações [586], quer *in vivo* demonstrando que a suplementação parentérica de glutamina impede a redução da expressão CD14 HLA DR nas primeiras horas após uma agressão cirúrgica [333].

Roth *et al.* demonstraram que reduzindo a concentração de glutamina no meio de cultura diminuía significativamente a expressão HLADR à superfície dos monócitos e a apresentação antigénica da toxina tetânica às células efectoras da resposta imune [586].

In vivo a utilização de glutamina por via entérica aumenta os níveis de HLA DR à superfície dos monócitos, contribuindo para a redução do número de infecções, pneumonias, sépsis e bacteriémias [258, 363].

No nosso estudo verificámos que a expressão CD14 HLADR do grupo suplementado com glutamina se aproximava mais do valor (> 70%) referido na literatura como associado à redução de infeções nosocomiais. Mais importante do que um valor *per si* será a tendência do grupo glutamina comparativamente ao controlo, de aumento gradual deste marcador ao longo do tempo de estudo, com maior capacidade para resistir às agressões infecciosas nosocomiais.

É importante salientar que na análise de regressão logística que efectuámos os níveis de CD14 HLADR ao 10º dia se relacionavam de forma independente com a redução de infecção ($p=0,04$).

Nem sempre este aumento da morbilidade se associa a aumento da mortalidade; muitos destes doentes embora apresentem, principalmente nas fases iniciais, valores baixos de CD14 HLADR, vêm a recuperar espontâneamente ao longo do tempo. Este potencial de recuperação temporal associa-se a capacidade de sobreviver [579].

Esta associação entre o aumento da mortalidade e a redução de CD14 HLADR é controversa, existindo relatos que a sustentam [563, 570, 587] e outros que o não fazem [565, 588, 589]. A metodologia questionável de alguns destes estudos, particularmente os que não confirmam tal relação, ajuda a compreender a discrepância de opiniões.

Assim, Monneret *et al.* demonstraram que a redução da expressão CD14 HLADR é um factor independente para a mortalidade, com melhor valor predictivo do que outros marcadores de gravidade como o SAPSII e o SOFA [515].

O CD14 HLADR tem sido um dos marcadores mais estudados nos últimos anos, usado para caracterizar os estados de imunodepressão em doentes graves de MI, posicionando-se como marcador de futuro para seleccionar os doentes candidatos a terapêutica imunoestimuladora.

É um marcador de prognóstico que abaixo de determinados valores (< 70%) se associa a aumento da morbidade infecciosa e da mortalidade, permitindo seleccionar os candidatos a terapêutica imunoestimuladora com interferon γ [590]. Constitui, de momento, uma opção ainda experimental, sendo necessários mais estudos, sobretudo com avaliações seriadas ao longo do tempo, para podermos afirmar que existe vantagem nesta opção terapêutica.

Actualmente, o uso de glutamina como nutriente condicionalmente essencial na população de doentes graves, produto de síntese mas isento de efeitos secundários, poderá ser opção para imunomodular a população de doentes críticos imunodeprimida em consequência da CARS.

Por isso, a acção da glutamina ao corrigir de forma significativa a depressão funcional da população monocitária, permite classificá-la como um imunomodulador natural responsável pela redução da morbidade infecciosa evidenciada neste estudo.

4.2.3.4. Apoptose e Actividade T reguladora

A estimulação da apoptose por aumento da expressão CD95L à superfície das células T, e o aumento do número de células T inibidoras (T reguladoras e Foxp3), caracterizadas respectivamente pelo aumento da expressão TCD4 CD25 e TCD4 CD25high CD127, contribuem para a redução do número de linfócitos circulantes [591, 592] que observámos no grupo controlo.

Verificámos no nosso estudo que a glutamina exerce um papel importante na redução da apoptose linfocitária traduzida pela diminuição da expressão CD95L à superfície dos linfócitos. Há algumas referências na literatura, sobretudo em modelos experimentais [540], semelhantes aos resultados que encontrámos.

Isto acontece pela acção exercida pela glutamina a nível molecular sobre a estabilização do Fas-ligand e das caspases mitocondriais [232, 593, 594], assim como na manutenção dos níveis intra-celulares HSP [233] e na recuperação do glutatião [228, 235] salientando a importância deste aminoácido na preservação da integridade das células de defesa imunológica. As Treg CD4+CD25+Foxp3 suprimem a actividade proliferativa e a resposta mediada por citocinas das células APC [50] [51], comprometendo a capacidade de defesa orgânica.

Em doentes sujeitos a agressões infecciosas [518] ou traumáticas [595] há um aumento dos linfócitos Treg (TCD4+CD25+) resultado da diminuição das células TCD4+CD25- [596].

Estas células têm uma função reguladora da resposta imune inata e celular [597], pelo que se julga serem responsáveis pelo estado de imunodepressão em que estes doentes se encontram.

Esta situação é ilustrada numa população de doentes em choque séptico em que o aumento das Treg se correlaciona com a diminuição da proliferação linfocitária [598] e da resposta Th1, contribuindo para a imunoparalísia evidenciada em animais e no homem [595, 599].

Num artigo recentemente publicado [600] Hiraki descreve um aumento da expressão Treg em doentes sépticos, acompanhado de um aumento da IL10 em circulação, propondo a neutralização da IL10 ou do TGF- β como forma de controlar o estado de imusupressão nestes doentes.

A expressão TCD4CD25 é directamente proporcional à gravidade do doente (APACHE II) e à gravidade do quadro séptico [518] sendo a sua actividade supressora potenciada pelo aumento da expressão Foxp3 [601, 602].

Verificámos que a glutamina reduz a percentagem de células T reguladoras (TCD4 CD25 e das Foxp3 - TCD4 CD25^{high} CD127) com uma tendência importante para a população Treg ($p=0,09$) e um significado estatístico determinante para as Foxp3 ($p=0,009$).

A glutamina poderá funcionar como imunomodulador natural reduzindo a expressão Treg à superfície dos linfócitos, contribuindo para corrigir o estado de imunodepressão em que estes doentes graves se encontram (aqui caracterizados pelo grupo controlo) confirmando assim o papel da glutamina na imunomodulação.

Este benefício da glutamina que observámos sobre a redução do número de células T reguladoras não aparece descrito na literatura, mas é importante para garantir a manutenção das células apresentadoras de antigénios (células dendríticas, macrófagos e células NK) e das populações linfocitárias TCD4, TCD8 e CD45RA, necessárias à manutenção da capacidade funcional da resposta imunológica.

A manutenção da capacidade apoptótica das células T é crucial para a manutenção da homeostase. Contudo, quando está aumentada, contribui para a redução do número de linfócitos e monócitos responsáveis pela anergia imunológica característica da CARS.

O aumento da apoptose das células de defesa orgânica é outra das marcas da sépsis, e alguns autores associam-na à disfunção imune e à falência múltipla de órgãos que ocorre após a agressão infecciosa. Ambos os receptores (mitocondriais e da parede celular) parecem estar envolvidos na apoptose, sendo activados por inúmeros estímulos (esteróides, citocinas pró-inflamatórias, Fas ligand, HSP, radicais livres, óxido nítrico e alguns linfócitos) [517, 603-605].

Hotchkiss *et al.* [592, 606] realizaram trabalhos em cadáveres, analisando os baços de doentes com sépsis, e confirmaram a perda de células da imunidade celular por apoptose, com redução dos linfócitos TCD4 e NK no baço, tecido linfóide intestinal e sangue periférico. Esta perda é importante porque ocorre durante o processo séptico, quando se esperaria que estas células estivessem em ampla actividade funcional [512].

Le Tulzo [591] confirma um aumento da apoptose dos linfócitos circulantes em doentes em choque séptico comparativamente a outros doentes sem sépsis ou a adultos sãos. Estes doentes têm também uma redução da expressão do gene anti-apoptótico Bcl2 nos monócitos circulantes [607].

A apoptose de células linfocitárias activadas resulta da interacção entre o CD95 (Fas/APO-1) expresso à superfície das células T com o seu ligante (CD95L)

[608, 609],[610], capazes de recrutarem caspases (proteases de cisteína) que sequencialmente vão activando outras (caspase 8, caspase 3, caspase 6, caspase 7, proteínas Bcl-2) com propriedades destruidoras, culminando na morte celular [611, 612].

O balanço entre a apoptose e a sobrevivência da célula é mantido por proteínas da família Bcl-2, com actividade dupla pró-apoptótica (proteínas Bax e BH3) e anti-apoptótica (Bcl-2) centrada na integridade mitocondrial.

As células depletadas de glutamina são mais sensíveis à apoptose por Fas-ligand [234]. Num meio sem glutamina a apoptose destas células aumenta de uma forma dose-dependente com o aumento de Ac anti-Fas mas, quando se junta glutamina ao meio, há redução da apoptose porque as células deixaram de ser activadas pelo ligante do Fas, demonstrando o papel exercido pela glutamina na prevenção da apoptose [321]. Esta acção anti-apoptótica da glutamina é mediada a nível molecular pela supressão da actividade de cinases ASK1 e das vias JNK/SAPK após activação Fas ligante.

A glutamina reduz a expressão CD95L à superfície linfocitária e aumenta a expressão de CD45RO e Bcl-2, moléculas anti-apoptóticas [216].

É possível comprovar *in vitro* que a glutamina está associada à diminuição da expressão CD95L à superfície das células linfocitárias, contribuindo para a redução da activação de caspases o que, associado ao aumento da expressão de proteínas anti-apoptóticas (Bcl-2), impede a apoptose de células T activadas contribuindo para o aumento de células T de memória [540].

Foi demonstrado, em modelos *in vitro*, que a glutamina reduz significativamente a actividade das caspases 3 e 8 em células T activadas [216] conferindo-lhes um efeito protector da apoptose induzida pelo CD95.

Não são só os linfócitos T as vítimas desta apoptose aumentada, também as células dendríticas esplénicas [542] e os monócitos/macrófagos circulantes [613] vêem o seu número reduzido por aumento da apoptose.

Como estes autores, confirmamos o papel anti-apoptótico exercido pela glutamina, demonstrando que ao contrário do grupo controlo, a glutamina diminui os níveis de CD95L à superfície de linfócitos, contribuindo com a redução da apoptose para a manutenção do número destas células de defesa imunitária contrariando assim o estado de imunodepressão em que estes doentes se encontram.

Verificámos igualmente que no grupo glutamina não houve aumento da expressão CD95L à superfície dos monócitos, ao contrário do grupo controlo em que essa expressão aumentou ao longo do tempo do estudo, para assumir uma diferença estatisticamente significativa ao 10º dia após a intervenção terapêutica. Esta constitui assim uma forma de preservar a população de monócitos necessária para a estimulação da imunidade celular, fundamental para combater o estado de imunodepressão característico destes doentes.

Há uma estreita relação entre *stress* oxidativo e apoptose. A redução de glutamina faz aumentar a produção de radicais livres que culminarão na morte celular [614, 615]. A manutenção do estado *redox*, através dos níveis de glutatião, é fundamental para o funcionamento de diversos mecanismos responsáveis pela manutenção da integridade celular, com activação da transcrição de genes específicos que regulam a proliferação celular, a apoptose e a inflamação.

A glutamina tem um papel fundamental na preservação das reservas hepáticas [225] e intestinais [616] de glutatião, contribuindo para a manutenção do potencial anti-oxidante.

A metabolização da glutamina pelas células T produz energia sob a forma de ATP's [242, 256, 539] e o precursor necessário (glutamato) para a síntese do glutatião [617].

Estudos *in vitro* estabelecem uma correlação entre a suplementação de glutamina e a redução significativa da produção de radicais livres pelas células T activadas, com aumento da concentração de glutatião intra-celular, sugerindo que a modulação da glutamina na apoptose destas células seria feita pela manutenção do estado *redox* intra-celular [618-621].

A preservação da integridade celular é mediada igualmente pela manutenção dos níveis de HSP, verificou-se que politraumatizados, doentes sépticos ou com ARDS, têm redução da expressão de HSP-70 em polimorfonucleares, monócitos e linfócitos [172, 187, 188], sendo essa redução mais acentuada em indivíduos com baixas concentrações séricas de glutamina [622].

Neste estudo não medimos os níveis de glutatião nem os títulos de HSP mas, poderíamos especular dizendo que este papel da glutamina sobre a manutenção da integridade celular vem complementar o efeito directo desta sobre os mecanismos de controlo da apoptose, garantindo um número de

células suficiente para impedir a anergia imunológica responsável pela sobreinfecção secundária por nós observada.

4.2.3.5. Células NK

Neste estudo verificámos que no grupo controlo havia uma redução da expressão CD56 do 5^o para o 10^o dia e da dupla expressão CD16CD56 ao 10^o dia após o início do suporte nutricional, que poderá traduzir algum grau de imunodepressão associado à síndrome CARs.

A diminuição da população de células NK no grupo controlo pode estar relacionada com a redução das células Treg que podem suprimir a proliferação, libertação e actividade citotóxica das células NKT [623].

As células NK constituem um subgrupo de linfócitos citotóxicos capazes de reconhecerem e destruírem as células tumorais ou infectadas por vírus sem activação prévia dos linfócitos T CD8.

Depois de recrutadas por quimiocinas (CXCR1 e CX3CR1) para os territórios inflamados as NK interagem com outras células da imunidade inata (células dendríticas imaturas imediatamente após contacto com antígeno) através de mecanismos de contacto celular (receptores/ligands) e activação de factores solúveis, libertando citocinas estimuladoras da resposta inflamatória [461].

No início do processo inflamatório, as PAMP's fixadas aos TLR podem não estar ligadas às células NK ou às células dendríticas mas envolverem mastócitos residentes, neutrófilos, eosinófilos ou plasmócitos. Estes, libertando outras citocinas (IL-4, IFN γ e IL-18) além da IL-12 podem modular a capacidade funcional das NK contribuindo para a maturação das células dendríticas que após migração para os gânglios linfáticos, estimulam as células T para uma resposta Th1 [624, 625] ou a resposta de memória TCD8 promotoras da destruição de microrganismos fagocitados [626].

As células NK são a principal fonte de IFN γ , capazes de activarem macrófagos que destruirão agentes patogénicos fagocitados antes da activação das células T.

Assim, o resultado desta interacção, influencia definitivamente a qualidade e o tipo e resposta imunitária celular.

Por isso, as células NK, efectoras da imunidade inata, podem ser vistas como células reguladoras (dependentes das interacções celulares e do tipo de

citoquinas libertadas após agressão patogénica), importantes mediadoras do controlo das infecções, com capacidade para destruir agentes agressores e aumentarem a resposta imune celular através da síntese de citoquinas.

Não existem estudos acerca da relação da glutamina com as células NK na população de doentes graves internados em Medicina Intensiva. Rhode [627] demonstrou *in vitro* que a glutamina aumentava a actividade das células LAK (*limphokine activated killer cells*) e, que em períodos de treino físico intenso, havia uma relação entre a redução sérica de glutamina e as alterações funcionais destas células [628].

Na avaliação estatística multivariada empregando a análise de componentes categóricas principais (CatPCA) verificámos existir uma relação entre a glutamina e a redução da expressão CD56 no 1º dia de randomização, levando-nos a especular que os baixos níveis de glutamina existentes antes da suplementação se associariam a um perfil de depressão da estimulação imunológica.

Registámos depois que no grupo glutamina havia uma recuperação da expressão CD56 que ao 10º dia se aproximava do grau de significância estatística, acompanhada de um aumento ao 10º dia da expressão CD56CD3, CD56CD8, CD16, CD16CD3 e CD16CD8 sem mostrarem contudo para estas sub-populações uma diferença estatística significativa para o grupo controlo. Por fim registámos uma diferença estatística significativa da recuperação do 1º para o 10º dia da dupla expressão CD16CD56 no grupo glutamina, mas sem atingir significância estatística para o grupo controlo ao 10º dia após início da intervenção nutricional.

Demonstrámos assim neste estudo que a glutamina garante a actividade citotóxica, traduzida pela manutenção da expressão NK, com potencial para destruir agentes patogénicos antes da activação das células T, contribuindo para garantir uma defesa orgânica rápida e eficaz.

Assim, a glutamina pode exercer um duplo efeito, estimulando directamente as células NK e reduzindo indirectamente o número de células Treg, contribuindo para a manutenção da resposta imune inata e celular, importante factor no controlo da infecção.

4.2.3.6. Quimiocinas

As quimiocinas elaboradas nos tecidos lesados pelas células da imunidade inata, irão ligar-se a receptores (CCR5 e CXCR3) à superfície dos linfócitos Th1, promovendo a sua migração para os locais de inflamação [629].

Depois, o tipo de quimiocinas e de citocinas (IFN γ) libertadas no decurso do processo inflamatório aumenta a produção de CXCR3, o que irá influenciar a diferenciação e determinar o destino final das células T [471, 630].

Durante a sépsis, a capacidade de expressão de moléculas co-estimuladoras (CD86) e de quimiocinas (CX3CR1) à superfície dos monócitos, está também diminuída [551, 631-635].

Verificámos que a glutamina ajuda a coordenar o processo inflamatório, aumentando a expressão de receptores de quimiocinas à superfície de monócitos e de linfócitos Th1, fazendo-o preferencialmente através dos CXCR3. Podemos, dessa forma, especular, dizendo que a chegada de mais células efectoras aos locais de inflamação ajudarão a conter o processo infeccioso, contribuindo para a redução do número de infecções neste grupo.

No grupo controlo não houve modificação da expressão de receptores de quimiocinas ao longo do estudo. A expressão de receptores será influenciada pelos níveis de citocinas presentes, sobretudo do IFN γ [467]. O facto de que, no grupo controlo, a expressão Treg estar aumentada e a de TCD69 diminuída, demonstra incapacidade de estimulação precoce e diminuição do número de células T [629] com diminuição da produção de IFN γ . Isto limitará a expressão de receptores das quimiocinas, gerando uma incapacidade das células efectoras migrarem para os locais de inflamação e conterem as agressões infecciosas.

Apesar dos resultados aqui expostos, ainda não existe uma uniformidade de consenso acerca dos benefícios da glutamina sobre a modulação da resposta linfocitária, havendo relatos publicados que não mostram qualquer benefício nessa modulação [636]. Na maioria destes não foi atingida a dose mínima (0,35 g/Kg/dia), não existiu tempo de terapêutica suficiente (≥ 9 dias) ou o número de doentes era insuficiente para permitir evidenciar os benefícios da glutamina naquelas populações.

Assim, suportados pela evidência dos resultados imunológicos que obtivemos, poderemos afirmar que a administração de glutamina corrige o estado de depressão imunitária característica da população de doentes graves de Medicina Intensiva, aumentando o número e a diferenciação de linfócitos T, aumentando a capacidade de apresentação antigénica de monócitos e células dendríticas às células efectoras da imunidade celular, aumentando a expressão de moléculas co-estimuladoras à superfície das células T, reduzindo a apoptose e a expressão de células T reguladoras e promovendo a migração de células de defesa para os locais de inflamação e a capacidade de destruição precoce por manutenção da actividade de células NK.

Estas acções poderão ser responsáveis pela redução do número de doentes infectados e de episódios infecciosos durante o internamento no SMI e ainda pela redução da mortalidade no SMI, no Hospital e sobretudo na mortalidade aos 6 meses após o internamento.

4.2.4. SOFA e Tempo de Internamento

O SOFA é um indicador que, de forma contínua, descreve e quantifica vários graus de disfunção e falência de órgãos.

Esperávamos que esta melhoria do quadro infeccioso se traduzisse numa redução significativa do número de falências multiorgânicas objectivadas pelo SOFA. Contudo, apesar de ao 10^o dia de tratamento e no momento da alta, o grupo glutamina apresentar uma maior redução do seu valor mediano, tais diferenças não revelaram um significado estatístico quando comparadas com o controlo.

Os valores de SOFA obtidos no nosso estudo foram superiores aos de outros estudos multicêntricos que incluíam SMI's portugueses que apresentavam valores médios de SOFA de $4,5 \pm 3,3$ para o SOFA 0 e de $3 \pm 3,3$ para o Delta SOFA [448, 637]. O facto dos valores que encontramos serem mais elevados traduz a gravidade da população que estudámos.

Tal como Wenermam [638] que recentemente publicou os resultados de um estudo multicêntrico escandinavo, onde concluiu que a suplementação com glutamina não influenciava o *score SOFA* durante o tempo de internamento na UCI, também nós não conseguimos estabelecer uma relação significativa entre

a glutamina e a correcção da gravidade das falências multiorgânicas existentes.

O SOFA é um excelente indicador individual, avaliando a evolução das falências de cada doente ao longo do tempo, mas pouco funcional enquanto indicador de tendência de grupo.

Embora alguns estudos publicados refiram que a glutamina reduz o tempo de internamento hospitalar, [389, 390] outros há em que essa diferença não é evidente [312]. Os nossos resultados inserem-se nesta última categoria, já que também não encontrámos diferenças significativas para qualquer dos grupos nos tempos de internamento quer no SMI quer no Hospital, apesar do grupo glutamina apresentar mais co-morbilidades e maior score SOFA no momento de admissão no SMI.

A média de tempo de internamento no SMI e no Hospital é uma variável pouco precisa, dependente de múltiplos factores, e por isso pouco fiável para traduzir resultados numa população já de si heterogénea, como é a população de doentes de Medicina Intensiva.

Quando comparamos os nossos resultados com os de outros trabalhos, o uso do tempo de internamento como sinal do benefício de determinada intervenção é de difícil valorização, já que são inúmeros os factores (clínicos e não clínicos) que o podem influenciar. Devemos, pois, olhá-lo com a ponderação necessária para que factores externos ou decorrentes de diferentes práticas não conduzam a conclusões precipitadas.

Optámos pela comparação entre o tempo de internamento habitual (demora média no SMI) e o tempo de internamento nesta amostra. Verificámos que o tempo médio de internamento do nosso estudo tanto para o grupo glutamina (18,4 dias) como para o grupo controlo (18,2 dias) é superior ao tempo médio de internamento habitual no SMI (12 dias).

Esta diferença poderá ser explicada pela gravidade dos doentes incluídos no estudo, superior à gravidade habitual dos doentes internados no SMI.

O elevado número de doentes cirúrgicos complicados que incluímos neste estudo, comparativamente ao case-mix habitual do SMI, assim como a inclusão de doentes do foro médico ou traumático complicados pela incapacidade de utilização habitual do tubo digestivo poderão ajudar a justificar o tempo de internamento mais prolongado da nossa amostra.

4.2.5. Mortalidade

Tal como outros autores [312, 639], confirmámos uma redução da mortalidade quer no SMI, quer no Hospital, beneficiando o grupo com glutamina embora com uma diferença sem significado estatístico, mas com relevo clínico.

A mortalidade real é inferior à mortalidade relativa prevista pelos índices de gravidade tanto para o grupo glutamina quanto para o grupo controlo.

A mortalidade habitual quer no SMI (29,8%) quer no Hospital (43%) aproximava-se mais do grupo controlo (SMI - 22 % e Hospital - 33%) do que do grupo glutamina (SMI – 14% e Hospital – 22%), traduzindo o benefício da glutamina na redução da morbilidade infecciosa e da mortalidade.

Em doentes sépticos a depleção de glutamina associa-se à redução da sobrevida [84, 135, 136, 310, 389, 390, 393, 394, 480, 640].

São inúmeros os relatos científicos que atestam que em doentes graves internados em Medicina Intensiva, a suplementação do suporte nutricional parentérico com glutamina reduz a mortalidade.

Porém, este benefício não é unânime, salientando-se um dos últimos estudos publicados [402] que demonstra não haver diferenças da mortalidade no SMI com inclusão de glutamina na nutrição parentérica, registando mesmo uma mortalidade discretamente superior no grupo com glutamina (OR = 1,18 (0,82-1,70) p=0,38). Tão pouco havia diferenças na mortalidade hospitalar (35 vs 32%) ou aos 6 meses (43 vs 45%). Este estudo tem, no entanto, alguns defeitos metodológicos, usando doses subterapêuticas de glutamina, não ajustadas ao peso dos doentes e por tempo insuficiente, inferior a 5 dias.

No nosso estudo a diferença de mortalidade entre os grupos, só adquire grau de significância estatística aos 180 dias após o internamento, facto já relatado por outros autores [391, 403].

Salientamos uma mortalidade precoce no grupo glutamina pouco influenciada pelo suporte nutricional, mas mais relacionada com a gravidade da agressão ou com as co-morbilidades associadas.

O grupo controlo tem uma queda marcada na curva de sobrevida logo após a alta hospitalar, que contribui para esta diferença acentuada entre os grupos.

É curioso verificar os recentes resultados de avaliação da mortalidade aos 6 meses após alta do SMI-HUC, realizados no âmbito do INFAUCI e apresentados como “estudo de coorte” na reunião anual da Sociedade

Portuguesa de Medicina Interna em 2012, que apresenta um valor de 46,5%, muito semelhante ao que obtivemos neste estudo para o grupo controlo, levando-nos a concluir ser este o valor habitual da mortalidade aos 6 meses para a nossa população de doentes graves.

A correcção do estado de imunodepressão e a redução do número de infecções favorecida pela glutamina poderá ter contribuído para a correcção desta mortalidade habitual.

Alguns doentes por incapacidade funcional de utilização do tubo digestivo, permaneceram com suporte nutricional parentérico durante todo o tempo de internamento no SMI, mantendo a suplementação de glutamina para além dos 10 dias do estudo, o que poderia ter contribuído para a correção da mortalidade tardia, pois sabemos que o déficite sérico de glutamina pode condicionar a mortalidade aos 6 meses [391].

5. COMENTÁRIOS FINAIS e CONCLUSÕES

Antes das conclusões finais deste trabalho gostaria de referir algumas das suas limitações.

Sem dúvida que o facto de ser um estudo monocêntrico, com um número reduzido de participantes poderá ter dificultado a interpretação dos resultados ou justificar alguns outros menos esperados.

A dispersão de alguns resultados associada à redução da dimensão da amostra dificultou por vezes uma correcta interpretação dos mesmos. Esta dispersão poderá ter a ver com a heterogeneidade do comportamento individual dos doentes internados em MI, a influência de patologia sub-clínica desconhecida ou ficar a dever-se à variabilidade da resposta inflamatória e imunológica à infecção.

Ao contrário do que se passava à longos anos atrás em que havia nos SMI uma elevada percentagem de doentes em suporte nutricional parentérico, hoje essa percentagem é reduzida oscilando entre os 5-8%, tornando por isso cada vez mais difícil recrutar doentes com necessidade de nutrição parentérica total. A solução passará no futuro pelo aumento de estudos multicêntricos que apesar de corrigirem este problema, levantarão porventura alguns outros.

A observação do comportamento dos parâmetros imunológicos por período mais alargado ter-nos-ia dado uma melhor perspectiva da evolução destes ao longo do tempo de internamento, permitindo consolidar algumas tendências estatísticas ou invalidar outros resultados duvidosos.

Mas, o elevado número de populações e sub-populações linfocitárias que estudámos tornava difícil manter esta análise prolongada.

Foi pela primeira vez estudada a influência da glutamina sobre um leque tão variado de células linfocitárias, permitindo-nos uma caracterização do perfil imunológico do doente crítico antes e depois da influência de um nutriente imunomodulador. Poderíamos ter reduzido o número de sub-populações linfocitárias estudadas, alargando o período de observação mas limitaríamos a capacidade de caracterizar o papel imunomodulador da glutamina sobre os vários tipos de linfócitos em diferentes períodos de evolução.

O facto de não termos feito doseamentos séricos de glutamina, quer previamente quer ao longo do estudo, poderá constituir um factor limitante na

análise dos resultados finais, tanto mais importante quanto sabemos que baixos níveis de glutamina sérica se correlacionam de forma independente com a mortalidade no SMI [308] e pós-SMI [214].

A redução da concentração sérica de aminoácidos nos quais a glutamina se inclui não está só relacionada com o estado nutricional prévio mas com a gravidade da doença e a magnitude do processo inflamatório [641]. As concentrações séricas de glutamina estão diminuídas em diversas situações de *stress*, que se associam ao trauma e à população de doentes graves internados em SMI polivalentes [145, 642, 643].

Esta redução sérica acompanha-se de uma depleção das reservas musculares de glutamina, apesar do aumento da sua síntese muscular, levando-nos a concluir que existe um aumento significativo da exportação muscular deste aminoácido, para fazer face a necessidades acrescidas de diversos compartimentos orgânicos. Esta produção endógena pode, contudo, ver-se limitada pela ausência do precursor (glutamato) necessário à sua síntese. Há, nestas circunstâncias, necessidade de suplementação exógena de glutamina, usada para a síntese de novo no território muscular esquelético.

Assim, a terapêutica com glutamina deverá ser entendida, no futuro, não como simples suplementação mas como correção de um verdadeiro *deficit* habitualmente presente. Contudo, a maioria dos estudos até agora publicados, não condicionaram a prescrição de glutamina aos níveis séricos pré-existentes. A nosso favor argumentaremos que doentes com APACHE II > 10 têm baixos níveis séricos de glutamina [644] além disso, vários estudos demonstraram que a maioria dos doentes críticos em suporte ventilatório têm uma concentração sérica de glutamina abaixo do normal [268, 270, 308], não se modificando durante o internamento [645], a não ser quando suplementados com glutamina exógena (0,3 gr/Kg/dia) para normalização da sua concentração plasmática (0,5-0,8 mM/L) [99, 268, 315, 646].

Por fim, mas não menos importantes, são os resultados que apresentamos, com redução da morbidade infecciosa e da mortalidade a longo prazo com a inclusão de glutamina, só explicáveis se esta suplementação corrigir um déficit previamente existente. Podemos especular dizendo que se os doentes tivessem níveis séricos normais de glutamina, provavelmente não teríamos obtido estes resultados.

O limite temporal de 10 dias de suplementação com glutamina imposto pelo desenho do estudo, poderá condicionar os benefícios desta suplementação particularmente em doentes com internamentos mais prolongados.

O facto de fazermos coincidir o tempo de suplementação com o fim da avaliação é unicamente um imperativo metodológico porque os doentes incluídos no grupo glutamina continuaram a ser suplementados enquanto tiveram necessidade de manter o suporte nutricional parentérico. Tal aconteceu sobretudo no sub-grupo cirúrgico, sendo possível, e aqui estamos a especular, pensar que a redução de mortalidade hospitalar e sobretudo aos 6 meses se possa dever ao efeito mais prolongado da glutamina nestes doentes.

Apesar destas limitações, o trabalho que agora concluímos permite-nos tecer alguns comentários à maneira de conclusões.

5.1 A redução significativa do número de infecções nosocomiais no grupo suplementado com glutamina durante o tempo de internamento no SMI é sem dúvida uma das mais importantes. Era uma relação já conhecida que vem reforçar outros dados publicados na literatura, pelo que o mérito da análise foi verificar que apesar do número reduzido da amostra, ela se mantém com significado estatístico importante.

Na análise de regressão logística verificámos que a glutamina constitui um factor independente na redução do número de infecções no SMI ao 5º e 10º dia após o início do suporte nutricional.

5.2 Complementando a redução do número de episódios infecciosos, a glutamina diminui o valor da PCR ao longo do tempo do estudo, reforçando a ideia da importância daquele aminoácido na correcção da infecção.

5.3 A avaliação das populações e sub-populações linfocitárias constituiu um dos pontos principais deste trabalho, cuja interpretação nem sempre foi fácil atendendo às relações de complementaridade entre os diversos tipos celulares estudados e à já referida ausência de qualquer dado na literatura para a maioria das sub-populações que avaliámos.

A primeira leitura que fazemos dos dados imunológicos na sua globalidade é que nos permite caracterizar a população do grupo controlo, não sujeita à acção da glutamina, como um grupo imunodeprimido ao longo do tempo de estudo, que apresenta uma redução do número global de linfócitos totais, do

número de células T naife (CD45RA) e da diferenciação em linfócitos TCD4, da expressão de moléculas co-estimuladoras à superfície das células linfocitárias (CD25CD3,CD69, CD26, CD28) e da expressão de moléculas de estimulação celular tardia (HLADR, HLADRCD3), estes dados eram acompanhados do aumento da expressão de moléculas de apoptose quer à superfície de células linfocitárias (CD95CD95L) quer à superfície de monócitos (CD14CD95L) e do aumento do número de células Treguladoras (CD25CD4 e CD4CD25highCD127) responsáveis pela redução do estímulo para a proliferação linfocitária e pelo aumento da apoptose. Este quadro de imunodepressão era complementado pela redução significativa do número de monócitos (CD14) e de monócitos apresentadores de antígenos às células linfocitárias T (CD14HLADR) que comprometiam a interação entre a imunidade inata e celular. Havia ainda uma redução do número de células NK (CD56), de células NK activadas (CD16) e da expressão de quimiocinas (CXCR3 e CCR5) necessárias ao correcto funcionamento da imunidade inata no controlo dos agentes agressores.

De salientar que esta é a primeira vez que vemos descrita, de uma forma tão abrangente, a caracterização imunológica de uma população de doentes internados em MI.

Este estado de imunodepressão, característica habitual da população de doentes de Medicina Intensiva é revertido pela glutamina, traduzindo-se no aumento do número de linfócitos T, do número de linfócitos T naife (CD45RA) e das populações TCD4 e TCD8. Havia um aumento do número de células dendríticas e de monócitos activados (CD14HLADR) capazes de estimularem os linfócitos T, estabelecendo uma ligação entre as células da imunidade inata e as da imunidade celular. Identificámos um aumento da expressão de moléculas de co-estimulação precoce (CD25CD3,CD69, CD26, CD28) e tardia (HLADR, HLADRCD3) à superfície das células linfocitárias traduzindo a capacidade funcional dos linfócitos T activados para iniciarem a resposta imune celular.

Este aumento do número de células e da capacidade funcional dos linfócitos T era complementado pela redução da expressão T reguladora (CD25CD4 e CD4CD25highCD127) e da expressão de marcadores de apoptose à superfície de linfócitos (CD95CD95L) e monócitos (CD14CD95L), contribuindo para a

manutenção do número de monócitos e de células T efectoras necessárias a uma correcta resposta imunitária.

A glutamina aumentava ainda o número de células NK (CD56), NK activadas (CD16) e de quimiocinas (CXCR3 e CCR5), traduzindo o potencial de destruir células infectadas e de promover o aumento do número de linfócitos T nos locais de agressão.

De salientar que quando aplicámos uma análise de regressão logística tentando encontrar entre os diversos factores agora relatados uma relação significativa com a redução da infecção no SMI, verificámos que de todas as populações e subpopulações que estudámos só para a expressão TCD4 e CD14HLADR ao 10º dia de tratamento, era possível estabelecer tal relação.

Não significa isto que ela não possa existir para as outras sub-populações estudadas, mas o número reduzido de doentes e o tempo de avaliação de 10 dias não permitiu evidenciá-lo.

Ainda assim, este estudo ilustra a importância de no futuro caracterizarmos imunologicamente esta população de doentes graves seleccionando os candidatos à utilização da glutamina como agente imunomodulador.

5.4 No grupo glutamina houve uma redução mais marcada no número global de órgãos em falência entre o início e o fim do estudo comparativamente ao grupo controlo, esta diferença não tem contudo um significado estatístico importante. As variações dos scores entre os diversos órgãos em falência são pequenas o que aliado ao número reduzido de doentes incluídos no estudo torna impossível evidenciar diferenças com significado estatístico, ilustrando assim uma das limitações deste estudo que atrás aludimos.

5.5 Verificámos uma redução da mortalidade no grupo glutamina, presente durante o internamento quer no SMI quer no Hospital, embora sem significado estatístico relevante. Este só seria aparente aos 6 meses após a inclusão no estudo com um $p < 0,05$.

De salientar que a mortalidade que registámos aos 6 meses para o grupo controlo é sobreponível à mortalidade habitual que observámos para os doentes do SMI-HUC aos 6 meses, num outro estudo recentemente realizado, levando-nos a concluir que a glutamina corrige a mortalidade habitual a médio prazo nesta população de doentes e fá-lo, e aqui especulamos, através do seu papel imunomodulador.

Assim, e apesar das limitações atrás referidas podemos concluir do nosso estudo que:

Em doentes graves internados em Medicina Intensiva, com impossibilidade de usarem o tubo digestivo para administração de nutrientes, a glutamina administrada por via parentérica numa dose de 0,35 g/Kg/dia, durante 10 dias, reduz o aparecimento de infecções nosocomiais e a mortalidade aos seis meses.

Estes benefícios são o resultado da melhoria do estado de imunodepressão habitual da população de doentes graves internados em Medicina Intensiva e caracterizado pelo grupo controlo.

A administração de glutamina em dose e tempo suficientes é capaz de reverter essa imunodepressão, traduzida pelo:

- aumento do número de linfócitos totais e das populações T CD4 e TCD8.
- aumento do número das células da imunidade inata capazes de estimular as células T, traduzido neste estudo pela elevação do número de células dendríticas.
- aumento das células apresentadoras de antígeno às células T (CD14HLADR), estabelecendo o elo de ligação entre a imunidade inata e a celular. Este aumento da expressão HLADR à superfície dos monócitos poderá contribuir para a menor morbidade e mortalidade no grupo glutamina. Na avaliação estatística multivariada empregando a análise de componentes categóricas principais (CatPCA) verificámos existir uma relação importante entre a glutamina e os níveis de CD14HLADR ao 10º dia após o início do suporte nutricional. A análise de regressão logística evidenciou a relação independente entre a recuperação da expressão CD14HLADR e a redução da infecção no SMI.
- aumento da expressão de moléculas co-receptoras à superfície das células T, tanto precoces (CD69, CD26, CD28) quanto tardios (HLADR) traduzindo potencial de activação funcional dos linfócitos T estimulados.
- aumento da expressão TCD25, traduzindo estimulação das células T.

- redução da apoptose, traduzida pela diminuição da expressão CD95L à superfície de linfócitos e monócitos, que provavelmente será responsável pela manutenção do número destas células de defesa.
- redução do número de células T reguladoras (CD25CD4) e Foxp3, que contribui para manter o número e funcionalidade das populações linfocitárias.
- aumento da expressão de receptores de quimiocinas à superfície das células T, promotora da migração das células de defesa para os locais de agressão, ajudando a controlar a infecção de forma mais eficaz.
- Aumento do número de células NK, traduzindo uma maior capacidade e rapidez na contenção das agressões infecciosas.

Quando hoje se debate a necessidade de estabelecermos o perfil imunológico em doentes graves de MI, e de corrigir a imunodepressão quando esta estiver presente através de terapêuticas imunomoduladoras, a glutamina estimulando as células de imunidade inata e celular, surge como alternativa credível a outros fármacos mais caros e com mais efeitos secundários.

Apesar das limitações atrás apontadas, espero que este trabalho constitua o início de outros estudos que com melhor metodologia e maior número de doentes permitam a confirmação destes resultados, afirmando a glutamina como agente imunomodulador nesta população de doentes.

Referências Bibliográficas

1. Santos, S.B., *Um discurso sobre as Ciências. Edições Afrontamento, 1998.*
2. Gil F, T.P., Cohn D., *Impasses, Seguido de Coisas Vistas, Coisas Vividas. Europa-América, 2003.*
3. Bone RC, B.R., Cerra FB, Dellinger RP, Fein AM, Knaus WA, Schein RM, Sibbald WJ., *Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. Chest. 1992 Jun;101(6):1644-55., 1992.*
4. Levy MM, F.M., Marshall JC, Abraham E, Angus D, Cook D, Cohen J, Opal SM, Vincent JL, Ramsay G; SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS., *2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. Crit Care Med. 2003 Apr;31(4):1250-6, 2003.*
5. Oguz, M., et al., *L-alanin-L-glutamine supplementation improves the outcome after colorectal surgery for cancer. Colorectal Dis, 2007. 9(6): p. 515-20.*
6. Robertson CM, C.C., *The systemic inflammatory response syndrome. Microbes and Infection, 2006. 8: p. 1382-89.*
7. Skillman JJ, B.L., Goldman H, Silen W. and h. *Respiratory failure, sepsis, and jaundice. A clinical syndrome associated with lethal hemorrhage from acute stress ulceration of the stomach. Am J Surg. 1969 Apr;117(4):523-30.*
8. Ahmed NA, C.N., Meakins JL, *The systemic inflammatory response syndrome and the critically ill surgical patient. Curr Opin Crit Care ; 1:290-305, 1995.*
9. Berk, L., et al., *A randomized, double-blind, placebo-controlled trial of a beta-hydroxyl beta-methyl butyrate, glutamine, and arginine mixture for the treatment of cancer cachexia (RTOG 0122). Support Care Cancer, 2008. 16(10): p. 1179-88.*
10. Dinarello, C., *Proinflammatory cytokines. Chest. 2000 Aug;118(2):503-8., 2000.*
11. Kato T, M.A., Ishida H, Toda H, Tanaka N, Hayashida H, Monden M, Matsuura N., *Interleukin 10 reduces mortality from severe peritonitis in mice. Antimicrob Agents Chemother. 1995 Jun;39(6):1336-40.*
12. van der Poll, M., Buurman WA, Bermaer L, Keogh CV, Lazarus DD, Nguyen L, Goldman M, Molware LL, Lowery SL. *Endogenous IL-10 protects mice from death during septic peritonitis. J Immunology, 1995. 155(11): p. 5397-401.*
13. Castellheim A, B.O., Espevik T, Harboe M, Mollnes TE., *Innate immune responses to danger signals in systemic inflammatory response syndrome and sepsis. Scand J Immunol. 2009 69(6): p. 479-91.*
14. Cavillon JM, A.-C.M., *Monocytes/macrophages and sepsis. Crit Care Med, 2005. 33(12 Suppl): p. S506-9.*
15. Jawa RS, K.M., Baumann H, Dayton MT., *What is new in cytokine research related to trauma/critical care. J Intensive Care Med, 2006 21(2): p. 63-85.*
16. Borg C, J.A., Laderach D, Maruyama K, Wakasugi H, Charrier S, Ryffel B, Cambi A, Figdor C, Vainchenker W, Galy A, Caignard A, Zitvogel L., *NK cell activation by dendritic cells (DCs) requires the formation of a synapse leading to IL-12 polarization in DCs. Blood, 2004 104(10): p. 3267-75.*
17. Colonna M, T.G., Liu YJ., *Plasmacytoid dendritic cells in immunity. Nat Immunol, 2004. 5(12): p. 1219-26.*
18. Marshall JS, J.D., *Mast cells in innate immunity. J Allergy Clin Immunol, 2004. 114(1): p. 21-7.*
19. Bryceson YT, M.M., Barber DF, Ljunggren HG, Long EO., *Cytolytic granule polarization and degranulation controlled by different receptors in resting NK cells. J Exp Med, 2005. 202(7): p. 1001-12.*

20. Bryceson YT, M.M., Ljunggren HG, Long EO., Activation, coactivation, and costimulation of resting human natural killer cells. *Immunol Rev*, 2006 **214**(12): p. 73-91.
21. Bryceson YT, M.M., Ljunggren HG, Long EO., Synergy among receptors on resting NK cells for the activation of natural cytotoxicity and cytokine secretion. *Blood*, 2006. **107**(1): p. 159-66.
22. Doan T, M.R., *Immunology - Lippincott willians & Wilkins 1^oed.* 2008.
23. I Mackay, F.R., T-cell function and migration. *NEJM*, 2000. **343**(14): p. 1020-34.
24. Jiang H, C.L., Regulation of Immune function by T cells. *NEJM*, 2006. **354**(11): p. 1166-76.
25. Greenwald RJ, F.G., Sharpe AH, The B7 Family Revisited. *Annu Rev Immunol*, 2005. **23**: p. 515-48.
26. Abbas AK, L.A., Pillai S, *Cellular and Molecular Immunology 6^a ed.* 2010(Saunders).
27. Parham, P., *The Immune System 2^a ed.* Garland Science, 2005.
28. Obar JJ, M.M., Jellison ER, Stoklasek TA, Zhang W, Usherwood EJ, Lefrançois L., CD4+ T cell regulation of CD25 expression controls development of short-lived effector CD8+ T cells in primary and secondary responses. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010. **107**(1): p. 193-8.
29. Wilson EB, L.A., Cutting edge: CD4+ T cell-derived IL-2 is essential for help-dependent primary CD8+ T cell responses. *J Immunol*, 2008. **181**(11): p. 7445-8.
30. Joshi NS, C.W., Chandele A, Lee HK, Urso DR, Hagman J, Gapin L, Kaech SM., Inflammation directs memory precursor and short-lived effector CD8(+) T cell fates via the graded expression of T-bet transcription factor. *Immunity*, 2007. **27**(2): p. 281-95.
31. Rubinstein MP, L.N., Purton JF, Filippou P, Best JA, McGhee PA, Surh CD, Goldrath AW., IL-7 and IL-15 differentially regulate CD8+ T-cell subsets during contraction of the immune response. *Blood*, 2008 **112**(9): p. 3704-12.
32. Sanjabi S, M.M., Flavell RA, Opposing effects of TGF-beta and IL-15 cytokines control the number of short-lived effector CD8+ T cells. *Immunity*, 2009. **31**(1): p. 131-44.
33. Watts, T., TNF/TNFR family members in costimulation of T cell responses. *Annu Rev Immunol*, 2005. **23**: p. 23-68.
34. Obar JJ, L.L., Early events governing memory CD8+ T-cell differentiation. *Int Immunol*, 2010. **22**(8): p. 619-25.
35. Mescher MF, A.P., Casey KA, Hammerbeck CD, Xiao Z, Curtsinger JM., Molecular basis for checkpoints in the CD8 T cell response: tolerance versus activation. *Semin Immunol*, 2007. **19**(3): p. 153-61.
36. Obar JJ, L.L., Early signals during CD8 T cell priming regulate the generation of central memory cells. *J Immunol*, 2010. **185**(1): p. 263-72.
37. Gershon RK, K.K., Infectious immunological tolerance. *Immunology*, 1971. **21**(6): p. 903-14.
38. Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol.*, 1995. **155**(3): p. 1151-64.
39. Sakaguchi S, Naturally arising Foxp3-expressing CD25+CD4+ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. *Nat Immunol*, 2005. **6**(4): p. 345-52.
40. Tang Q, A.J., Penaranda C, Melli K, Piaggio E, Sgouroudis E, Piccirillo CA, Salomon BL, Bluestone JA., Central role of defective interleukin-2 production in the triggering of islet autoimmune destruction. *Immunity*, 2008. **28**(5): p. 687-97.

41. Piccirillo, C., *Regulatory T cells in health and disease. Cytokine*, 2008 **43**(3): p. 395-401.
42. Bopp T, Jonuleit H, Schmitt E. *Regulatory T cells--the renaissance of the suppressor T cells. Ann Med Psychol (Paris)*, 2007. **39**(5): p. 322-34.
43. Hori S, N.T., Sakaguchi S., *Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. Science*, 2003. **299**(5609): p. 1057-61.
44. Fontenot JD, Rasmussen JP, Williams LM, Dooley JL, Farr AG, Rudensky AY. *Regulatory T cell lineage specification by the forkhead transcription factor foxp3. Immunity*, 2005. **22**(3): p. 329-41.
45. Sakaguchi S, Y.T., Nomura T, Ono M., *Regulatory T cells and immune tolerance. Cell Biochem Funct*, 2008. **133**(5): p. 775-87.
46. Bopp T, Becker C, Klein M, Klein-Hessling S, Palmetshofer A, Serfling E, Heib V, Becker M, Kubach J, Schmitt S, Stoll S, Schild H, Staeger MS, Stassen M, Jonuleit H, Schmitt E. *Cyclic adenosine monophosphate is a key component of regulatory T cell-mediated suppression. J Exp Med*, 2007. **204**(6): p. 1303-10.
47. d'Hennezel E, Piccirillo CA. *Analysis of human FOXP3+ Treg cells phenotype and function. Methods Mol Biol*, 2011. **707**: p. 199-218.
48. Jarvis LB, Matyszak MK, Duggleby RC, Goodall JC, Hall FC, Gaston JS. *Autoreactive human peripheral blood CD8+ T cells with a regulatory phenotype and function. Eur J Immunol*, 2005. **35**(10): p. 2896-908.
49. Wing K, Onishi Y, Prieto-Martin P, Yamaguchi T, Miyara M, Fehervari Z, Nomura T, Sakaguchi S. *CTLA-4 control over Foxp3+ regulatory T cell function. Science*, 2008. **322**(5899): p. 271-5.
50. Cederbom L, Hall H, Ivars F. *CD4+CD25+ regulatory T cells down-regulate co-stimulatory molecules on antigen-presenting cells. Eur J Immunol.*, 2000. **30**(6): p. 1538-43.
51. Sakaguchi S, Miyara M, Costantino CM, Hafler DA. *FOXP3+ regulatory T cells in the human immune system. Nat Rev Immunol*, 2010. **10**(7): p. 490-500.
52. Miyara M, Sakaguchi S. *Natural regulatory T cells: mechanisms of suppression. Trends Mol Med*, 2007. **13**(3): p. 108-16.
53. Sydora BC, Tavernini MM, Wessler A, Jewell LD, Fedorak RN. *Lack of interleukin-10 leads to intestinal inflammation, independent of the time at which luminal microbial colonization occurs. Inflamm Bowel Dis*, 2003. **9**(2): p. 87-97.
54. Collison LW, Workman CJ, Kuo TT, Boyd K, Wang Y, Vignali KM, Cross R, Sehy D, Blumberg RS, Vignali DA. *The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function. Nature*, 2007. **450**(7169): p. 566-9.
55. Pandiyan P, Zheng L, Ishihara S, Reed J, Lenardo MJ. *CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells induce cytokine deprivation-mediated apoptosis of effector CD4+ T cells. Nat Immunol*, 2007. **8**(12): p. 1353-62.
56. Friedman DJ, Künzli BM, A-Rahim YI, Sevigny J, Berberat PO, Enjyoji K, Csizmadia E, Friess H, Robson SC. *From the Cover: CD39 deletion exacerbates experimental murine colitis and human polymorphisms increase susceptibility to inflammatory bowel disease. Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009 **106**(39): p. 16788-93.
57. Deaglio S, Dwyer KM, Gao W, Friedman D, Usheva A, Erat A, Chen JF, Enjyoji K, Linden J, Oukka M, Kuchroo VK, Strom TB, Robson SC. *Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. J Exp Med*, 2007. **204**(6): p. 1257-65.
58. Shalev I, Wong KM, Foerster K, Zhu Y, Chan C, Maknojia A, Zhang J, Ma XZ, Yang XC, Gao JF, Liu H, Selzner N, Clark DA, Adeyi O, Phillips MJ, Gorczynski RR, Grant D, McGilvray I, Levy G. *The novel*

- CD4+CD25+ regulatory T cell effector molecule fibrinogen-like protein 2 contributes to the outcome of murine fulminant viral hepatitis. Hepatology, 2009. 49(2): p. 387-97.*
59. *Levings MK, Allan S, d'Hennezel E, Piccirillo CA. Functional dynamics of naturally occurring regulatory T cells in health and autoimmunity. Adv Immunol, 2006. 92: p. 119-55.*
 60. *Yan Z, Garg SK, Kipnis J, Banerjee R. Extracellular redox modulation by regulatory T cells. Nat Chem Biol, 2009. 5(10): p. 721-3.*
 61. *Sakaguchi, S., et al., Regulatory T cells and immune tolerance. Cell, 2008. 133(5): p. 775-87.*
 62. *Miyara M, Sakaguchi S. Human FoxP3(+)CD4(+) regulatory T cells: their knowns and unknowns. Immunol Cell Biol, 2011. 89(3): p. 346-51.*
 63. *Vignali DA, Collison LW, Workman CJ. How regulatory T cells work. Nat Rev Immunol, 2008. 8(7): p. 523-32.*
 64. *Groux H, O'Garra A, Bigler M, Rouleau M, Antonenko S, de Vries JE, Roncarolo MG. CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. Nature, 1997 389(6652): p. 737-42.*
 65. *Roncarolo MG, Gregori S, Battaglia M, Bacchetta R, Fleischhauer K, Levings MK. Interleukin-10-secreting type 1 regulatory T cells in rodents and humans. Immunol Rev, 2006. 212: p. 28-50.*
 66. *Weiner, H., Induction and mechanism of action of transforming growth factor-beta-secreting Th3 regulatory cells. Immunol Rev, 2001 182: p. 207-14.*
 67. *Köhler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. Nature, 1975. 256(5517): p. 495-7.*
 68. *Brown M, Wittwer C. Flow cytometry: principles and clinical applications in hematology. Clin Chem, 2000. 46(8 Pt 2): p. 1221-9.*
 69. *Mandy FF, Bergeron M, Minkus T. Principles of flow cytometry. Transfus Sci., 1995. 16(4): p. 303-14.*
 70. *Ritthausen, H., Über die Glutaminsäure. J Prakt.Chem, 1883(99): p. 454.*
 71. *Schulze, E., Bosshard E, Über das Glutamin. Landw Vers Sta, 1883(29): p. 295.*
 72. *Van Slyke DD, Meyer GM. The fate of protein digestion products in the body. J Biol Chem, 1913(16): p. 197.*
 73. *Thierfelder, H., Sherwin CP. Phenylacetyl-glutamin, ein Stoffwechsel-Produkt des menschlichen Körpers nach Eingabe von Phenyllessigsäure. Der Dtsch Chem Ges, 1914(47): p. 2630.*
 74. *Benson JV, Gordon MJ and Patterson JÁ . Accelerated chromatographic analysis of amino acids in physiological fluids containing glutamine and asparagines. Anal Biochem, 1937(18): p. 228.*
 75. *Munro, H., Free amino acid pools and their role in regulation in Mammalian Protein Metabolism vol 4. Munro HN ed, Academic Press New York, , 1970: p. 299.*
 76. *Krebs HA, Metabolism of aminoacids IV. The synthesis of glutamine from glutamic acid and ammonia, and the enzymatic hydrolysis of glutamine in animal tissue. Biochem J, 1935(29): p. 1951.*
 77. *Leuthardt F, Glasson B Le sort des acides aminés lors de leur absorption. Helv Chim Acta, 1946(29): p. 1344.*
 78. *Eagle H, Oyama VL, Lery M, Horton CL and Fleischman R. The growth response of mammalian cells in tissue cultures to L-glutamine and L-glutamic acid. J Biol Chem 1956(218): p. 607.*
 79. *Eagle, H., Nutritional needs of mammalian cells in tissue culture. Science 1955(122): p. 501.*

80. Bergström J, Fürst P, Norée LO, Vinnars E. Intracellular free amino acid concentration in human muscle tissue. *J Appl Physiol.* , 1974 **36**(6): p. 693-7.
81. Darmaun D, Matthews DE, Bier DM. Glutamine and glutamate kinetics in humans. *Am J Physiol.*, 1986. **251**: p. E117-26.
82. Häussinger D, Roth E, Lang F, Gerok W. Cellular hydration state: an important determinant of protein catabolism in health and disease. *Lancet*, 1993. **341**(8856): p. 1330-2.
83. Roth E, Oehler R. Hypothesis: Muscular glutamine deficiency in sepsis--a necessary step for a hibernation-like state? *Nutrition*, 2010 **26**(5): p. 571-4.
84. Roth, E., Funovics, J. Muhlbacher, F. Schemper, M. Mauritz, W. Sporn, P. Fritsch, A. Metabolic disorders in severe abdominal sepsis: glutamine deficiency in skeletal muscle. *Clin Nutr*, 1982. **1**(1): p. 25-41.
85. Askanazi J, Carpentier YA, Michelsen CB, Elwyn DH, Furst P, Kantrowitz LR, Gump FE, Kinney JM. Muscle and plasma amino acids following injury. Influence of intercurrent infection. *Ann Surg* 1980. **192**(1): p. 78-85.
86. Vinnars E, Bergström J, Fürst P. Influence of the postoperative state on the intracellular free amino acids in human muscle tissue. *Ann Surg*, 1975. **182**(6): p. 665-71.
87. Lacey JM, Wilmore DW. Is glutamine a conditionally essential amino acid? *Nutr Rev*, 1990. **48**(8): p. 297-309.
88. MEISTER, A., *Metabolism of glutamine.* *Physiol Rev*, 1956. **36**(1): p. 103-27.
89. Khan K, Hardy G, McElroy B, Elia M. The stability of L-glutamine in total parenteral nutrition solutions. *Clin Nutr.*, 1991. **10**(4): p. 193-8.
90. Khan K, Elia M. Factors affecting the stability of L-glutamine in solution. *Clin Nutr*, 1991. **10**(4): p. 186-92.
91. Fürst, P., *New developments in glutamine delivery.* *J Nutr*, 2001. **131**(9 Suppl): p. 2562S-8S.
92. Fürst, P., *Peptides in clinical nutrition.* *Clin Nutr*, 1991. **10**: p. Suppl:19-24.
93. Fürst, P., K. Pogan, and P. Stehle, *Glutamine dipeptides in clinical nutrition.* *Nutrition*, 1997. **13**(7-8): p. 731-7.
94. Berg, A., E. Forsberg, and J. Wernerman, *The local vascular tolerance to an intravenous infusion of a concentrated glutamine solution in ICU patients.* *Clin Nutr*, 2002. **21**(2): p. 135-9.
95. Albers, S., et al., *Availability of amino acids supplied intravenously in healthy man as synthetic dipeptides: kinetic evaluation of L-alanyl-L-glutamine and glycyl-L-tyrosine.* *Clin Sci (Lond)*, 1988. **75**(5): p. 463-8.
96. Matthews DE, Battezzati A, Fürst P. Alanylglutamine kinetics in humans. *Clin Nutr*, 1993. **12**(1): p. 57-8.
97. Brandl M, Sailer D, Langer K, Engelhardt A, Kleinhenz H, Adibi SA, Fekl W. Parenteral nutrition with an amino acid solution containing a mixture of dipeptides. Evidence for efficient utilization of dipeptides in man. *Beitr Infusionther Klin Ernahr*, 1987. **17**: p. 103-16.
98. Albers S, Wernerman J, Stehle P, Vinnars E, Fürst P. Availability of amino acids supplied by constant intravenous infusion of synthetic dipeptides in healthy man. *Clin Sci (Lond)*, 1989. **76**(6): p. 643-8.
99. Berg, A., Rooyackers, O. Norberg, A. Wernerman, J. *Elimination kinetics of L-alanyl-L-glutamine in ICU patients.* *Amino Acids*, 2005. **29**(3): p. 221-8.

100. O'Shea RD, Lau CL, Farso MC, Diwakarla S, Zagami CJ, Svendsen BB, Feeney SJ, Callaway JK, Jones NM, Pow DV, Danbolt NC, Jarrrott B, Beart PM. Effects of lipopolysaccharide on glial phenotype and activity of glutamate transporters: Evidence for delayed up-regulation and redistribution of GLT-1. *Neurochem Int*, 2006. **48**(6-7): p. 604-10.
101. Rennie, M.J., et al., Skeletal muscle glutamine transport, intramuscular glutamine concentration, and muscle-protein turnover. *Metabolism*, 1989. **38**(8 Suppl 1): p. 47-51.
102. Olde Damink SW, Jalan R, Redhead DN, Hayes PC, Deutz NE, Soeters PB. Interorgan ammonia and amino acid metabolism in metabolically stable patients with cirrhosis and a TIPSS. *Hepatology*, 2002. **36**(5): p. 1163-71.
103. Labow, B.I., W.W. Souba, and S.F. Abcouwer, Mechanisms governing the expression of the enzymes of glutamine metabolism--glutaminase and glutamine synthetase. *J Nutr*, 2001. **131**(9 Suppl): p. 2467S-74S; discussion 2486S-7S.
104. Arola L, Palou A, Remesar X, Alemany M. Glutamine synthetase activity in the organs of fed and 24-hours fasted rats. *Horm Metab Res*, 1981. **13**(4): p. 199-202.
105. Bilir BM, Gong TW, Kwasiborski V, Shen CS, Fillmore CS, Berkowitz CM, Gumucio JJ. Novel control of the position-dependent expression of genes in hepatocytes. The GLUT-1 transporter. *J Biol Chem*, 1993. **268**(26): p. 19776-84.
106. Welbourne, T.C., Role of the lung in glutamine homeostasis. *Contrib Nephrol*, 1988. **63**: p. 178-82.
107. Abcouwer SF, Bode BP, Souba WW. Glucocorticoids regulate rat glutamine synthetase expression in a tissue-specific manner. *J Surg Res*, 1995. **59**(1): p. 59-65.
108. Labow, B.I., et al., Glutamine synthetase expression in rat lung is regulated by protein stability. *Am J Physiol*, 1998. **275**(5 Pt 1): p. L877-86.
109. Labow, B.I., W.W. Souba, and S.F. Abcouwer, Glutamine synthetase expression in muscle is regulated by transcriptional and posttranscriptional mechanisms. *Am J Physiol*, 1999. **276**(6 Pt 1): p. E1136-45.
110. Van Acker, B.A., et al., Absence of glutamine isotopic steady state: implications for the assessment of whole-body glutamine production rate. *Clin Sci (Lond)*, 1998. **95**(3): p. 339-46.
111. van de Poll MC, Siroen MP, van Leeween PA e col: Interorgan amino acid Exchange in humans : consequences for arginine and citruline metabolism. *Am J Clin Nutr*, 2007. **85**(167-172).
112. Ardawi, M.S. and S.M. Khoja, Effects of hyperthyroidism on glucose, glutamine and ketone-body metabolism in the gut of the rat. *Int J Biochem*, 1993. **25**(4): p. 619-24.
113. Häussinger D, Lamers WH, Moorman AF. Hepatocyte heterogeneity in the metabolism of amino acids and ammonia. *Enzyme Microb Technol*, 1992. **46**(1-3): p. 72-93.
114. Kaiser S, Curthoys NP. Effect of pH and bicarbonate on phosphoenolpyruvate carboxykinase and glutaminase mRNA levels in cultured renal epithelial cells. *J Biol Chem*, 1991. **266**(15): p. 9397-402.
115. Leighton B, Curi R, Hussein A, Newsholme EA. Maximum activities of some key enzymes of glycolysis, glutaminolysis, Krebs cycle and fatty acid utilization in bovine pulmonary endothelial cells. *FEBS Lett*, 1987. **225**(1-2): p. 93-6.
116. Michalik M, Nelson J, Erecińska M. Glutamate production in islets of Langerhans: properties of phosphate-activated glutaminase. *Metabolism*, 1992. **41**(12): p. 1319-26.
117. Perera SY, Chen TC, Curthoys NP. Biosynthesis and processing of renal mitochondrial glutaminase in cultured proximal tubular epithelial cells and in isolated mitochondria. *J Biol Chem*, 1990. **265**(29): p. 17764-70.

118. Rosa LF, Cury Y, Curi R. Effects of insulin, glucocorticoids and thyroid hormones on the activities of key enzymes of glycolysis, glutaminolysis, the pentose-phosphate pathway and the Krebs cycle in rat macrophages. *J Endocrinol*, 1992. **135**(2): p. 213-9.
119. Sarantos P, Ockert K, Souba WW. Endotoxin stimulates lymphocyte glutaminase expression. *Arch Surg*, 1993. **128**(8): p. 920-4.
120. Thekkumkara TJ, Patel MS. Ochratoxin A decreases the activity of phosphoenolpyruvate carboxykinase and its mRNA content in primary cultures of rat kidney proximal convoluted tubule cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 1989. **162**(3): p. 916-20.
121. Windmueller, H.G. and A.E. Spaeth, Uptake and metabolism of plasma glutamine by the small intestine. *J Biol Chem*, 1974. **249**(16): p. 5070-9.
122. Pastor CM, Morris SM Jr, Billiar TR. Sources of arginine for induced nitric oxide synthesis in the isolated perfused liver. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 1995. **269**(6 Pt 1): p. G861-6.
123. Guppy M, Greiner E, Brand K. The role of the Crabtree effect and an endogenous fuel in the energy metabolism of resting and proliferating thymocytes. *Eur J Biochem*, 1993. **212**(1): p. 95-9.
124. Brand, K., Glutamine and glucose metabolism during thymocyte proliferation. Pathways of glutamine and glutamate metabolism. *Biochem J*, 1985. **228**(2): p. 353-61.
125. Newsholme, E.A., B. Crabtree, and M.S. Ardawi, The role of high rates of glycolysis and glutamine utilization in rapidly dividing cells. *Biosci Rep*, 1985. **5**(5): p. 393-400.
126. Szondy, Z. and E.A. Newsholme, The effect of various concentrations of nucleobases, nucleosides or glutamine on the incorporation of [³H]thymidine into DNA in rat mesenteric-lymph-node lymphocytes stimulated by phytohaemagglutinin. *Biochem J*, 1990. **270**(2): p. 437-40.
127. Hogstad S, Svenneby G, Torgner IA, Kvamme E, Hertz L, Schousboe A. Glutaminase in neurons and astrocytes cultured from mouse brain: kinetic properties and effects of phosphate, glutamate, and ammonia. *Neurochem Res*, 1988 **13**(4): p. 383-8.
128. Swierczyński J, Bereznowski Z, Makarewicz W. Phosphate-dependent glutaminase of rat skeletal muscle. Some properties and possible role in glutamine metabolism. *Biochim Biophys Acta*, 1993. **1157**(1): p. 55-62.
129. Newsholme, P., Why is L-glutamine metabolism important to cells of the immune system in health, postinjury, surgery or infection? *J Nutr*, 2001. **131**(9 Suppl): p. 2515S-22S; discussion 2523S-4S.
130. Windmueller, H.G. and A.E. Spaeth, Respiratory fuels and nitrogen metabolism in vivo in small intestine of fed rats. Quantitative importance of glutamine, glutamate, and aspartate. *J Biol Chem*, 1980. **255**(1): p. 107-12.
131. Wilmore, D.W., The effect of glutamine supplementation in patients following elective surgery and accidental injury. *J Nutr*, 2001. **131**(9 Suppl): p. 2543S-9S; discussion 2550S-1S.
132. Young, V.R. and A.M. Ajami, Glutamine: the emperor or his clothes? *J Nutr*, 2001. **131**(9 Suppl): p. 2449S-59S; discussion 2486S-7S.
133. Souba, W.W., Glutamine: a key substrate for the splanchnic bed. *Annu Rev Nutr*, 1991. **11**: p. 285-308.
134. Cynober, L., Glutamine as an activator of immune cells: how does it work? *Nutrition*, 1997. **13**(7-8): p. 688-9.
135. Mertes, N., et al., Cost containment through L-alanyl-L-glutamine supplemented total parenteral nutrition after major abdominal surgery: a prospective randomized double-blind controlled study. *Clin Nutr*, 2000. **19**(6): p. 395-401.

136. Morlion, B.J., Stehle, P. Wachtler, P. Siedhoff, H. P. Koller, M. König, W. Furst, P. Puchstein, C. Total parenteral nutrition with glutamine dipeptide after major abdominal surgery: a randomized, double-blind, controlled study. *Ann Surg*, 1998. **227**(2): p. 302-8.
137. Wischmeyer, P.E., Kahana, M. Wolfson, R. Ren, H. Musch, M. M. Chang, E. B. Glutamine induces heat shock protein and protects against endotoxin shock in the rat. *J Appl Physiol*, 2001. **90**(6): p. 2403-10.
138. Bonet, A. and T. Grau, [Glutamine, an almost essential amino acid in the critically ill patient]. *Med Intensiva*, 2007. **31**(7): p. 402-6.
139. Amores-Sanchez, M.I. and M.A. Medina, Glutamine, as a precursor of glutathione, and oxidative stress. *Mol Genet Metab*, 1999. **67**(2): p. 100-5.
140. Opara, E.C., et al., L-glutamine supplementation of a high fat diet reduces body weight and attenuates hyperglycemia and hyperinsulinemia in C57BL/6J mice. *J Nutr*, 1996. **126**(1): p. 273-9.
141. Elia M, Folmer P, Schlatmann A, Goren A, Austin S. Amino acid metabolism in muscle and in the whole body of man before and after ingestion of a single mixed meal. *Am J Clin Nutr*, 1989. **49**(6): p. 1203-10.
142. Obled C, Papet I, Breuillé D. Metabolic bases of amino acid requirements in acute diseases. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 2002. **5**(2): p. 189-97.
143. Boza, J.J., et al., Free and protein-bound glutamine have identical splanchnic extraction in healthy human volunteers. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2001. **281**(1): p. G267-74.
144. Darmaun, D., D.E. Matthews, and D.M. Bier, Glutamine and glutamate kinetics in humans. *Am J Physiol*, 1986. **251**(1 Pt 1): p. E117-26.
145. van Acker, B.A., Hulsewe, K. W. Wagenmakers, A. J. Soeters, P. B. von Meyenfeldt, M. F. Glutamine appearance rate in plasma is not increased after gastrointestinal surgery in humans. *J Nutr*, 2000. **130**(6): p. 1566-71.
146. Vesali RF, Klaude M, Rooyackers O, Wernerman J. Amino acid metabolism in leg muscle after an endotoxin injection in healthy volunteers. *Am J Physiol Endocrinol Metab.*, 2005. **288**(2): p. E360-4.
147. Barbehenn, E.K., et al., An examination of the efficiency of glucose and glutamine as energy sources for cultured chick pigment epithelial cells. *J Cell Physiol*, 1984. **118**(3): p. 262-6.
148. Ziegler, T.R., et al., Safety and metabolic effects of L-glutamine administration in humans. *JPEN J Parenter Enteral Nutr*, 1990. **14**(4 Suppl): p. 1375-1465.
149. González-Mateos F, A., Gómez ME, García-Salguero L, Sánchez V, Aragón JJ Inhibition of glycolysis by amino acids in ascites tumor cells. Specificity and mechanism. *J Biol Chem.*, 1993 **268**(11): p. 7809-17.
150. Ardawi, M.S. and E.A. Newsholme, Glutamine metabolism in lymphocytes of the rat. *Biochem J*, 1983. **212**(3): p. 835-42.
151. Sumbilla, C.M., et al., Comparison of the oxidation of glutamine, glucose, ketone bodies and fatty acids by human diploid fibroblasts. *Biochim Biophys Acta*, 1981. **675**(2): p. 301-4.
152. Zielke, H.R., et al., Lactate: a major product of glutamine metabolism by human diploid fibroblasts. *J Cell Physiol*, 1980. **104**(3): p. 433-41.
153. Krützfeldt A, Spahr R, Mertens S, Siegmund B, Piper HM. Metabolism of exogenous substrates by coronary endothelial cells in culture. *J Mol Cell Cardiol*, 1990. **22**(12): p. 1393-404.
154. Ewart HS, Brosnan JT. Rapid activation of hepatic glutaminase in rats fed on a single high-protein meal. *Biochem J*, 1993. **293**(Pt 2): p. 339-44.
155. Perriello, G., et al., Regulation of gluconeogenesis by glutamine in normal postabsorptive humans. *Am J Physiol*, 1997. **272**(3 Pt 1): p. E437-45.

156. Bakalar, B., et al., Parenterally administered dipeptide alanyl-glutamine prevents worsening of insulin sensitivity in multiple-trauma patients. *Crit Care Med*, 2006. **34**(2): p. 381-6.
157. Newsholme, P. and E.A. Newsholme, Rates of utilization of glucose, glutamine and oleate and formation of end-products by mouse peritoneal macrophages in culture. *Biochem J*, 1989. **261**(1): p. 211-8.
158. Haymond MW, Miles JM. Branched chain amino acids as a major source of alanine nitrogen in man. *Diabetes* 1982. **31**(1): p. 86-9.
159. Biolo G, De Cicco M, Lorenzon S, Dal Mas V, Fantin D, Paroni R, Barazzoni R, Zanetti M, Iapichino G, Guarnieri G. Treating hyperglycemia improves skeletal muscle protein metabolism in cancer patients after major surgery. *Crit Care Med*, 2008. **36**(6): p. 1768-75.
160. Lazo PA. Amino acids and glucose utilization by different metabolic pathways in ascites-tumour cells. *Eur J Biochem*, 1981. **117**(1): p. 19-25.
161. Spolarics Z, Lang CH, Bagby GJ, Spitzer JJ. Glutamine and fatty acid oxidation are the main sources of energy for Kupffer and endothelial cells. *Am J Physiol* 1991. **261**(2 Pt 1): p. 6185-90.
162. Healy DA, Watson RW, Newsholme P. Glucose, but not glutamine, protects against spontaneous and anti-Fas antibody-induced apoptosis in human neutrophils. *Clin Sci (Lond)*, 2002. **103**(2): p. 179-89.
163. Reeds, P.J. and D.G. Burrin, Glutamine and the bowel. *J Nutr*, 2001. **131**(9 Suppl): p. 2505S-8S; discussion 2523S-4S.
164. Brunton JA, Bertolo RF, Pencharz PB, Ball RO. Proline ameliorates arginine deficiency during enteral but not parenteral feeding in neonatal piglets. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 1999. **277**(2 Pt 1): p. E223-31.
165. Reeds PJ, Burrin DG, Stoll B, Jahoor F, Wykes L, Henry J, Frazer ME. Enteral glutamate is the preferential source for mucosal glutathione synthesis in fed piglets. *Am J Physiol* 1997. **273**(2 Pt 1): p. E408-15.
166. Reitzer, L.J., B.M. Wice, and D. Kennell, Evidence that glutamine, not sugar, is the major energy source for cultured HeLa cells. *J Biol Chem*, 1979. **254**(8): p. 2669-76.
167. Wu P, Ray NG, Shuler ML. A single-cell model for CHO cells. *Ann N Y Acad Sci*, 1992 **665**: p. 152-87.
168. Melis, G.C., der Wengel N, Boelens PG, van Leeuwen, PA. Glutamine: recent developments in research on the clinical significance of glutamine. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 2004. **7**(1): p. 59-70.
169. Häussinger D, Lang F, Gerok W. Regulation of cell function by the cellular hydration state. *Am J Physiol.*, 1994. **267**(3 Pt 1): p. E343-55.
170. Ritossa, F., "A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in drosophila". *Cellular and Molecular Life Sciences*, 1962. **18**(12): p. 571-573.
171. Ritossa, F., "Discovery of the heat shock response". *Cell Stress Chaperones*, 1996. **1**(2): p. 97-8.
172. Oehler R, Pusch E, Zellner M, Dungal P, Hergovics N, Homoncik M, Eliassen MM, Brabec M, Roth E. Cell type-specific variations in the induction of hsp70 in human leukocytes by feverlike whole body hyperthermia. *Cell Stress Chaperones*, 2001. **6**(4): p. 306-15.
173. Polla BS, Bachelet M, Elia G, Santoro MG. Stress proteins in inflammation. *Ann N Y Acad Sci*, 1998. **30**(851).
174. Kojima, R., Tamaki, T. Kawamura, A. Konoeda, Y. Tanaka, M. Katori, M. Yokota, N. Hayashi, T. Takahashi, Y. Kakita, A. Expression of heat shock proteins induced by L(+)-glutamine injection and survival of hypothermically stored heart grafts. *Transplant Proc*, 1998. **30**(7): p. 3746-7.

175. Wischmeyer, P.E., Musch, M. W. Madonna, M. B. Thisted, R. Chang, E. B. Glutamine protects intestinal epithelial cells: role of inducible HSP70. *Am J Physiol*, 1997. **272**(4 Pt 1): p. 6879-84.
176. Bruemmer-Smith S, Stüber F, Schroeder S. Protective functions of intracellular heat-shock protein (HSP) 70-expression in patients with severe sepsis. *Intensive Care Med*, 2001. **27**(12): p. 1835-41.
177. Johnson JD, Fleshner M. Releasing signals, secretory pathways, and immune function of endogenous extracellular heat shock protein 72. *J Leukoc Biol.*, 2006. **79**(3): p. 425-34.
178. Wright BH, Corton JM, El-Nahas AM, Wood RF, Pockley AG. Elevated levels of circulating heat shock protein 70 (Hsp70) in peripheral and renal vascular disease. *Heart Vessels*, 2000. **15**(1): p. 18-22.
179. Matzinger, P., *The danger model: a renewed sense of self.* *Science*, 2002. **296**(5566): p. 301-5.
180. Wang Y, Seidl T, Whittall T, Babaahmady K, Lehner T. Stress-activated dendritic cells interact with CD4+ T cells to elicit homeostatic memory. *Eur J Immunol*, 2010. **40**(6): p. 1628-38.
181. Multhoff G, Botzler C, Jennen L, Schmidt J, Ellwart J, Issels R. Heat shock protein 72 on tumor cells: a recognition structure for natural killer cells. *J Immunol.*, 1997. **158**(9): p. 4341-50.
182. Feng H, Zeng Y, Whitesell L, Katsanis E. Stressed apoptotic tumor cells express heat shock proteins and elicit tumor-specific immunity. *Blood*, 2001 **97**(11): p. 3505-12.
183. Tsan MF, Gao B. Heat shock proteins and immune system. *J Leukoc Biol*, 2009. **85**(6): p. 905-10.
184. Wan T, Zhou X, Chen G, An H, Chen T, Zhang W, Liu S, Jiang Y, Yang F, Wu Y, Cao X. Novel heat shock protein Hsp70L1 activates dendritic cells and acts as a Th1 polarizing adjuvant. *Blood*, 2004. **103**(5): p. 1747-54.
185. Srivastava, P., *Interaction of heat shock proteins with peptides and antigen presenting cells: chaperoning of the innate and adaptive immune responses.* *Annu Rev Immunol.*, 2002. **20**: p. 395-425.
186. G, W.Y., Bromberg, Zohar; Raj, Nichelle; Raphael, Jacob; Goloubinoff, Pierre; Ben-Neriah, Yinon; Deutschman, Clifford S. Enhanced heat shock protein 70 expression alters proteasomal degradation of I[κ]B kinase in experimental acute respiratory distress syndrome *. *Critical Care Medicine*, 2007. **35**(9): p. 2128-2138.
187. Oehler, R. and . Pusch, E. Dungal, P. Zellner, M. Eliassen, M. M. Brabec, M. Roth, E. Glutamine depletion impairs cellular stress response in human leucocytes. *Br J Nutr*, 2002. **87 Suppl 1**: p. S17-21.
188. Weingartmann, G., Derkits, S. Oismuller, C. Fugger, R. Roth, E. HSP70 expression in granulocytes and lymphocytes of patients with polytrauma: comparison with plasma glutamine. *Clin Nutr*, 1999. **18**(2): p. 121-4.
189. Durand P, Bachelet M, Brunet F, Richard MJ, Dhainaut JF, Dall'Ava J, Polla BS. Inducibility of the 70 kD heat shock protein in peripheral blood monocytes is decreased in human acute respiratory distress syndrome and recovers over time. *Am J Respir Crit Care Med*, 2000 **161**(1): p. 286-92.
190. Schroeder S, Lindemann C, Hoeft A, Putensen C, Decker D, von Ruecker AA, Stüber F. Impaired inducibility of heat shock protein 70 in peripheral blood lymphocytes of patients with severe sepsis. *Crit Care Med*, 1999. **27**(6): p. 1080-4.
191. Fukudo S, Abe K, Hongo M, Utsumi A, Itoyama Y. Brain-gut induction of heat shock protein (HSP) 70 mRNA by psychophysiological stress in rats. *Brain Res.*, 1997. **757**(1): p. 146-8.
192. Wischmeyer, P.E., *Glutamine and heat shock protein expression.* *Nutrition*, 2002. **18**(3): p. 225-8.
193. Singleton, K.D., Beckey, V. E. Wischmeyer, P. E. Glutamin prevents activation of NF- κ B and stress kinase pathways, attenuates inflammatory cytokine release, and prevents Acute Distress Syndrome (ARDS) following sepsis. *Shock*, 2005. **24**(6): p. 583-9.

194. Morrison AL, Dinges M, Singleton KD, Odoms K, Wong HR, Wischmeyer PE. Glutamine's protection against cellular injury is dependent on heat shock factor-1. *Am J Physiol Cell Physiol.*, 2006 **290**(6): p. C1625-32.
195. Eliassen, M.M., Brabec, M. Gerner, C. Pollheimer, J. Auer, H. Zellner, M. Weingartmann, G. Garo, F. Roth, E. Oehler, R. Reduced stress tolerance of glutamine-deprived human monocytic cells is associated with selective down-regulation of Hsp70 by decreased mRNA stability. *J Mol Med (Berl)*, 2006. **84**(2): p. 147-58.
196. Ganter MT, Ware LB, Howard M, Roux J, Gartland B, Matthay MA, Fleshner M, Pittet JF. Extracellular heat shock protein 72 is a marker of the stress protein response in acute lung injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2006 **291**(3): p. L354-61.
197. Singleton, K.D., et al., Glutamine attenuates endotoxin-induced lung metabolic dysfunction: potential role of enhanced heat shock protein 70. *Nutrition*, 2005. **21**(2): p. 214-23.
198. Singleton, K.D., Serkova, N. Beckey, V. E. Wischmeyer, P. E. Glutamine attenuates lung injury and improves survival after sepsis: role of enhanced heat shock protein expression. *Crit Care Med*, 2005. **33**(6): p. 1206-13.
199. Singleton KD, Wischmeyer PE. Glutamine's protection against sepsis and lung injury is dependent on heat shock protein 70 expression. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2007. **292**(5): p. R1839-45.
200. Ziegler, T.R., Ogden, L. G. Singleton, K. D. Luo, M. Fernandez-Estivariz, C. Griffith, D. P. Galloway, J. R. Wischmeyer, P. E. Parenteral glutamine increases serum heat shock protein 70 in critically ill patients. *Intensive Care Med*, 2005. **31**(8): p. 1079-86.
201. Singleton, K.D. and P.E. Wischmeyer, Glutamine induces heat shock protein expression via O-glycosylation and phosphorylation of HSF-1 and Sp1. *JPEN J Parenter Enteral Nutr*, 2008. **32**(4): p. 371-6.
202. Wischmeyer, P.E., Riehm, J. Singleton, K. D. Ren, H. Musch, M. W. Kahana, M. Chang, E. B. Glutamine attenuates tumor necrosis factor-alpha release and enhances heat shock protein 72 in human peripheral blood mononuclear cells. *Nutrition*, 2003. **19**(1): p. 1-6.
203. Pirkkala L, Nykänen P, Sistonen L. Roles of the heat shock transcription factors in regulation of the heat shock response and beyond. *FASEB J.*, 2001. **15**(7): p. 1118-31.
204. Asea A, Kraeft SK, Kurt-Jones EA, Stevenson MA, Chen LB, Finberg RW, Koo GC, Calderwood SK. HSP70 stimulates cytokine production through a CD14-dependant pathway, demonstrating its dual role as a chaperone and cytokine. *Nat Med*, 2000. **6**(4): p. 435-42.
205. Campisi J, Leem TH, Fleshner M. Stress-induced extracellular Hsp72 is a functionally significant danger signal to the immune system. *Cell Stress Chaperones*, 2003 **8**(3): p. 272-86.
206. Ganter MT, S., Ware LB, Howard M, Roux J, Gartland B, Matthay MA, Fleshner M, Pittet JF Extracellular heat shock protein 72 is a marker of the stress protein response in acute lung injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.*, 2006 **291**(3): p. L354-61.
207. Alonso de Vega JM, Díaz J, Serrano E, Carbonell LF. Plasma redox status relates to severity in critically ill patients. *Crit Care Med.* , 2000 **28**(6): p. 1812-4.
208. Jonas CR, Puckett AB, Jones DP, Griffith DP, Szeszycki EE, Bergman GF, Furr CE, Tyre C, Carlson JL, Galloway JR, Blumberg JB, Ziegler TR. Plasma antioxidant status after high-dose chemotherapy: a randomized trial of parenteral nutrition in bone marrow transplantation patients. *Am J Clin Nutr.*, 2000 **72**(1): p. 181-9.
209. Roth, E., Oehler, R. Manhart, N. Exner, R. Wessner, B. Strasser, E. Spittler, A. Regulative potential of glutamine--relation to glutathione metabolism. *Nutrition*, 2002. **18**(3): p. 217-21.
210. Jones, D., Redefining oxidative stress. *Antioxid Redox Signal.* , 2006. **8**(9-10): p. 1865-79.

211. Samiec PS, Drews-Botsch C, Flagg EW, Kurtz JC, Sternberg P Jr, Reed RL, Jones DP. Glutathione in human plasma: decline in association with aging, age-related macular degeneration, and diabetes. *Free Radic Biol Med*, 1998 **24**(5): p. 699-704.
212. Hammarqvist F, Luo JL, Cotgreave IA, Andersson K, Wernerman J. Skeletal muscle glutathione is depleted in critically ill patients. *Crit Care Med*, 1997. **25**(1): p. 78-84.
213. Westman B, Thörne A, Rooyackers O, Fredriksson K, Wernerman J, Hammarqvist F. Glutathione and amino acid concentrations in human liver during short warm ischaemia and reperfusion: a pilot study. *Clin Sci (Lond)*. 2009 **117**(9): p. 339-44.
214. Rodas PC, Rooyackers O, Hebert C, Norberg Å, Wernerman J. Glutamine and glutathione at ICU admission in relation to outcome. *Clin Sci (Lond)*, 2012. **122**(12): p. 591-7.
215. Fläring UB, Hebert C, Wernerman J, Hammarqvist F, Rooyackers OE. Circulating and muscle glutathione turnover in human endotoxaemia. *Clin Sci (Lond)*. 2009. **117**(9): p. 313-9.
216. Chang, W.K., Yang, K. D.Chuang, H. Jan, J. T. Shaio, M. F. Glutamine protects activated human T cells from apoptosis by up-regulating glutathione and Bcl-2 levels. *Clin Immunol*, 2002. **104**(2): p. 151-60.
217. Manhart N, Vierlinger K, Spittler A, Bergmeister H, Sautner T, Roth E. Oral feeding with glutamine prevents lymphocyte and glutathione depletion of Peyer's patches in endotoxemic mice. *Ann Surg*, 2001. **234**(1): p. 92-7.
218. Filomeni G, Rotilio G, Ciriolo MR. Glutathione disulfide induces apoptosis in U937 cells by a redox-mediated p38 MAP kinase pathway. *FASEB J*, 2003. **17**(1): p. 64-6.
219. Mates, J.M., Perez-Gomez, C. Nunez de Castro, I. Asenjo, M. Marquez, J. Glutamine and its relationship with intracellular redox status, oxidative stress and cell proliferation/death. *Int J Biochem Cell Biol*, 2002. **34**(5): p. 439-58.
220. Thannickal VJ, Fanburg BL. Reactive oxygen species in cell signaling. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2000 **279**: p. L1005-28.
221. Utsugi M, Dobashi K, Koga Y, Shimizu Y, Ishizuka T, Iizuka K, Hamuro J, Nakazawa T, Mori M. Glutathione redox regulates lipopolysaccharide-induced IL-12 production through p38 mitogen-activated protein kinase activation in human monocytes: role of glutathione redox in IFN-gamma priming of IL-12 production. *J Leukoc Biol*, 2002. **71**(2): p. 339-47.
222. Wernerman J, Luo JL, Hammarqvist F. Glutathione status in critically-ill patients: possibility of modulation by antioxidants. *Proc Nutr Soc.*, 1999. **58**(3): p. 677-80.
223. Ziegler, T.R., Szeszycki, E. E. Estivariz, C. F. Puckett, A. B. Leader, L. M. Glutamine: from basic science to clinical applications. *Nutrition*, 1996. **12**(11-12 Suppl): p. S68-70.
224. Oehler, R. and E. Roth, Regulative capacity of glutamine. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 2003. **6**(3): p. 277-82.
225. Hong, R.W., Rounds, J. D. Helton, W. S Robinson, M. K. Wilmore, D. W. Glutamine preserves liver glutathione after lethal hepatic injury. *Ann Surg*, 1992. **215**(2): p. 114-9.
226. Cao, Y., Feng, Z. Hoos, A. Klimberg, V. S. Glutamine enhances gut glutathione production. *JPEN J Parenter Enteral Nutr*, 1998. **22**(4): p. 224-7.
227. Manhart, N., Vierlinger, K. Spittler, A. Bergmeister, H. Sautner, T. Roth, E. Oral feeding with glutamine prevents lymphocyte and glutathione depletion of Peyer's patches in endotoxemic mice. *Ann Surg*, 2001. **234**(1): p. 92-7.
228. Chang, W.K., K.D. Yang, and M.F. Shaio, Lymphocyte proliferation modulated by glutamine: involved in the endogenous redox reaction. *Clin Exp Immunol*, 1999. **117**(3): p. 482-8.

229. Flaring, U.B., Rooyackers, O. E. Wernerman, J. Hammarqvist, F. Glutamine attenuates post-traumatic glutathione depletion in human muscle. *Clin Sci (Lond)*, 2003. **104**(3): p. 275-82.
230. Luo, M., Fernandez-Estivariz, C. Jones, D. P. Accardi, C. R. Altheheld, B. Bazargan, N. Hao, L. Griffith, D. P. Blumberg, J. B. Galloway, J. R. Ziegler, T. R. Depletion of plasma antioxidants in surgical intensive care unit patients requiring parenteral feeding: effects of parenteral nutrition with or without alanyl-glutamine dipeptide supplementation. *Nutrition*, 2008. **24**(1): p. 37-44.
231. Wajant, H., *The Fas signaling pathway: more than a paradigm. Science.*, 2002. **296**(5573): p. 1635-6.
232. Fumarola, C., A. Zerbini, and G.G. Guidotti, Glutamine deprivation-mediated cell shrinkage induces ligand-independent CD95 receptor signaling and apoptosis. *Cell Death Differ*, 2001. **8**(10): p. 1004-13.
233. Beere HM, Green DR. Stress management - heat shock protein-70 and the regulation of apoptosis. *Trends Cell Biol.*, 2001. **11**(1): p. 6-10.
234. Exner, R., Weingartmann, G. Eliassen, M. M. Gerner, C. Spittler, A. Roth, E. Oehler, R. Glutamine deficiency renders human monocytic cells more susceptible to specific apoptosis triggers. *Surgery*, 2002. **131**(1): p. 75-80.
235. Exner R, Tamandl D, Goetzinger P, Mittlboeck M, Fuegger R, Sautner T, Spittler A, Roth E. Perioperative GLY-GLN infusion diminishes the surgery-induced period of immunosuppression: accelerated restoration of the lipopolysaccharide-stimulated tumor necrosis factor-alpha response. *Ann Surg.*, 2003. **237**(1): p. 110-5.
236. Wilmore, D.W. and J.K. Shabert, Role of glutamine in immunologic responses. *Nutrition*, 1998. **14**(7-8): p. 618-26.
237. Calder, P.C. and P. Yaqoob, Glutamine and the immune system. *Amino Acids*, 1999. **17**(3): p. 227-41.
238. Murphy, C. and P. Newsholme, Importance of glutamine metabolism in murine macrophages and human monocytes to L-arginine biosynthesis and rates of nitrite or urea production. *Clin Sci (Lond)*, 1998. **95**(4): p. 397-407.
239. Wu, G., C.J. Field, and E.B. Marliss, Enhanced glutamine and glucose metabolism in cultured rat splenocytes stimulated by phorbol myristate acetate plus ionomycin. *Metabolism*, 1992. **41**(9): p. 982-8.
240. Furukawa, S., Saito, H. Inoue, T. Matsuda, T. Fukatsu, K. Han, I. Ikeda, S. Hidemura, A. Supplemental glutamine augments phagocytosis and reactive oxygen intermediate production by neutrophils and monocytes from postoperative patients in vitro. *Nutrition*, 2000. **16**(5): p. 323-9.
241. Parry-Billings, M., Evans, J. Calder, P. C. Newsholme, E. A. Does glutamine contribute to immunosuppression after major burns? *Lancet*, 1990. **336**(8714): p. 523-5.
242. Calder, P.C., Glutamine and the immune system. *Clin Nutr*, 1994. **13**(1): p. 2-8.
243. O'Riordain, M.G., Fearon, K. C. Ross, J. A. Rogers, P. Falconer, J. S. Bartolo, D. C. Garden, O. J. Carter, D. C. Glutamine-supplemented total parenteral nutrition enhances T-lymphocyte response in surgical patients undergoing colorectal resection. *Ann Surg*, 1994. **220**(2): p. 212-21.
244. Franěk F, Srámková K. Protection of B lymphocyte hybridoma against starvation-induced apoptosis: survival-signal role of some amino acids. *Immunol Lett.* , 1996. **52**(2-3): p. 139-144.
245. Yaqoob, P. and P.C. Calder, Cytokine production by human peripheral blood mononuclear cells: differential sensitivity to glutamine availability. *Cytokine*, 1998. **10**(10): p. 790-4.
246. Newsholme, P., Procopio, J Lima, M. M. Pithon-Curi, T. C. Curi, R. Glutamine and glutamate--their central role in cell metabolism and function. *Cell Biochem Funct*, 2003. **21**(1): p. 1-9.
247. Ertel W, Faist E, Nestle C, Hueltnner L, Storck M, Schildberg FW. Kinetics of interleukin-2 and interleukin-6 synthesis following major mechanical trauma. *J Surg Res*, 1990. **48**(6): p. 622-8.

248. Yaqoob, P. and P.C. Calder, *Glutamine requirement of proliferating T lymphocytes. Nutrition, 1997. 13(7-8): p. 646-51.*
249. Ardawi, M.S., *Effect of glutamine-enriched total parenteral nutrition on septic rats. Clin Sci (Lond), 1991. 81(2): p. 215-22.*
250. Inoue, Y., J.P. Grant, and P.J. Snyder, *Effect of glutamine-supplemented intravenous nutrition on survival after Escherichia coli-induced peritonitis. JPEN J Parenter Enteral Nutr, 1993. 17(1): p. 41-6.*
251. Naka, S., Saito, H. Hashiguchi, Y. Lin, M. T. Furukawa, S. Inaba, T. Fukushima, R. Wada, N. Muto, T. *Alanyl-glutamine-supplemented total parenteral nutrition improves survival and protein metabolism in rat protracted bacterial peritonitis model. JPEN J Parenter Enteral Nutr, 1996. 20(6): p. 417-23.*
252. Morlion BJ, Stehle P, Wachtler P, Siedhoff HP, Köller M, König W, Fürst P, Puchstein C. *Total parenteral nutrition with glutamine dipeptide after major abdominal surgery: a randomized, double-blind, controlled study. . Ann Surg., 1998. 227(2): p. 302-8.*
253. Yoshida, S., Matsui, M. Shirouzu, Y. Fujita, H. Yamana, H. Shirouzu, K. *Effects of glutamine supplements and radiochemotherapy on systemic immune and gut barrier function in patients with advanced esophageal cancer. Ann Surg, 1998. 227(4): p. 485-91.*
254. Yoshida S, Matsui M, Shirouzu Y, Fujita H, Yamana H, Shirouzu K. *Effects of glutamine supplements and radiochemotherapy on systemic immune and gut barrier function in patients with advanced esophageal cancer. . Ann Surg. , 1998. 227(4): p. 485-91.*
255. Ardawi, M.S., *Glutamine and glucose metabolism in human peripheral lymphocytes. Metabolism, 1988. 37(1): p. 99-103.*
256. Brand, K., Fekl, W. von Hintzenstern, J. Langer, K. Lupp, P. Schoerner, C *Metabolism of glutamine in lymphocytes. Metabolism, 1989. 38(8 Suppl 1): p. 29-33.*
257. O'Rourke, A.M. and C.C. Rider, *Glucose, glutamine and ketone body utilisation by resting and concanavalin A activated rat splenic lymphocytes. Biochim Biophys Acta, 1989. 1010(3): p. 342-5.*
258. Boelens, P.G., Houdijk, A. P. Fonk, J. C. Nijveldt, R. J. Ferwerda, C. C. Von Blomberg-Van Der Flier, B. M. Thijs, L. G. Haarman, H. J. Puyana, J. C. Van Leeuwen, P. A. *Glutamine-enriched enteral nutrition increases HLA-DR expression on monocytes of trauma patients. J Nutr, 2002. 132(9): p. 2580-6.*
259. Ziegler, T.R., Bye, R. L. Persinger, R. L. Young, L. S. Antin, J. H. Wilmore, D. W. *Effects of glutamine supplementation on circulating lymphocytes after bone marrow transplantation: a pilot study. Am J Med Sci, 1998. 315(1): p. 4-10.*
260. Roth, E., *Nonnutritive effects of glutamine. J Nutr, 2008. 138(10): p. 2025S-2031S.*
261. Heberer M, Babst R, Juretic A, Gross T, Hörig H, Harder F, Spagnoli GC. *Role of glutamine in the immune response in critical illness. Nutrition., 1996 12(11-12 Suppl): p. S71-2.*
262. Kudsk, K.A., *Glutamine: more evidence, more promise. JPEN J Parenter Enteral Nutr, 2008. 32(4): p. 492-4.*
263. Alverdy, J.C., *Effects of glutamine-supplemented diets on immunology of the gut. JPEN J Parenter Enteral Nutr, 1990. 14(4 Suppl): p. 109S-113S.*
264. Li, J., Kudsk, K. A. Janu, P. Renegar, K. B. *Effect of glutamine-enriched total parenteral nutrition on small intestinal gut-associated lymphoid tissue and upper respiratory tract immunity. Surgery, 1997. 121(5): p. 542-9.*
265. Alverdy, J., *Effects of glutamine-supplemented diets on immunology of the gut. JPEN J Parenter Enteral Nutr., 1990 14(4 Suppl): p. 109S-113S.*

266. Hammarqvist, F., Wernerman, J. Ali, R. von der Decken, A. Vinnars, E. Addition of glutamine to total parenteral nutrition after elective abdominal surgery spares free glutamine in muscle, counteracts the fall in muscle protein synthesis, and improves nitrogen balance. *Ann Surg*, 1989. **209**(4): p. 455-61.
267. Palmer, T.E., R.D. Griffiths, and C. Jones, Effect of parenteral L-glutamine on muscle in the very severely ill. *Nutrition*, 1996. **12**(5): p. 316-20.
268. Tjader, I., Rooyackers, O. Forsberg, A. M. Vesali, R. F. Garlick, P. J. Wernerman, J. Effects on skeletal muscle of intravenous glutamine supplementation to ICU patients. *Intensive Care Med*, 2004. **30**(2): p. 266-75.
269. Vesali, R.F., Klaude, M. Rooyackers, O. E. T. Jader I Barle, H. Wernerman, J. Longitudinal pattern of glutamine/glutamate balance across the leg in long-stay intensive care unit patients. *Clin Nutr*, 2002. **21**(6): p. 505-14.
270. Gamrin L, K Andersson, EH ultman, E Nilsson, P Essén, J Wernerman Longitudinal changes of biochemical parameters in muscle during critical illness. *Metabolism*, 1997. **46**: p. 756-762.
271. van der Hulst, R.R., von Meyenfeldt, M. F. Tiebosch, A. Buurman, W. A. Soeters, P. B. Glutamine and intestinal immune cells in humans. *JPEN J Parenter Enteral Nutr*, 1997. **21**(6): p. 310-5.
272. Haussinger, D., Glutamine metabolism in the liver: overview and current concepts. *Metabolism*, 1989. **38**(8 Suppl 1): p. 14-7.
273. Newsholme, E.A., B. Crabtree, and M.S. Ardawi, Glutamine metabolism in lymphocytes: its biochemical, physiological and clinical importance. *Q J Exp Physiol*, 1985. **70**(4): p. 473-89.
274. Feng, B., D.C. Hilt, and S.R. Max, Transcriptional regulation of glutamine synthetase gene expression by dexamethasone in L6 muscle cells. *J Biol Chem*, 1990. **265**(30): p. 18702-6.
275. Smith, R.J., Larson, S. Stred, S. E. Durschlag, R. P. Regulation of glutamine synthetase and glutaminase activities in cultured skeletal muscle cells. *J Cell Physiol*, 1984. **120**(2): p. 197-203.
276. Muhlbacher, F., Kapadia, C. R. Colpoys, M. F. Smith, R. J. Wilmore, D. W. Effects of glucocorticoids on glutamine metabolism in skeletal muscle. *Am J Physiol*, 1984. **247**(1 Pt 1): p. E75-83.
277. Max, S.R., Mill, J. Mearow, K. Konagaya, M. Konagaya, Y. Thomas, J. W. Banner, C. Vitkovic, L. Dexamethasone regulates glutamine synthetase expression in rat skeletal muscles. *Am J Physiol*, 1988. **255**(3 Pt 1): p. E397-402.
278. Souba, W.W., Plumley, D. A. Salloum, R. M. Copeland, E. M., Effects of glucocorticoids on lung glutamine and alanine metabolism. *Surgery*, 1990. **108**(2): p. 213-8; discussion 218-9.
279. Ardawi, M.S., Glutamine-synthesizing activity in lungs of fed, starved, acidotic, diabetic, injured and septic rats. *Biochem J*, 1990. **270**(3): p. 829-32.
280. Souba, W.W., R.J. Smith, and D.W. Wilmore, Glutamine metabolism by the intestinal tract. *JPEN J Parenter Enteral Nutr*, 1985. **9**(5): p. 608-17.
281. Miller, B.M., Cersosimo, E. McRae, J. Williams, P. E. Lacy, W. W. Abumrad, N. N. Interorgan relationships of alanine and glutamine during fasting in the conscious dog. *J Surg Res*, 1983. **35**(4): p. 310-8.
282. Souba, W.W., R.J. Smith, and D.W. Wilmore, Effects of glucocorticoids on glutamine metabolism in visceral organs. *Metabolism*, 1985. **34**(5): p. 450-6.
283. Sarantos P, Abouhamze A, Souba WW. Glucocorticoids regulate intestinal glutaminase expression. *Surgery*, 1992 **112**(2): p. 278-83.
284. Dudrick PS, Sarantos P, Ockert K, Chakrabarti R, Copeland EM, Souba WW. Dexamethasone stimulation of glutaminase expression in mesenteric lymph nodes. *Am J Surg*, 1993 **165**(1): p. 34-9.

285. Souba WW, Wilmore DW. Postoperative alteration of arteriovenous exchange of amino acids across the gastrointestinal tract. *Surgery*, 1983. **94**(2): p. 342-50.
286. Zamir O, Hasselgren PO, Higashiguchi T, Frederick JA, Fischer JE. Tumour necrosis factor (TNF) and interleukin-1 (IL-1) induce muscle proteolysis through different mechanisms. *Mediators Inflamm.*, 1992. **1**(4): p. 247-50.
287. Watkins KT, Dudrick PS, Copeland EM, Souba WW. Interleukin-6 and dexamethasone work coordinately to augment hepatic amino acid transport. *J Trauma*, 1994. **36**(4): p. 523-8.
288. Austgen TR, Plumley DA, Souba WW. Simple method of determining pulmonary blood flow in the anesthetized rat. *J Invest Surg*, 1991. **4**(1): p. 81-6.
289. Herskowitz, K., Bode, B. P. Block, E. R. Souba, W. W. The effects of endotoxin on glutamine transport by pulmonary artery endothelial cells. *J Surg Res*, 1991. **50**(4): p. 356-61.
290. Souba, W.W., Salloum, R. M. Bode, B. P. Herskowitz, K. Cytokine modulation of glutamine transport by pulmonary artery endothelial cells. *Surgery*, 1991. **110**(2): p. 295-301; discussion 301-2.
291. Austgen TR, Chen MK, Salloum RM, Souba WW. Glutamine metabolism by the endotoxin-injured lung. *J Trauma*, 1991. **31**(8): p. 1068-74.
292. Plumley DA, Souba WW, Hautamaki RD, Martin TD, Flynn TC, Rout WR, Copeland EM 3rd. Accelerated lung amino acid release in hyperdynamic septic surgical patients. *Arch Surg*, 1990. **125**(1): p. 57-61.
293. Dudrick, P.S., Salloum, R. M. Copeland, E. M., 3rd Souba, W. W. The early response of the jejunal brush border glutamine transporter to endotoxemia. *J Surg Res*, 1992. **52**(4): p. 372-7.
294. Souba, W.W., Herskowitz, K. Klimberg, V. S. Salloum, R. M. Plumley, D. A. Flynn, T. C. Copeland, E. M., 3rd The effects of sepsis and endotoxemia on gut glutamine metabolism. *Ann Surg*, 1990. **211**(5): p. 543-9; discussion 549-51.
295. Austgen TR, Chen MK, Flynn TC, Souba WW. The effects of endotoxin on the splanchnic metabolism of glutamine and related substrates. *J Trauma*, 1991. **31**(6): p. 742-51.
296. Salloum, R.M., E.M. Copeland, and W.W. Souba, Brush border transport of glutamine and other substrates during sepsis and endotoxemia. *Ann Surg*, 1991. **213**(5): p. 401-9; discussion 409-10.
297. Brand, K., Leibold, W. Lippa, P. Schoerner, C. Schulz, A. Metabolic alterations associated with proliferation of mitogen-activated lymphocytes and of lymphoblastoid cell lines: evaluation of glucose and glutamine metabolism. *Immunobiology*, 1986. **173**(1): p. 23-34.
298. Austgen TR, Chen MK, Moore W, Souba WW. Endotoxin and renal glutamine metabolism. *Arch Surg*, 1991. **126**(1): p. 23-7.
299. Inoue, Y., A.J. Pacitti, and W.W. Souba, Endotoxin increases hepatic glutamine transport activity. *J Surg Res*, 1993. **54**(5): p. 393-400.
300. L Gamrin, P., Essén, AM Forsberg, E Hultman, J Wernerman A descriptive study of skeletal muscle metabolism in critically ill patients: free amino acids, energy-rich phosphates, protein, nucleic acids, fat, water, and electrolytes *Crit Care Med*. **24**: p. 575-83.
301. Mittendorfer, B., Gore, D. C. Herndon, D. N. Wolfe, R. R. Accelerated glutamine synthesis in critically ill patients cannot maintain normal intramuscular free glutamine concentration. *JPEN J Parenter Enteral Nutr*, 1999. **23**(5): p. 243-50; discussion 250-2.
302. Stehle, P., Zander, J. Mertes, N. Albers, S. Puchstein, C. Lawin, P. Furst, P. Effect of parenteral glutamine peptide supplements on muscle glutamine loss and nitrogen balance after major surgery. *Lancet*, 1989. **1**(8632): p. 231-3.

303. Dechelotte, P., Darmaun, D. Rongier, M. Hecketsweiler, B. Rigal, O. Desjeux, J. F. Absorption and metabolic effects of enterally administered glutamine in humans. *Am J Physiol*, 1991. **260**(5 Pt 1): p. 6677-82.
304. Houdijk, A.P., van Leeuwen, P. A. Glutamine-enriched enteral nutrition in multiple trauma patients. *Nutrition*, 2000. **16**(1): p. 70-1.
305. Gore, D.C. and R.R. Wolfe, Metabolic response of muscle to alanine, glutamine, and valine supplementation during severe illness. *JPEN J Parenter Enteral Nutr*, 2003. **27**(5): p. 307-14.
306. Januszkiewicz, A., Essen, P. McNurlan, M. A. Calder, G. A. Andersson, K. Wernerman, J. Garlick, P. J. Effect of a short-term infusion of glutamine on muscle protein metabolism postoperatively. *Clin Nutr*, 1996. **15**(5): p. 267-73.
307. Petersson, B., Waller, S. O. Vinnars, E. Wernerman, J. Long-term effect of glycyl-glutamine after elective surgery on free amino acids in muscle. *JPEN J Parenter Enteral Nutr*, 1994. **18**(4): p. 320-5.
308. Oudemans-van Straaten, H.M., Bosman, R. J. Treskes, M. van der Spoel, H. J. Zandstra, D. F. Plasma glutamine depletion and patient outcome in acute ICU admissions. *Intensive Care Med*, 2001. **27**(1): p. 84-90.
309. Novak, F., Heyland, D. K. Avenell, A. Drover, J. W. Su, X. Glutamine supplementation in serious illness: a systematic review of the evidence. *Crit Care Med*, 2002. **30**(9): p. 2022-9.
310. Griffiths, R.D., C. Jones, and T.E. Palmer, Six-month outcome of critically ill patients given glutamine-supplemented parenteral nutrition. *Nutrition*, 1997. **13**(4): p. 295-302.
311. Dechelotte, P., Hasselmann, M. ACynober, Lllaouchiche, B. Coeffier, M. Hecketsweiler, B. Merle, V. Mazerolles, M. Samba, D. Guillou, Y. M. Petit, J. Mansoor, O. Colas, G. Cohendy, R. Barnoud, D. Czernichow, P. Bleichner, G. L-alanyl-L-glutamine dipeptide-supplemented total parenteral nutrition reduces infectious complications and glucose intolerance in critically ill patients: the French controlled, randomized, double-blind, multicenter study. *Crit Care Med*, 2006. **34**(3): p. 598-604.
312. Fuentes-Orozco, C., Anaya-Prado, R. Gonzalez-Ojeda, A. Arenas-Marquez, H. Cabrera-Pivaral, C. Cervantes-Guevara, G. Barrera-Zepeda, L. M. L-alanyl-L-glutamine-supplemented parenteral nutrition improves infectious morbidity in secondary peritonitis. *Clin Nutr*, 2004. **23**(1): p. 13-21.
313. Fuentes-Orozco, C., Cervantes-Guevara, G. Mucino-Hernandez, I. Lopez-Ortega, A. Ambriz-Gonzalez, G. Gutierrez-de-la-Rosa, J. L. Gomez-Herrera, E. Hermosillo-Sandoval, J. M. Gonzalez-Ojeda, A. L-alanyl-L-glutamine-supplemented parenteral nutrition decreases infectious morbidity rate in patients with severe acute pancreatitis. *JPEN J Parenter Enteral Nutr*, 2008. **32**(4): p. 403-11.
314. Wischmeyer, P.E., Lynch, J. Liedel, J. Wolfson, R. Riehm, J. Gottlieb, L. Kahana, M. Glutamine administration reduces Gram-negative bacteremia in severely burned patients: a prospective, randomized, double-blind trial versus isonitrogenous control. *Crit Care Med*, 2001. **29**(11): p. 2075-80.
315. Berg, A., Norberg, A. Martling, C. R. Gamrin, L. Rooyackers, O. Wernerman, J. Glutamine kinetics during intravenous glutamine supplementation in ICU patients on continuous renal replacement therapy. *Intensive Care Med*, 2007. **33**(4): p. 660-6.
316. Berg, A., Bellander, B. M. Wanecek, M. Gamrin, L. Elving, A. Rooyackers, O. Ungerstedt, U. Wernerman, J. Intravenous glutamine supplementation to head trauma patients leaves cerebral glutamate concentration unaffected. *Intensive Care Med*, 2006. **32**(11): p. 1741-6.
317. Jefferson LS, Kimball SR. Amino acid regulation of gene expression. *J Nutr.*, 2001. **131**(9 Suppl): p. 2460S-6S.
318. Christie GR, Hajdich E, Hundal HS, Proud CG, Taylor PM. Intracellular sensing of amino acids in *Xenopus laevis* oocytes stimulates p70 S6 kinase in a target of rapamycin-dependent manner. *J Biol Chem*, 2002. **277**(12): p. 9952-7.

319. Crespo, J.L., Powers, T. Fowler, B. Hall, M. N. The TOR-controlled transcription activators *GLN3*, *RTG1*, and *RTG3* are regulated in response to intracellular levels of glutamine. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002. **99**(10): p. 6784-9.
320. Hardie DG, Hawley SA. AMP-activated protein kinase: the energy charge hypothesis revisited. *Bioessays*, 2001. **23**(12): p. 1112-9.
321. Ko, Y.G., Kim, E. Y. Kim, T. Park, H. Park, H. S. Choi, E. J. Kim, S. Glutamine-dependent antiapoptotic interaction of human glutaminyl-tRNA synthetase with apoptosis signal-regulating kinase 1. *J Biol Chem*, 2001. **276**(8): p. 6030-6.
322. Parry-Billings, M., Baigrie, R. J. Lamont, P. M. Morris, P. J. Newsholme, E. A. Effects of major and minor surgery on plasma glutamine and cytokine levels. *Arch Surg*, 1992. **127**(10): p. 1237-40.
323. Powell, H., Castell, L. M. Parry-Billings, M. Desborough, J. P. Hall, G. M. Newsholme, E. A. Growth hormone suppression and glutamine flux associated with cardiac surgery. *Clin Physiol*, 1994. **14**(5): p. 569-80.
324. Newsholme, E.A. and P.C. Calder, The proposed role of glutamine in some cells of the immune system and speculative consequences for the whole animal. *Nutrition*, 1997. **13**(7-8): p. 728-30.
325. Tjader, I., A. Berg, and J. Wernerman, Exogenous glutamine--compensating a shortage? *Crit Care Med*, 2007. **35**(9 Suppl): p. S553-6.
326. Chang, W.K., K.D. Yang, and M.F. Shaio, Effect of glutamine on Th1 and Th2 cytokine responses of human peripheral blood mononuclear cells. *Clin Immunol*, 1999. **93**(3): p. 294-301.
327. Engel, J.M., Ruhs, S. Muhling, J. Katzer, C. Muller, M. Menges, T. Langefeld, T. Hempelmann, G. Perioperative application of L-alanyl-L-glutamine in cardiac surgery: effect on the polarized T cell cytokine expression. *Amino Acids*, 2009. **36**(3): p. 519-27.
328. Rhoads, J.M., Argenzio, R. A. Chen, W. Graves, L. M. Licato, L. L. Blikslager, A. T. Smith, J. Gatzky, J. Brenner, D. A. Glutamine metabolism stimulates intestinal cell MAPKs by a cAMP-inhibitable, Raf-independent mechanism. *Gastroenterology*, 2000. **118**(1): p. 90-100.
329. Horig, H., Spagnoli, G. C. Filgueira, L. Babst, R. Gallati, H. Harder, F. Juretic, A. Heberer, M. Exogenous glutamine requirement is confined to late events of T cell activation. *J Cell Biochem*, 1993. **53**(4): p. 343-51.
330. Kew S, Wells SM, Yaqoob P, Wallace FA, Miles EA, Calder PC. Dietary glutamine enhances murine T-lymphocyte responsiveness. *J Nutr.*, 1999. **129**(8): p. 1524-31.
331. Ziegler, T.R., Glutamine is essential for epidermal growth factor-stimulated intestinal cell proliferation. *JPEN J Parenter Enteral Nutr*, 1994. **18**(1): p. 84-6.
332. Furukawa, S., Saito, H. Fukatsu, K. Hashiguchi, Y. Inaba, T. Lin, M. T. Inoue, T. Han, I. Matsuda, T. Muto, T. Glutamine-enhanced bacterial killing by neutrophils from postoperative patients. *Nutrition*, 1997. **13**(10): p. 863-9.
333. Spittler, A., Sautner, T. Gornikiewicz, A. Manhart, N. Oehler, R. Bergmann, M. Fugger, R. Roth, E. Postoperative glycyl-glutamine infusion reduces immunosuppression: partial prevention of the surgery induced decrease in HLA-DR expression on monocytes. *Clin Nutr*, 2001. **20**(1): p. 37-42.
334. Exner R, Tamandl D, Goetzinger P, Mittlboeck M, Fuegger R, Sautner T, Spittler A, Roth E. Perioperative GLY-GLN infusion diminishes the surgery-induced period of immunosuppression: accelerated restoration of the lipopolysaccharide-stimulated tumor necrosis factor-alpha response. *Ann Surg Oncol*, 2003. **237**(1): p. 110-5.
335. Roth, E., Nonnutritive effects of glutamine. *J Nutr.*, 2008. **138**(10): p. 2025S-2031S.

336. Buchman, A.L., *Glutamine: a conditionally required nutrient for the human intestine?* *Nutrition*, 1997. **13**(3): p. 240-1.
337. Sedman PC, Macfie J, Sagar P, Mitchell CJ, May J, Mancey-Jones B, Johnstone D. *The prevalence of gut translocation in humans.* *Gastroenterology*, 1994. **107**(3): p. 643-9.
338. Buchman AL, Mestecky J, Moukarzel A, Ament ME. *Intestinal immune function is unaffected by parenteral nutrition in man.* *J Am Coll Nutr*, 1995 **14**(6): p. 656-61.
339. Wilmore DW, Smith RJ, O'Dwyer ST, Jacobs DO, Ziegler TR, Wang XD. *The gut: a central organ after surgical stress.* *Surgery*, 1988. **104**(5): p. 917-23.
340. Rhoads, J.M., Argenzio, R. A. Chen, W. Rippe, R. A. Westwick, J. K. Cox, A. D. Berschneider, H. M. Brenner, D. A. *L-glutamine stimulates intestinal cell proliferation and activates mitogen-activated protein kinases.* *Am J Physiol*, 1997. **272**(5 Pt 1): p. G943-53.
341. Simmons JG, Hoyt EC, Westwick JK, Brenner DA, Pucilowska JB, Lund PK. *Insulin-like growth factor-I and epidermal growth factor interact to regulate growth and gene expression in IEC-6 intestinal epithelial cells.* *Mol Endocrinol*, 1995. **9**(9): p. 1157-65.
342. Larson SD, Li J, Chung DH, Evers BM. *Molecular mechanisms contributing to glutamine-mediated intestinal cell survival.* *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2007. **293**(6): p. G1262-71.
343. Ziegler, T.R., Mantell, M. P. Rombeau, J. L. Smith, R. J. *Gut adaptation and the insulin-like growth factor system: regulation by glutamine and IGF-I administration.* *Am J Physiol*, 1996. **271**(5 Pt 1): p. G866-75.
344. Stoll B, Burrin DG. *Measuring splanchnic amino acid metabolism in vivo using stable isotopic tracers.* *J Anim Sci*, 2006. **84**: p. Suppl:E60-72.
345. Ko TC, Beauchamp RD, Townsend CM Jr, Thompson JC. *Glutamine is essential for epidermal growth factor-stimulated intestinal cell proliferation.* *Surgery*, 1993. **114**(2): p. 147-53.
346. Phanvijhitsiri K, Musch MW, Ropeleski MJ, Chang EB *Heat induction of heat shock protein 25 requires cellular glutamine in intestinal epithelial cells.* *Am J Physiol Cell Physiol*, 2006. **291**(2): p. C290-9.
347. Ropeleski MJ, Riehm J, Baer KA, Musch MW, Chang EB. *Anti-apoptotic effects of L-glutamine-mediated transcriptional modulation of the heat shock protein 72 during heat shock.* *Gastroenterology*, 2005. **129**(1): p. 170-84.
348. Bilban M, Haschemi A, Wegiel B, Chin BY, Wagner O, Otterbein LE. *Heme oxygenase and carbon monoxide initiate homeostatic signaling.* *J Mol Med (Berl)*, 2008. **86**(3): p. 267-79.
349. Uehara, K., et al., *The lower intestinal tract-specific induction of heme oxygenase-1 by glutamine protects against endotoxemic intestinal injury.* *Crit Care Med*, 2005. **33**(2): p. 381-90.
350. Li, N., et al., *Glutamine regulates Caco-2 cell tight junction proteins.* *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2004. **287**(3): p. G726-33.
351. Babst, R., et al., *Glutamine peptide-supplemented long-term total parenteral nutrition: effects on intracellular and extracellular amino acid patterns, nitrogen economy, and tissue morphology in growing rats.* *JPEN J Parenter Enteral Nutr*, 1993. **17**(6): p. 566-74.
352. Inoue, Y., J.P. Grant, and P.J. Snyder, *Effect of glutamine-supplemented total parenteral nutrition on recovery of the small intestine after starvation atrophy.* *JPEN J Parenter Enteral Nutr*, 1993. **17**(2): p. 165-70.
353. Platell, C., et al., *Influence of glutamine and branched chain amino acids on the jejunal atrophy associated with parenteral nutrition.* *J Gastroenterol Hepatol*, 1991. **6**(4): p. 345-9.
354. Ardawi, M.S., *Effects of epidermal growth factor and glutamine-supplemented parenteral nutrition on the small bowel of septic rats.* *Clin Sci (Lond)*, 1992. **82**(5): p. 573-80.

355. O'Dwyer, S.T., Smith, R. J Hwang, T. L. Wilmore, D. W. Maintenance of small bowel mucosa with glutamine-enriched parenteral nutrition. *JPEN J Parenter Enteral Nutr*, 1989. **13**(6): p. 579-85.
356. Souba, W.W., Klimberg, V. S. Plumley, D. A. Salloum, R. M. Flynn, T. C. Bland, K. I. Copeland, E. M., 3rd The role of glutamine in maintaining a healthy gut and supporting the metabolic response to injury and infection. *J Surg Res*, 1990. **48**(4): p. 383-91.
357. Buchman AL, Moukarzel AA, Bhuta S, Belle M, Ament ME, Eckhert CD, Hollander D, Gornbein J, Kopple JD, Vijayaraghavan SR. Parenteral nutrition is associated with intestinal morphologic and functional changes in humans. *JPEN J Parenter Enteral Nutr.*, 1995. **19**(6): p. 453-60.
358. Sedman PC, MacFie J, Palmer MD, Mitchell CJ, Sagar PM. Preoperative total parenteral nutrition is not associated with mucosal atrophy or bacterial translocation in humans. *Br J Surg*, 1995. **82**(12): p. 1663-7.
359. Tremel, H., Kienle, B. Weilemann, L. S. Stehle, P. Furst, P. Glutamine dipeptide-supplemented parenteral nutrition maintains intestinal function in the critically ill. *Gastroenterology*, 1994. **107**(6): p. 1595-601.
360. 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*, 1994. **107**(2): p. 429-34.
361. Coeffier, M., Marion, R. Ducrotte, P. Dechelotte, P. Modulating effect of glutamine on IL-1beta-induced cytokine production by human gut. *Clin Nutr*, 2003. **22**(4): p. 407-13.
362. Coeffier, M., Miralles-Barrachina, O. Le Pessot, F. Lalaude, O. Daveau, M. Lavoinne, A. Lerebours, E. Dechelotte, P. Influence of glutamine on cytokine production by human gut in vitro. *Cytokine*, 2001. **13**(3): p. 148-54.
363. Houdijk, A.P., Rijnsburger, E. R. Jansen, J. Wesdorp, R. I. Weiss, J. K. McCamish, M. A. Teerlink, T. Meuwissen, S. G. Haarman, H. J. Thijs, L. G. van Leeuwen, P. A. Randomised trial of glutamine-enriched parenteral nutrition on infectious morbidity in patients with multiple trauma. *Lancet*, 1998. **352**(9130): p. 772-6.
364. Chen, G., Shi, J. Qi, M. Yin, H. Hang, C. Glutamine decreases intestinal nuclear factor kappa B activity and pro-inflammatory cytokine expression after traumatic brain injury in rats. *Inflamm Res*, 2008. **57**(2): p. 57-64.
365. Albanese CT, Smith SD, Watkins S, Kurkchubasche A, Simmons RL, Rowe MI. Effect of secretory IgA on transepithelial passage of bacteria across the intact ileum in vitro. *J Am Coll Surg.*, 1994. **179**(6): p. 679-88.
366. Niederman MS, Merrill WW, Polomski LM, Reynolds HY, Gee JB. Influence of sputum IgA and elastase on tracheal cell bacterial adherence. *Am Rev Respir Dis*, 1986. **133**(2): p. 255-60.
367. Corthésy, B., Secretory immunoglobulin A: well beyond immune exclusion at mucosal surfaces. *Immunopharmacol Immunotoxicol.*, 2009. **31**(2): p. 174-9.
368. Corthésy, B., Roundtrip ticket for secretory IgA: role in mucosal homeostasis? *J Immunol.*, 2007. **178**(1): p. 27-32.
369. Fukatsu K, Kudsk KA. Nutrition and gut immunity. *Surg Clin North Am.*, 2011. **91**(4): p. 755-70.
370. Kudsk KA, Hermsen JL, Genton L, Faucher L, Gomez FE. Injury stimulates an innate respiratory immunoglobulin a immune response in humans. *J Trauma*, 2008. **64**(2): p. 316-23.
371. Jonker MA, Sano Y, Hermsen JL, Lan J, Kudsk KA. Proinflammatory cytokine surge after injury stimulates an airway immunoglobulin a increase. *J Trauma*, 2010. **69**(4): p. 843-8.

372. Fujimura Y, Haruma K, Owen RL. Bombesin prevents the atrophy of Peyer's patches and the dysfunction of M cells in rabbits receiving long-term parenteral nutrition. *JPEN J Parenter Enteral Nutr.*, 2007. **31**(2): p. 75-85.
373. King BK, Li J, Kudsk KA. A temporal study of TPN-induced changes in gut-associated lymphoid tissue and mucosal immunity. *Arch Surg.*, 1997. **132**(12): p. 1303-9.
374. Sano Y, Hermsen JL, Kang W, Gomez FE, Lan J, Maeshima Y, Kudsk KA. Parenteral nutrition maintains pulmonary IgA antibody transport capacity, but not active transport, following injury. *Am J Surg Pathol*, 2009. **198**(1): p. 105-9.
375. Kudsk K, Jonathan E Rhoads lecture: Of mice and men... and a few hundred rats. *JPEN J Parenter Enteral Nutr*, 2008. **32**(4): p. 460-73.
376. Kudsk KA, Croce MA, Fabian TC, Minard G, Tolley EA, Poret HA, Kuhl MR, Brown RO. Enteral versus parenteral feeding. Effects on septic morbidity after blunt and penetrating abdominal trauma. *Ann Surg Oncol*, 1992 **215**(5): p. 503-11.
377. Jonker MA, Hermsen JL, Sano Y, Heneghan AF, Lan J, Kudsk KA. Small intestine mucosal immune system response to injury and the impact of parenteral nutrition. *Surgery.*, 2012. **151**(2): p. 278-86.
378. Kang W, Kudsk KA. Is there evidence that the gut contributes to mucosal immunity in humans? *JPEN J Parenter Enteral Nutr*, 2007. **31**(3): p. 246-58.
379. Kress HG, Scheidewig C, Schmidt H, Silber R. Reduced incidence of postoperative infection after intravenous administration of an immunoglobulin A- and immunoglobulin M-enriched preparation in anergic patients undergoing cardiac surgery. *Crit Care Med*, 1999. **27**(7): p. 1281-7.
380. Annane D, Clair B, Mathieu B, Boucly C, Lesieur O, Donetti L, Gatey M, Raphael JC, Gajdos P. Immunoglobulin A levels in bronchial samples during mechanical ventilation and onset of nosocomial pneumonia in critically ill patients. *Am J Respir Crit Care Med*, 1996. **153**(5): p. 1585-90.
381. Perkkio M, Savilahti E. Time of appearance of immunoglobulin-containing cells in the mucosa of the neonatal intestine. *Pediatr Res.*, 1980. **14**(8): p. 953-5.
382. Knox, W., Restricted feeding and human intestinal plasma cell development. *Arch Dis Child.*, 1986. **61**(8): p. 744-9.
383. Machado CS, Rodrigues MA, Maffei HV. Assessment of gut intraepithelial lymphocytes during late gestation and the neonatal period. *Biol Neonate*, 1994. **66**(6): p. 324-9.
384. Okamoto K, Fukatsu K, Ueno C, Shinto E, Hashiguchi Y, Nagayoshi H, Hiraide H, Mochizuki H. T lymphocyte numbers in human gut associated lymphoid tissue are reduced without enteral nutrition. *JPEN J Parenter Enteral Nutr*, 2005. **29**(1): p. 56-8.
385. Wijesinha SS, Steer HW. Studies of the immunoglobulin-producing cells of the human intestine: the defunctioned bowel. *Gut*, 1982. **23**(3): p. 211-4.
386. Nose, K., Yang, H. Sun, X. Nose, S. Koga, H. Feng, Y. Miyasaka, E. Teitelbaum, D. H. Glutamine prevents total parenteral nutrition-associated changes to intraepithelial lymphocyte phenotype and function: a potential mechanism for the preservation of epithelial barrier function. *J Interferon Cytokine Res*, 2010. **30**(2): p. 67-80.
387. DeWitt, R.C., Wu, Y. Renegar, K. B. Kudsk, K. A. Glutamine-enriched total parenteral nutrition preserves respiratory immunity and improves survival to a *Pseudomonas Pneumonia*. *J Surg Res*, 1999. **84**(1): p. 13-8.
388. Jensen, G.L., Miller, R. H. Talabiska, D. G. Fish, J. Gianferante, L. A double-blind, prospective, randomized study of glutamine-enriched compared with standard peptide-based feeding in critically ill patients. *Am J Clin Nutr*, 1996. **64**(4): p. 615-21.

389. Ziegler, T.R., Young, L. S. Benfell, K. Scheltinga, 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-blind, controlled study. *Ann Intern Med*, 1992. **116**(10): p. 821-8.
390. Schloerb, P.R., Amare, M Total parenteral nutrition with glutamine in bone marrow transplantation and other clinical applications (a randomized, double-blind study). *JPEN J Parenter Enteral Nutr*, 1993. **17**(5): p. 407-13.
391. Griffiths RD, Jones C, Palmer TE. Six-month outcome of critically ill patients given glutamine-supplemented parenteral nutrition. *Nutrition*, 1997. **13**(4): p. 295-302.
392. Griffiths RD, Allen KD, Andrews FJ, Jones C. Infection, multiple organ failure, and survival in the intensive care unit: influence of glutamine-supplemented parenteral nutrition on acquired infection. *Nutrition*, 2002. **18**(7-8): p. 546-52.
393. Jones, C., T.E. Palmer, and R.D. Griffiths, Randomized clinical outcome study of critically ill patients given glutamine-supplemented enteral nutrition. *Nutrition*, 1999. **15**(2): p. 108-15.
394. Powell-Tuck J, Jamieson CP, Bettany GE, Obeid O, Fawcett HV, Archer C, Murphy DL. A double blind, randomised, controlled trial of glutamine supplementation in parenteral nutrition. *Gut*, 1999. **45**(1): p. 82-8.
395. Wischmeyer PE, Lynch J, Liedel J, Wolfson R, Riehm J, Gottlieb L, Kahana M. Glutamine administration reduces Gram-negative bacteremia in severely burned patients: a prospective, randomized, double-blind trial versus isonitrogenous control. *Crit Care Med.*, 2001. **29**(11): p. 2075-80.
396. Ye-Ping, Z., et al. The effects of supplemental glutamine dipeptide on gut integrity and clinical outcomes after major escharectomy in severe burns: a randomized, double blind, controlled clinical trial. *Clinical Nutrition Supplements*, 2004(1).
397. Xian-Li, H., et al. Effect of total parenteral nutrition (TPN) with and without glutamine dipeptide supplementation on outcome in severe acute pancreatitis (SAP). *Clinical Nutrition Supplements*, 2004(1): p. 43.
398. Sahin, H., Mercanligil, S. M. Inanc, N. Ok, E. Effects of glutamine-enriched total parenteral nutrition on acute pancreatitis. *Eur J Clin Nutr*, 2007. **61**(12): p. 1429-34.
399. Duska, F., al. Frequent intravenous pulses of growth hormone together with glutamine supplementation in prolonged critical illness after multiple trauma : Effects on nitrogen balance, insulin resistance, and substrate oxidation. *Crit Care Med*, 2008. **36**(6): p. 1707-1713.
400. Estivariz CF, Griffith DP, Luo M et al. Efficacy of parenteral nutrition supplemented with glutamine dipeptide to decrease hospital infections in critically ill surgical patients. *JPEN J Parenter Enteral Nutr*, 2008. **32**(4): p. 389-402.
401. Grau T, C., Bonet A, Miñambres E, Piñeiro L, Irlas JA, Robles A, Acosta J, Herrero I, Palacios V, Lopez J, Blesa A, Martínez P; Metabolism, Nutrition Working Group, SEMICYUC, Spain. The effect of L-alanyl-L-glutamine dipeptide supplemented total parenteral nutrition on infectious morbidity and insulin sensitivity in critically ill patients. *Crit Care Med*, 2011. **39**(6): p. 1263-8.
402. Andrews PJ, Avenell A, Noble DW, Campbell MK, Croal BL, Simpson WG, Vale LD, Battison CG, Jenkinson DJ, Cook JA; Scottish Intensive care Glutamine or seleNium Evaluative Trial Trials Group. Randomised trial of glutamine, selenium, or both, to supplement parenteral nutrition for critically ill patients. . *BMJ* 2011. **17**(342:): p. 1542.
403. Goeters C, Wenn A, Mertes N, Wempe C, Van Aken H, Stehle P, Bone HG. Parenteral L-alanyl-L-glutamine improves 6-month outcome in critically ill patients. . *Crit Care Med.*, 2002. **30**(9): p. 2032-7.

404. Heyland DK, Dhaliwal R, Drover JW, Gramlich L, Dodek P; Canadian Critical Care Clinical Practice Guidelines Committee. Canadian clinical practice guidelines for nutrition support in mechanically ventilated, critically ill adult patients. *JPEN J Parenter Enteral Nutr*, 2003. **27**(5): p. 355-73
405. Avenell, A., *Glutamine in critical care: current evidence from systematic reviews.* . *Proc Nutr Soc.*, 2006 **65**(3): p. 236-41.
406. Heyland DK, Novak F, Drover JW, Jain M, Su X, Suchner U. Should immunonutrition become routine in critically ill patients? A systematic review of the evidence. *JAMA*, 2001. **286**(8): p. 944-53.
407. McClave SA, Martindale RG, Vanek VW, McCarthy M, Roberts P, Taylor B, Ochoa JB, Napolitano L, Cresci G; A.S.P.E.N. Board of Directors; American College of Critical Care Medicine; Society of Critical Care Medicine. Guidelines for the Provision and Assessment of Nutrition Support Therapy in the Adult Critically Ill Patient: Society of Critical Care Medicine (SCCM) and American Society for Parenteral and Enteral Nutrition (A.S.P.E.N.). *JPEN J Parenter Enteral Nutr*, 2009. **33**(3): p. 277-316.
408. Singer P, Berger MM, Van den Berghe G, Biolo G, Calder P, Forbes A, Griffiths R, Kreyman G, Leverve X, Pichard C. ESPEN Guidelines on Parenteral Nutrition: intensive care *Clin Nutr.* , 2009. **28**(4): p. 387-400.
409. Vincent JL, Rello J, Marshall J, Silva E, Anzueto A, Martin CD, Moreno R, Lipman J, Gomersall C, Sakr Y, Reinhart K; EPIC II Group of Investigators. International study of the prevalence and outcomes of infection in intensive care units. *JAMA*, 2009. **302**(21): p. 2323-9.
410. Vincent JL, Bihari DJ, Suter PM, Bruining HA, White J, Nicolas-Chanoin MH, Wolff M, Spencer RC, Hemmer M. The prevalence of nosocomial infection in intensive care units in Europe. Results of the European Prevalence of Infection in Intensive Care (EPIC) Study. EPIC International Advisory Committee. *JAMA*, 1995 **274**(8): p. 639-44.
411. Bone, R., Sir Isaac Newton, sepsis, SIRS, and CARs. *Crit Care Med.*, 1996. **24**(7): p. 1125-8.
412. Munford RS, Pugin J Normal responses to injury prevent systemic inflammation and can be immunosuppressive. *Am J Respir Crit Care Med.*, 2001. **163**(2): p. 316-21.
413. Ward NS, Casserly B, Ayala A. The compensatory anti-inflammatory response syndrome (CARs) in critically ill patients. *Clin Chest Med*, 2008 **29**(4): p. 617-25.
414. Melsen WG, Rovers MM, Koeman M, Bonten MJ. Estimating the attributable mortality of ventilator-associated pneumonia from randomized prevention studies. *Crit Care Med*, 2011. **39**(12): p. 2736-42.
415. Melsen WG, Rovers MM, Bonten MJ. Ventilator-associated pneumonia and mortality: a systematic review of observational studies *Crit Care Med*, 2009. **37**(10): p. 2709-18.
416. Cuthbertson, D., Observations on the disturbance of metabolism produced by injury to limbs. *Q J Med*, 1932. **1**: p. 232-49
417. Cuthbertson, D., Post shock metabolic response (Arris-Gale Lecture to the Royal College of Surgeons of England). *Lancet* 1942: p. i:433-7.
418. Cuthbertson, D., The distribution of nitrogen and sulphur in the urine during conditions of increased catabolism. *Biochem J.*, 1931. **25**(1): p. 236-44.
419. Klaude M, Mori M, Tjäder I, Gustafsson T, Wernerman J, Rooyackers O. Protein metabolism and gene expression in skeletal muscle of critically ill patients with sepsis. *Clin Sci (Lond)*, 2012 **122**(3): p. 133-42.
420. Griffiths, R.D., Allen, K. D. Andrews, F. J. Jones, C. Infection, multiple organ failure, and survival in the intensive care unit: influence of glutamine-supplemented parenteral nutrition on acquired infection. *Nutrition*, 2002. **18**(7-8): p. 546-52.

421. Roth E, Zoch G, Schulz F, et al. Amino acid concentrations in plasma and skeletal muscle of patients with acute hemorrhagic necrotizing pancreatitis. *Clin Chem*, 1985(31): p. 1305-1309.
422. Calder PC, Kew S. The immune system: a target for functional foods? *Br J Nutr.*, 2002. **88**(Suppl 2): p. S165-77.
423. Singleton KD, Wischmeyer PE. Glutamine protection against sepsis and lung injury is dependent on heat shock protein 70 expression. *Am J Physiol* 2007(292): p. 1839-45.
424. Wischmeyer, P.E., Kahana, M. Wolfson, R. Ren, H. Musch, M. M. Chang, E. B. Glutamine reduces cytokine release, organ damage, and mortality in a rat model of endotoxemia. *Shock*, 2001. **16**(5): p. 398-402.
425. Morrison AL, Dinges M, Singleton KD, Odims K, Wong HR, Wischmeyer PE. Glutamine's protection against cellular injury is dependent on heat shock factor-1. *Am J Physiol Cell Physiol.*, 2006(290): p. C1625-32
426. Peng, Z.Y., Serkova, N. J. Kominsky, D. J. Brown, J. L. Wischmeyer, P. E. Glutamine-mediated attenuation of cellular metabolic dysfunction and cell death after injury is dependent on heat shock factor-1 expression. *JPEN J Parenter Enteral Nutr*, 2006. **30**(5): p. 373-8; discussion 379.
427. Zheng YM, Li F, Zhang MM, Wu XT. Glutamine dipeptide for parenteral nutrition in abdominal surgery: a meta-analysis of randomized controlled trials. *World J Gastroenterol.*, 2006. **12**(46): p. 7537-41.
428. Biolo G, Grimble G, Preiser JC, Leverve X, Jolliet P, Planas M, Roth E, Wernerman J, Pichard C; European Society of Intensive Care Medicine Working Group on Nutrition and Metabolism. Position paper of the ESICM Working Group on Nutrition and Metabolism. Metabolic basis of nutrition in intensive care unit patients: ten critical questions. *Intensive Care Med.*, 2002. **28**(11): p. 1512-20.
429. Preiser JC, Chioléro R, Wernerman J; ESICM(European Society of Intensive Care Medicine) Working Group on Nutrition and Metabolism. Nutritional papers in ICU patients: what lies between the lines? *Intensive Care Med*, 2003. **29**(2): p. 156-66.
430. Singer P, Berger MM, Van den Berghe G, Biolo G, Calder P, Forbes A, Griffiths R, Kreyman G, Leverve X, Pichard C. ESPEN Guidelines on Parenteral Nutrition: intensive care. *Clin Nutr.*, 2009. **28**(4): p. 387-400.
431. TC, H., Surveillance of nosocomial infections. In: *Hospital Epidemiology and Infection Control*. 3rd ed. Mayhall CG (ed). Philadelphia, Lippincott Williams and Wilkins. 2004: p. 1659-1702.
432. Knaus, W., EA Draper, DP Wagner, JE Zimmerman APACHE II: a severity of disease classification system. *Crit Care Med*, 1985. **13** p. 818-829.
433. Le Gall JR, Lemeshow S, Saulnier F. A new Simplified Acute Physiology Score (SAPS II) based on a European/North American multicenter study. *JAMA.*, 1993. **270**(24): p. 2957-63.
434. JL Vincent, R Moreno, J Takala The SOFA (Sepsis-related Organ Failure Assessment) score to describe organ dysfunction/failure On behalf of the Working Group on Sepsis-Related Problems of the European Society of Intensive Care Medicine. *Intensive Care Med*, 1996. **22**: p. 707-10.
435. Ravasco P, Camilo ME, Gouveia-Oliveira A, Adam S, Brum G A critical approach to nutritional assessment in critically ill patients. *Clin Nutr.*, 2002. **21**(1): p. 73-7.
436. Frisnacho, A., New norms of upper limb fat and muscle areas for assessment of nutritional status. *Am J Clin Nutr.*, 1981. **34**(11): p. 2540-5.
437. Falciiglia G, O'Connor J, Gedling E. Upper arm anthropometric norms in elderly white subjects. *J Am Diet Assoc.*, 1988. **88**(5): p. 569-74.
438. Rangel-Frausto MS, Pittet D, Costigan M, Hwang T, Davis CS, Wenzel RP: The natural history of the systemic inflammatory response syndrome (SIRS). A prospective study. *JAMA* 1995(273): p. 117-123.

439. Circiumaru B, Baldock G, Cohen J: A prospective study of fever in the intensive care unit. *Intensive Care Med*, 1999(25): p. 668-673.
440. Vigushin DM, Pepys MB, Hawkins PN: Metabolic and scintigraphic studies of radioiodinated human C-reactive protein in health and disease. *J Clin Invest*, 1993(91): p. 1351-1357.
441. Mold C, Gewurz H, Du Clos TW: Regulation of complement activation by C-reactive protein. *Immunopharmacology*, 1999(42): p. 23-30.
442. Garrow, J., Obesity. In Garrow JS, James WPT, Ralph A, editors. *Human Nutrition and Dietetics*. 10 ed. Edinburgh. Churchill-Livingstone. 2000: p. 527-545.
443. Waitzberg, D., Cálculo do Índice de Massa Corpórea. In Waitzberg DL, Dias MCG, editores. *Guia Básico de Terapia Nutricional - Manual de Boas Práticas*. 2ª ed S.Paulo. Atheneu. 2007: p. 47-48.
444. McWhirter JP, Pennington CR. Incidence and recognition of malnutrition in hospital. *BMJ.*, 1994. **308**(6934): p. 945-8.
445. Beale RJ, Sherry T, Lei K, Campbell-Stephen L, McCook J, Smith J, Venetz W, Altelheld B, Stehle P, Schneider H. Early enteral supplementation with key pharmac nutrients improves Sequential Organ Failure Assessment score in critically ill patients with sepsis: outcome of a randomized, controlled, double-blind trial. *Crit Care Med*, 2008. **36**: p. 131-44.
446. Conejero, R., Bonet, A. Grau, T. Esteban, A. Mesejo, A. Montejo, J. C. Lopez, J. Acosta, J. A. Effect of a glutamine-enriched enteral diet on intestinal permeability and infectious morbidity at 28 days in critically ill patients with systemic inflammatory response syndrome: a randomized, single-blind, prospective, multicenter study. *Nutrition*, 2002. **18**(9): p. 716-21.
447. Jones SW, Hill RJ, Krasney PA, O'Conner B, Peirce N, Greenhaff PL. Disuse atrophy and exercise rehabilitation in humans profoundly affects the expression of genes associated with the regulation of skeletal muscle mass. *Faseb J*, 2004. **18**: p. 1025-7.
448. Moreno R, Vincent JL, Matos R, Mendonça A, Cantraine F, Thijs L, Takala J, Sprung C, Antonelli M, Bruining H, Willatts S. . The use of maximum SOFA score to quantify organ dysfunction/failure in intensive care. Results of a prospective, multicentre study. Working Group on Sepsis related Problems of the ESICM. *Intensive Care Med*, 1999. **25**: p. 686-96.
449. Szondy, Z. and E.A. Newsholme, The effect of time of addition of glutamine or nucleosides on proliferation of rat cervical lymph-node T-lymphocytes after stimulation by concanavalin A. *Biochem J*, 1991. **278 (Pt 2)**: p. 471-4.
450. Boza, J.J., Maire, J. Bovetto, L. Balleve, O. Plasma glutamine response to enteral administration of glutamine in human volunteers (free glutamine versus protein-bound glutamine). *Nutrition*, 2000. **16**(11-12): p. 1037-42.
451. Obrador, E., Carretero, J. Esteve, J. M. Pellicer, J. A. Pascual, A. Petschen, I. Estrela, J. M. Glutamine potentiates TNF-alpha-induced tumor cytotoxicity. *Free Radic Biol Med*, 2001. **31**(5): p. 642-50.
452. Yamauchi, K., Komatsu, T. Kulkarni, A. D. Ohmori, Y. Minami, H. Ushiyama, Y. Nakayama, M. Yamamoto, S. Glutamine and arginine affect Caco-2 cell proliferation by promotion of nucleotide synthesis. *Nutrition*, 2002. **18**(4): p. 329-33.
453. Levy EM, Alharbi SA, Grindlinger G & Black PH Changes in mitogen responsiveness lymphocyte subsets after traumatic injury: relation to development of sepsis. *Clinical Immunology and Immunopathology* 1984. **32**: p. 224-233.
454. Lin RY, Astir ME, Saxon JC & Rack EC. Altered leucocyte immunophenotypes in septic shock. Studies of HLA-DR, CD11b, CD14 and IL-2R expression. *Chest*, 1993. **104**: p. 847-53.
455. Tomkinson BE, Wagner DK, Nelson DL, Sullivan JL. Activated lymphocytes during acute Epstein-Barr virus infection. *J Immunol.*, 1987. **139**(11): p. 3802-7.

456. Edwards JA, Durant BM, Jones DB, Evans PR, Smith JL. Differential expression of HLA class II antigens in fetal human spleen: relationship of HLA-DP, DQ, and DR to immunoglobulin expression. *J Immunol.*, 1986. **137**(2): p. 490-7.
457. Cheadle, W., *The human leukocyte antigens and their relationship to infection.* . *Am J Surg.*, 1993. **165**((2A Suppl)): p. 75S-81S.
458. Levacher M, Tallet S, Dazza MC, Dournon E, Rouveix B, Pocardalo JJ. T activation marker evaluation in ARC patients treated with AZT. Comparison with CD4+ lymphocyte count in non-progressors and progressors towards AIDS. *Clin Exp Immunol.*, 1990. **81**(2): p. 177-82.
459. Doherty D, Norris S, Madrigal-Estebas L, McEntee G, Traynor O, Hegarty J and O'Farrelly C: The human liver contains multiple populations of NK cells, T cells and CD3+56+ natural T cells with distinct cytotoxic activities and Th1, Th2 and Th0 cytokine secretion patterns. *J Immunol*, 1999. **163**: p. 2314-2321.
460. Flieger D, Kufer P, Beier I, Sauerbruch T and Schmidt-Wolf IG: A bispecific single-chain antibody directed against EpCAM/ CD3 in combination with the cytokines interferon alpha and interleukin-2 efficiently retargets T and CD3+CD56+ naturalkiller- like T lymphocytes to EpCAM-expressing tumor cells. *Cancer Immunol Immunother* 2000. **49**: p. 441-448.
461. Walzer T, Dalod M, Robbins SH, Zitvogel L, Vivier E. Natural-killer cells and dendritic cells: "l'union fait la force". *Blood.*, 2005 **106**(7): p. 2252-8.
462. Perussia, B., *Fc receptors on natural killer cells.* *Curr Top Microbiol Immunol.*, 1998. **230**: p. 63-88.
463. Moretta A, Bottino C, Vitale M, Pende D, Cantoni C, Mingari MC, Biassoni R, Moretta L. Activating receptors and coreceptors involved in human natural killer cell-mediated cytotoxicity. . *Annu Rev Immunol.*, 2001. **19**: p. 197-223.
464. Bryceson YT, March ME, Ljunggren HG, Long EO. Activation, coactivation, and costimulation of resting human natural killer cells. *Immunol Rev*, 2006 **214**: p. 73-91.
465. Bryceson YT, March ME, Ljunggren HG, Long EO. Synergy among receptors on resting NK cells for the activation of natural cytotoxicity and cytokine secretion. *Blood*, 2006. **107**(1): p. 159-66.
466. Groom JR, Luster AD. CXCR3 ligands: redundant, collaborative and antagonistic functions. . *Immunol Cell Biol*, 2011. **89**(2): p. 207-15.
467. Groom JR, Luster AD. CXCR3 in T cell function. *Exp Cell Res*, 2011. **317**(5): p. 620-31.
468. Phillips RJ, Lutz M, Premack B. Differential signaling mechanisms regulate expression of CC chemokine receptor-2 during monocyte maturation. *J Inflamm (Lond)*, 2005. **2**: p. 14.
469. Tuttle DL, Harrison JK, Anders C, Sleasman JW, Goodenow MM. Expression of CCR5 increases during monocyte differentiation and directly mediates macrophage susceptibility to infection by human immunodeficiency virus type 1. *J Virol.*, 1998. **72**: p. 4962-4969.
470. Fadel, S.A., S.K. Bromley, B.D. Medoff, and A.D. Luster. CXCR3-deficiency protects influenza-infected CCR5-deficient mice from mortality. *Eur. J. Immunol*, 2008. **38**: p. 3376-3387
471. Kohlmeier, J.E., and D.L. Woodland. Immunity to respiratory viruses. *Annu. Rev. Immunol*, 2009. **27**: p. 61-82.
472. Lindell, D.M., T.E. Lane, and N.W. Lukacs. CXCL10/CXCR3-mediated responses promote immunity to respiratory syncytial virus infection by augmenting dendritic cell and CD8(+) T cell efficacy. *Eur. J.Immunol*, 2008. **38**: p. 2168-2179.
473. Moreno, R., Morais P. Outcome prediction in Intensive Care: results of a prospective, multicenter portuguese study. *Intensive Care Medicine*, 1997. **23**(2): p. 177-86.

474. RJ, S., *Prevalence of disease related malnutrition in Stratton RJ, Green CJ, Elia M, editors. Disease-related Malnutrition an evidence based approach to treatment. 1^o ed. CABI Publishing. 2003: p. 35-80.*
475. Huang, Y., *Nutritional status of mechanically ventilated critically ill patients: comparison of different types of nutritional support. Clinical Nutrition 2000. 19: p. 101-107.*
476. Giner, M., Laviano A, Meguid MM. *In 1995 a correlation between malnutrition and poor outcome in critically patients still exists. Nutrition, 1996. 12: p. 23-29.*
477. Calder PC, Jackson AA. *Undernutrition, infection and immune function. Nutr Res Rev., 2000. 13(1): p. 3-29.*
478. Souba, W., *Nutritional support. N Engl J Med, 1997 336(1): p. 41-8.*
479. Byrne, T.A., Persinger, R. L. Young, L. S. Ziegler, T. R. Wilmore, D. W. *A new treatment for patients with short-bowel syndrome. Growth hormone, glutamine, and a modified diet. Ann Surg, 1995. 222(3): p. 243-54; discussion 254-5.*
480. Jian, 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 safety, nitrogen balance, intestinal permeability, and clinical outcome in postoperative patients: a randomized, double-blind, controlled study of 120 patients. JPEN J Parenter Enteral Nutr, 1999. 23(5 Suppl): p. 562-6.*
481. Biolo, G., Zorat, F. Antonione, R. Ciocchi, B. *Muscle glutamine depletion in the intensive care unit. Int J Biochem Cell Biol, 2005. 37(10): p. 2169-79.*
482. Newsholme, P., Curi, R. Pithon Curi, T. C. Murphy, C. J. Garcia, C. Pires de Melo, M. *Glutamine metabolism by lymphocytes, macrophages, and neutrophils: its importance in health and disease. J Nutr Biochem, 1999. 10(6): p. 316-24.*
483. Wilmore, D.W., *Why should a single nutrient reduce mortality? Critical Care Medicine, 2002. 30(9): p. 2153-2154.*
484. Kieninger AN, Lipsett PA. *Hospital-acquired pneumonia: pathophysiology, diagnosis, and treatment. Surg Clin North Am., 2009. 89(2): p. 439-61.*
485. Niederman, M., *Gram-negative colonization of the respiratory tract: pathogenesis and clinical consequences. Semin Respir Infect., 1990. 5(3): p. 173-84.*
486. Schünemann HJ, J., Jaeschke R, Cook DJ, Bria WF, El-Solh AA, Ernst A, Fahy BF, Gould MK, Horan KL, Krishnan JA, Manthous CA, Maurer JR, McNicholas WT, Oxman AD, Rubinfeld G, Turino GM, Guyatt G; *ATS Documents Development and Implementation Committee. An official ATS statement: grading the quality of evidence and strength of recommendations in ATS guidelines and recommendations. Am J Respir Crit Care Med, 2006. 174(5): p. 605-14.*
487. Esteban A, Frutos-Vivar F, Ferguson ND, Peñuelas O, Lorente JA, Gordo F, Honrubia T, Algora A, Bustos A, García G, Diaz-Regañón IR, de Luna RR. *Sepsis incidence and outcome: contrasting the intensive care unit with the hospital ward. Crit Care Med, 2007. 35(5): p. 1284-9.*
488. Vincent JL, Sakr Y, Sprung CL, Ranieri VM, Reinhart K, Gerlach H, Moreno R, Carlet J, Le Gall JR, Payen D; *Sepsis Occurrence in Acutely Ill Patients Investigators. Sepsis in European intensive care units: results of the SOAP study. Crit Care Med, 2006. 34(2): p. 344-53.*
489. Sundararajan V, Macisaac CM, Presneill JJ, Cade JF, Visvanathan K. *Epidemiology of sepsis in Victoria, Australia. Crit Care Med, 2005. 33(1): p. 71-80.*
490. van Gestel A, Bakker J, Veraart CP, van Hout BA. *Prevalence and incidence of severe sepsis in Dutch intensive care units. Crit Care 2004. 8(4): p. R153-62.*

491. Martin CM, Priestap F, Fisher H, Fowler RA, Heyland DK, Keenan SP, Longo CJ, Morrison T, Bentley D, Antman N; STAR Registry Investigators. A prospective, observational registry of patients with severe sepsis: the Canadian Sepsis Treatment and Response Registry. *Crit Care Med*, 2009. **37**(1): p. 81-8.
492. Brun-Buisson C, Meshaka P, Pinton P, Vallet B; EPISEPSIS Study Group. EPISEPSIS: a reappraisal of the epidemiology and outcome of severe sepsis in French intensive care units. *Intensive Care Med*, 2004. **30**(4): p. 580-8.
493. Chastre J, Fagon JY. Ventilator-associated pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med*, 2002. **165**(7): p. 867-903.
494. Alp E, Voss A. Ventilator associated pneumonia and infection control. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 2006. **5**: p. 7.
495. Aly NY, Al Asar el SM. Nosocomial infections in a medical-surgical intensive care unit. . *Med Princ Pract*, 2008. **17**: p. 373-7
496. Joseph NM, Sistla S, Dutta TK, Badhe AS, Parija SC. Ventilator-associated pneumonia in a tertiary care hospital in India: incidence and risk factors. *J Infect Dev Ctries*, 2009. **3**: p. 771-7
497. National, N.I.S., *Am J Infect Control*, 2004. **32**: p. 470-85.
498. Friedman G, Silva E, Vincent JL. Has the mortality of septic shock changed with time. *Crit Care Med*, 1998. **26**(12): p. 2078-86.
499. Magret M, Lisboa T, Martin-Loeches I, Máñez R, Nauwynck M, Wrigge H, Cardellino S, Díaz E, Koulenti D, Rello J; EU-VAP/CAP Study Group. Bacteremia is an independent risk factor for mortality in nosocomial pneumonia: a prospective and observational multicenter study. *Crit Care*, 2011. **15**(1): p. R62.
500. Koulenti D, Lisboa T, Brun-Buisson C, Krueger W, Macor A, Sole-Violan J, Diaz E, Topeli A, DeWaele J, Carneiro A, Martin-Loeches I, Armaganidis A, Rello J; EU-VAP/CAP Study Group. Spectrum of practice in the diagnosis of nosocomial pneumonia in patients requiring mechanical ventilation in European intensive care units. *Crit Care Med*, 2009. **37**(8): p. 2360-8.
501. Avenell, A., *Glutamine in critical care: current evidence from systematic reviews. Proc Nutr Soc*, 2006. **65**(3): p. 236-41.
502. Mellors JW, Kelly JJ, Gusberg RJ, Horwitz SM, Horwitz RI: A simple index to estimate the likelihood of bacterial infection in patients developing fever after abdominal surgery. *Am Surg*, 1988. **54**: p. 558-564
503. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine Consensus Conference: definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. *Crit Care Med*, 1992. **20**: p. 864-874.
504. Póvoa P, Coelho L, Almeida E, Fernandes A, Mealha R, Moreira P, Sabino H Early identification of intensive care unit-acquired infections with daily monitoring of C-reactive protein: a prospective observational study. *Crit Care Clin*, 2006. **10**(2): p. R63.
505. Vermeulen, H., Storm-Versloot MN, Goossens A, Speelman P, Legemate DA: Diagnostic accuracy of routine postoperative body temperature measurements. . *Clin Infect Dis*, 2005. **40**: p. 1404-1410.
506. Circiumaru B, Baldock G, Cohen J: A prospective study of fever in the intensive care unit. *Intensive Care Med*, 1999. **25**: p. 668-673.
507. Vincent, J., Dear SIRS, I'm sorry to say that I don't like you... *Crit Care Med*, 1997. **25**(2): p. 372-4.
508. Jaimes F, Garcés J, Cuervo J, Ramírez F, Ramírez J, Vargas A, Quintero C, Ochoa J, Tandioy F, Zapata L, Estrada J, Yepes M, Leal H. The systemic inflammatory response syndrome (SIRS) to identify infected patients in the emergency room. *Intensive Care Med*, 2003. **29**(8): p. 1368-71.

509. Povaia P, Coelho L, Almeida E, Fernandes A, Mealha R, Moreira P, Sabino H: C-reactive protein as a marker of ventilator-associated pneumonia resolution - a pilot stud. *Eur Respir J* 2005. **25**: p. 804-812.
510. Yentis SM, Soni N, Sheldon J: C-reactive protein as an indicator of resolution of sepsis in the intensive care unit. *Intensive Care Med* 1995. **21**: p. 602-605.
511. Cetinbas F, Yelken B, Gulbas Z. Role of glutamine administration on cellular immunity after total parenteral nutrition enriched with glutamine in patients with systemic inflammatory response syndrome. *J Crit Care*, 2010. **25**: p. 4.
512. Hotchkiss RS, Karl IE. The pathophysiology and treatment of sepsis. *N Engl J Med*, 2003. **348**: p. 138-150.
513. Annane D, Bellissant E, Cavallion JM. Septic shock. *Lancet*, 2005. **365**: p. 63-78.
514. Munford RS, Pugin J. Normal responses to injury prevent systemic inflammation and can be immunosuppressive. *Am J Respir Crit Care Med*, 2001. **163**: p. 316-321.
515. Monneret G, Lepape A, Voirin N, Bohe J, Venet F, Debard AL, Thizy H, Bienvenu J, Gueyffier F, Vanhems P. Persisting low monocyte human leukocyte antigen-DR expression predicts mortality in septic shock. *Intensive Care Med*, 2006. **32**: p. 1175-83.
516. Pachot A, Lepape A, Vey S, Bienvenu J, Mouglin B, Monneret G. Systemic transcriptional analysis in survivor and nonsurvivor septic shock patients: a preliminary study. *Immunol Lett*, 2006. **106**: p. 63-71.
517. Wesche DE, Lomas-Neira JL, Perl M, Chung CS, Ayala A. Leukocyte apoptosis and its significance in sepsis and shock. *J Leukoc Biol*, 2005. **78**: p. 325-37.
518. Monneret G, Debard AL, Venet F, Bohe J, Hequet O, Bienvenu J, Lepape A. Marked elevation of human circulating CD4+CD25+ regulatory T cells in sepsis-induced immunoparalysis. *Crit Care Med*, 2003. **31**: p. 2068-71.
519. Pugin J. Immunostimulation is a rational therapeutic strategy in sepsis. *Novartis Found Symp*, 2007. **280**: p. 21-7.
520. Ditschkowski M, Kreuzfelder E, Rebmann V, Ferencik S, Majetschak M, Schmid EN, Obertacke U, Hirche H, Schade UF, Grosse-Wilde H. HLA-DR expression and soluble HLA-DR levels in septic patients after trauma. *Ann Surg* 1999. **229**(2): p. 246-54.
521. Giannoudis PV, Smith RM, Windsor AC, Bellamy MC & Gillou PJ. Monocyte Human Leucocyte antigen-DR expression correlates with intrapulmonary shunting after major trauma. *American Journal of Surgery*, 1999. **177**: p. 455-459.
522. Lederer JA, Rodrick ML, Mannick JA. The effects of injury on the adaptive immune response. *Shock*, 1999. **11**: p. 153-9
523. Manjuck J, e.a., Decreased response to recall antigens is associated with depressed costimulatory receptor expression in septic critically ill patients. *J Lab Clin Med*, 2000. **135**: p. 153-60.
524. Roth G, Moser B, Krenn C, Brunner M, Haisjackl M, Almer G, Gerlitz S, Wolner E, Boltz-Nitulescu G, Ankersmit HJ. Susceptibility to programmed cell death in T-lymphocytes from septic patients: a mechanism for lymphopenia and Th2 predominance. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003. **308**: p. 840-6
525. O'Mahony JB, Palder SB, Wood JJ, McIrvine A, Rodrick ML, Demling RH, Mannick JA. Depression of cellular immunity after multiple trauma in the absence of sepsis. *J Trauma*, 1984. **24**: p. 869-75
526. Faist E, Kupper TS, Baker CC, Chaudry IH, Dwyer J, Baue AE. Depression of cellular immunity after major injury: its association with posttraumatic complications and its reversal with immunomodulation. *Arch Surg*, 1986. **121**(1000-5).

527. Hensler T, Hecker H, Heeg K, Heidecke CD, Bartels H, Barthlen W, Wagner H, Siewert JR, Holzmann B. Distinct mechanisms of immunosuppression as a consequence of major surgery. *Infect Immun*, 1997. **65**: p. 2283-91
528. Puyana JC, Pellegrini JD, De AK, Kodys K, Silva WE, Miller CL. Both T-helper-1- and T-helper-2-type lymphokines are depressed in posttrauma anergy. *J Trauma*, 1998. **44**: p. 1037-45.
529. Puyana JC, Pellegrini JD, De AK, Kodys K, Silva WE, Miller CL. Both T-helper-1- and T-helper-2-type lymphokines are depressed in posttrauma anergy. *J Trauma*, 1998. **44**: p. 1037-45
530. De AK, Kodys KM, Pellegrini J, Yeh B, Furse RK, Bankey P, Miller-Graziano CL. Induction of global anergy rather than inhibitory Th2 lymphokines mediates posttrauma T cell immunodepression. *Clin Immunol*, 2000. **96**: p. 52-66.
531. Laudanski K, e.a., Cell-specific expression and pathway analyses reveal alterations in trauma-related human T cell and monocyte pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006. **103**: p. 15564-9.
532. Bandyopadhyay G, De A, Laudanski K, Li F, Lentz C, Bankey P, Miller-Graziano C. Negative signaling contributes to T-cell anergy in trauma patients. *Crit Care Med*, 2007. **35**(3): p. 794-801.
533. Heidecke CD, Hensler T, Weighardt H, Zantl N, Wagner H, Siewert JR, Holzmann B. Selective defects of T lymphocyte function in patients with lethal intraabdominal infection. *Am J Surg* 1999. **178**: p. 288-92.
534. Lederer JA, Rodrick ML, Mannick JA. The effects of injury on the adaptive immune response. *Shock*, 1999. **11**: p. 153-9.
535. Rode HN, Christou NV, Bubenik O, Superina R, Gordon J, Meakins JL, MacLean LD. Lymphocyte function in anergic patients. *Clin Exp Immunol*, 1982. **47**: p. 155-61.
536. Sherry RM, Cue JI, Goddard JK, Parramore JB & DiPiro JT. Interleukin-10 is associated with the development of sepsis in trauma patients. *Journal of Trauma*, 1996. **40**: p. 613-16.
537. Shewchuk LD, Baracos VE, Field CJ. Dietary L-glutamine supplementation reduces the growth of the Morris Hepatoma 7777 in exercise-trained and sedentary rats. *J Nutr* 1997. **127**(1).
538. Kew, S., Wells, S. M. Yaqoob, P. Wallace, F. A. Miles, E. A. Calder, P. C. Dietary glutamine enhances murine T-lymphocyte responsiveness. *J Nutr*, 1999. **129**(8): p. 1524-31.
539. Calder, P., Fuel utilization by cells of the immune system. *Proc Nutr Soc.*, 1995. **54**(1): p. 65-82.
540. Chang WK, Yang KD, Chuang H, Jan JT, Shaio MF. Glutamine protects activated human T cells from apoptosis by up-regulating glutathione and Bcl-2 levels. *Clin Immunol*, 2002. **104**(2): p. 151-60.
541. Griffiths, R.D., The evidence for glutamine use in the critically-ill. *Proc Nutr Soc*, 2001. **60**(3): p. 403-10.
542. Ho CS, Lopez JA, Vuckovic S, Pyke CM, Hockey RL, Hart DN. Surgical and physical stress increases circulating blood dendritic cell counts independently of monocyte counts. *Blood*, 2001. **98**: p. 140-5.
543. Faivre V, Lukaszewicz AC, Alves A, Charron D, Payen D, Haziot A. Accelerated in vitro differentiation of blood monocytes into dendritic cells in human sepsis. *Clin Exp Immunol*, 2007. **147**: p. 426-39
544. De AK, Laudanski K, Miller-Graziano CL. Failure of monocytes of trauma patients to convert to immature dendritic cells is related to preferential macrophage-colony-stimulating factor-driven macrophage differentiation. *J Immunol*, 2003. **170**: p. 6355-62.
545. Guisset O, Dilhuydy MS, Thiébaud R, Lefèvre J, Camou F, Sarrat A, Gabinski C, Moreau JF, Blanco P. Decrease in circulating dendritic cells predicts fatal outcome in septic shock. *Intensive Care Med*, 2007. **33**(1): p. 148-52.

546. Hotchkiss RS, Tinsley KW, Swanson PE, Grayson MH, Osborne DF, Wagner TH, Cobb JP, Coopersmith C, Karl IE Depletion of dendritic cells, but not macrophages, in patients with sepsis. *J Immunol*, 2002. **168**(5): p. 2493-500.
547. Efron PA, Martins A, Minnich D, Tinsley K, Ungaro R, Bahjat FR, Hotchkiss R, Clare-Salzler M, Moldawer LL. Characterization of the systemic loss of dendritic cells in murine lymph nodes during polymicrobial sepsis. *J Immunol*, 2004. **173**(5): p. 3035-43.
548. Bandyopadhyay G, De A, Laudanski K, Li F, Lentz C, Bankey P, Miller-Graziano C. Negative signaling contributes to T-cell anergy in trauma patients. *Crit Care Med*, 2007. **35**: p. 794-801.
549. Venet F, Bohe J, Debard AL, Bienvenu J, Lepape A, Monneret G. Both percentage of gammadelta T lymphocytes and CD3 expression are reduced during septic shock. *Crit Care Med*, 2005. **33**: p. 2836-40.
550. Bosshart H, Heinzlmann M. Spontaneous decrease of CD14 cell surface expression in human peripheral blood monocytes ex vivo. *J Immunol Methods*, 2011. **368**(1-2): p. 80-3.
551. Heinzlmann M, Mercer-Jones M, Cheadle WG, Polk HC Jr. CD14 expression in injured patients correlates with outcome. *Ann Surg*. , 1996. **224**(1): p. 91-6.
552. Kox WJ, Volk T, Kox SN & Volk HD Immunomodulatory therapies in sepsis. *Intensive Care Medicine*, 2000. **26**: p. S103-S110.
553. Pachot A, Monneret G, Brion A, Venet F, Bohe J, Bienvenu J, Mouglin B, Lepape A. Messenger RNA expression of major histocompatibility complex class II genes in whole blood from septic shock patients. *Crit Care Med*, 2005. **33**: p. 31-8.
554. Caille V, Chiche JD, Nciri N, Berton C, Gibot S, Boval B, Payen D, Mira JP, Mebazaa A. Histocompatibility leukocyte antigen-D related expression is specifically altered and predicts mortality in septic shock but not in other causes of shock. *Shock*, 2004. **22**(6): p. 521-6.
555. Wolk K, Döcke WD, von Baehr V, Volk HD, Sabat R. Impaired antigen presentation by human monocytes during endotoxin tolerance. *Blood*, 2000. **96**(1): p. 218-23.
556. Astiz M, e.a., Monocyte response to bacterial toxins, expression of cell surface receptors, and release of antiinflammatory cytokines during sepsis. *J Lab Clin Med*, 1996. **128**: p. 594-600.
557. Munoz C, Carlet J, Fitting C, Misset B, Bleriot JP, Cavaillon JM. Dysregulation of in vitro cytokine production by monocytes during sepsis. *J Clin Invest*, 1991. **88**: p. 1747-54.
558. van Deuren M, van der Ven-Jongekrijg J, Demacker PN, Bartelink AK, van Dalen R, Sauerwein RW, Gallati H, Vannice JL, van der Meer JW. Differential expression of proinflammatory cytokines and their inhibitors during the course of meningococcal infections. *J Infect Dis*, 1994. **169**: p. 157-61.
559. Rigato O, Salomao R. Impaired production of interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha but not of interleukin 10 in whole blood of patients with sepsis. *Shock*, 2003. **19**: p. 113-6.
560. Stanilova SA, Karakolev ZT, Dimov GS, Dobрева ZG, Miteva LD, Slavov ES, Stefanov CS, Stanilov NS. High interleukin 12 and low interleukin 10 production after in vitro stimulation detected in sepsis survivors. *Intensive Care Med*, 2005. **31**: p. 401-7.
561. Cavaillon JM, Adrie C, Fitting C, Adib-Conquy M. Endotoxin tolerance: is there a clinical relevance? *J Endotoxin Res*, 2003. **9**: p. 101-7.
562. Giannoudis PV, Smith RM, Perry SL, Windsor AJ, Dickson RA & Bellamy MB. Immediate IL-10 expression following major orthopaedic trauma: relationship to anti-inflammatory response and subsequent development of sepsis. *Intensive Care Medicine*, 2000. **26**: p. 1076-1081.
563. Hynninen M, e.a., Predictive value of monocyte histocompatibility leukocyte antigen-DR expression and plasma interleukin-4 and -10 levels in critically ill patients with sepsis. *Shock*, 2003. **20**: p. 1-4.

564. Monneret G, et al., The antiinflammatory response dominates after septic shock: association of low monocyte HLA-DR expression and high interleukin-10 concentration. *Immunol Lett*, 2004. **95**: p. 193-8.
565. Fumeaux T, Pugin J. Role of interleukin-10 in the intracellular sequestration of human leukocyte antigen-DR in monocytes during septic shock. *Am J Respir Crit Care Med*, 2002. **166**(11): p. 1475-82.
566. Pachot A, et al., Longitudinal study of cytokine and immune transcription factor mRNA expression in septic shock. *Clin Immunol*, 2005. **114**: p. 61-9
567. Abe R, Hirasawa H, Oda S, Sadahiro T, Nakamura M, Watanabe E, Nakada TA, Hatano M, Tokuhisa T. Up-regulation of interleukin-10 mRNA expression in peripheral leukocytes predicts poor outcome and diminished human leukocyte antigen-DR expression on monocytes in septic patients. *J Surg Res*, 2008. **147**(1): p. 1-8.
568. Leonidou L, Mouzaki A, Michalaki M, Delastic AL, Kyriazopoulou V, Bassaris HP, Gogos CA. Cytokine production and hospital mortality in patients with sepsis-induced stress hyperglycemia. *J Infect* 2007. **55**: p. 340-6.
569. Ochoa JB, Makarenkova V. T lymphocytes. *Crit Care Med*, 2005 **33**(12 Suppl): p. S510-3.
570. Lekkou A, et al., Cytokine production and monocyte HLA-DR expression as predictors of outcome for patients with community-acquired severe infections. *Clin Diagn Lab Immunol*, 2004. **11**: p. 161-7.
571. Spolarics Z, Siddigi M, Siegel JH, Garcia ZC, Stein DS, Denny T, Deitch EA. Depressed interleukin-12-producing activity by monocytes correlates with adverse clinical course and a shift toward Th2-type lymphocyte pattern in severely injured male trauma patients. *Crit Care Med*, 2003. **31**: p. 1722-9.
572. Wakefield CH, Carey PD, Foulds S, Monson JR, Guillou PJ. Polymorphonuclear leukocyte activation. An early marker of the postsurgical sepsis response. *Arch Surg*, 1993. **128**(4): p. 390-5.
573. Asadullah K, Woiciechowsky C, Döcke WD, Liebenthal C, Wauer H, Kox W, Volk HD, Vogel S, Von Baehr R. Immunodepression following neurosurgical procedures. *Crit Care Med*, 1995. **23**(12): p. 1976-83.
574. Zhang DP, Yan FL, Xu HQ, Zhu YX, Yin Y, Lu HQ. A decrease of human leucocyte antigen-DR expression on monocytes in peripheral blood predicts stroke-associated infection in critically-ill patients with acute stroke. *Eur J Neurol*, 2009. **16**(4): p. 498-505.
575. Hershman MJ, Cheadle WG, Wellhausen SR, Davidson PF, Polk HC Jr. Monocyte HLA-DR antigen expression characterizes clinical outcome in the trauma patient. *Br J Surg*, 1990. **77**(2): p. 204-7.
576. Walsh DS, Thavichaiarn P, Pattanapanyasat K, Siritongtaworn P, Kongcharoen P, Tongtawe P, Yongvanitchit K, Jiarakul N, Dheeradhada C, Pearce FJ, Wiesmann WP, Webster HK. Characterization of circulating monocytes expressing HLA-DR or CD71 and related soluble factors for 2 weeks after severe, non-thermal injury. *J Surg Res*, 2005. **129**(2): p. 221-30.
577. West SD, Mold C. Monocyte deactivation correlates with injury severity score, but not with heme oxygenase-1 levels in trauma patients. *J Surg Res*, 2012. **172**(1): p. 5-10.
578. Haveman JW, Muller Kobold AC, Tervaert JW, van den Berg AP, Tulleken JE, Kallenberg CG, The TH. The central role of monocytes in the pathogenesis of sepsis: consequences for immunomonitoring and treatment. *Neth J Med*, 1999. **55**(3): p. 132-41.
579. Tschakowsky K, et al., Coincidence of pro-and antiinflammatory responses in the early phase of severe sepsis: longitudinal study of mononuclear histocompatibility leukocyte antigen-DR expression, procalcitonin, C-reactive protein, and changes in T-cell subsets in septic and postoperative patients. *Crit Care Med*, 2002. **30**: p. 1015-23.
580. Sachse C, Prigge M, Cramer G, Pallua N, Henkel E. Association between reduced human leukocyte antigen (HLA)-DR expression on blood monocytes and increased plasma level of interleukin-10 in patients with severe burns. *Clin Chem Lab Med*, 1999. **37**: p. 193-8

581. Venet, F., Tissot S, Debard AL, Faudot C, Crampe C, Pachot A, Ayala A, Monneret G. Decreased monocyte human leukocyte antigen-DR expression after severe burn injury: Correlation with severity and secondary septic shock. *Crit Care Med*, 2007. **35**(8): p. 1910-7.
582. Haveman JW, van den Berg AP, van den Berk JM, Mesander G, Slooff MJ, de Leij LH, The TH. Low HLA-DR expression on peripheral blood monocytes predicts bacterial sepsis after liver transplantation: relation with prednisolone intake. *Transpl Infect Dis*, 1999. **1**: p. 146-52.
583. Wakefield CH, Carey PD, Foulds S, Monson JR, Guillou PJ. Changes in major histocompatibility complex class II expression in monocytes and T cells of patients developing infection after surgery. *Br J Surg*, 1993. **80**: p. 205-9
584. Ditschkowski M, Kreuzfelder E, Regmann V, Ferencik S, Majestschak M, Schmid EN, Obertacke U, Hirche H, Schade UF & Grosse-Wilde H HLA-DR expression and soluble HLA-DR levels in septic patients after trauma. *Annals of Surgery*, 1999. **229**: p. 246-254.
585. Satoh A, e.a., Human leukocyte antigen-DR expression on peripheral monocytes as a predictive marker of sepsis during acute pancreatitis. *Pancreas*, 2002. **25**: p. 245-50
586. Spittler, A., Winkler, S. Gotzinger, P. Oehler, R. Willheim, M. Tempfer, C. Weigel, G. Fugger, R. Boltz-Nitulescu, G. Roth, E. Influence of glutamine on the phenotype and function of human monocytes. *Blood*, 1995. **86**(4): p. 1564-9.
587. Monneret G, e.a., Analytical requirements for measuring monocytic HLA-DR by flow cytometry: application to the monitoring of patients with septic shock. *Clin Chem Lab Med*, 2002. **48**: p. 1589-92.
588. Perry SE, e.a., Is low monocyte HLA-DR expression helpful to predict outcome in severe sepsis? *Intensive Care Med*, 2003. **29**: p. 1245-52
589. Muller Kobold AC, e.a., Leukocyte activation in sepsis: correlations with disease state and mortality. *Intensive Care Med*, 2000. **26**: p. 883-92
590. Kox WJ, Bone RC, Krausch D, Döcke WD, Kox SN, Wauer H, Egerer K, Querner S, Asadullah K, von Baehr R, Volk HD. Interferon gamma-1b in the treatment of compensatory anti-inflammatory response syndrome. A new approach: proof of principle. *Arch Intern Med*, 1997. **157**(4): p. 389-93.
591. Le Tulzo Y, Pangault C, Gacouin A, Guilloux V, Tribut O, Amiot L, Tattevin P, Thomas R, Fauchet R, Drénou B. Early circulating lymphocyte apoptosis in human septic shock is associated with poor outcome. *Shock*, 2002. **18**(6): p. 487-94.
592. Hotchkiss RS, Tinsley KW, Swanson PE, Schmiege RE Jr, Hui JJ, Chang KC, Osborne DF, Freeman BD, Cobb JP, Buchman TG, Karl IE. Sepsis-induced apoptosis causes progressive profound depletion of B and CD4+ T lymphocytes in humans. *J Immunol*, 2001. **66**(11): p. 6952-63.
593. Mondello, S., Galuppo M, Mazzon E, Italiano D, Mondello P, Aloisi C, Cuzzocrea S. Glutamine treatment attenuates the development of organ injury induced by zymosan administration in mice. *Eur J Pharmacol*, 2011. **658**(1): p. 28-40.
594. Fan J, Meng Q, Guo G, Xie Y, Li X, Xiu Y, Li T, Feng W, Ma L. Effects of glutamine added to enteral nutrition on Peyer's patch apoptosis in severely burned mice. *Burns*, 2010 **36**: p. 409-17.
595. MacConmara MP, Maung AA, Fujimi S, McKenna AM, Delisle A, Lapchak PH, Rogers S, Lederer JA, Mannick JA Increased CD4+ CD25+ T regulatory cell activity in trauma patients depresses protective Th1 immunity. *Ann Surg Oncol*, 2006. **244**: p. 514-23.
596. Venet, F., Pachot, A. Debard, A. L. Bohe, J. Bienvenu, J. Lepape, A. Monneret, G. Increased percentage of CD4+CD25+ regulatory T cells during septic shock is due to the decrease of CD4+CD25- lymphocytes. *Crit Care Med*, 2004. **32**(11): p. 2329-31.
597. Sakaguchi, S., Naturally arising CD4+ regulatory T cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. *Annu Rev Immunol*, 2004. **22**: p. 531-62.

598. Venet, F., Chung, C. S. Kherouf, H. Geeraert, A. Malcus, C. Poitevin, F. Bohe, J. Lepape, A. Ayala, A. Monneret, G. Increased circulating regulatory T cells (CD4⁺CD25⁺CD127⁻) contribute to lymphocyte anergy in septic shock patients. *Intensive Care Med*, 2009. **35**(4): p. 678-86.
599. Ni Choileain N, MacConmara M, Zang Y, Murphy TJ, Mannick JA, Lederer JA. Enhanced regulatory T cell activity is an element of the host response to injury. *J Immunol.*, 2006. **176**: p. 225-236
600. Hiraki S, Ono S, Tsujimoto H, Kinoshita M, Takahata R, Miyazaki H, Saitoh D, Hase K. Neutralization of interleukin-10 or transforming growth factor- β decreases the percentages of CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ regulatory T cells in septic mice, thereby leading to an improved survival. *Surgery*, 2012. **151**(2): p. 313-22.
601. Wisnoski N, Chung CS, Chen Y, Huang X, Ayala A. The contribution of CD4⁺ CD25⁺ T-regulatory-cells to immune suppression in sepsis. *Shock*, 2007. **27**: p. 251-257
602. Scumpia PO, Delano MJ, Kelly KM, O'Malley KA, Efron PA, McAuliffe PF, Brusko T, Ungaro R, Barker T, Wynn JL, Atkinson MA, Reeves WH, Salzler MJ, Moldawer LL. Increased natural CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells and their suppressor activity do not contribute to mortality in murine polymicrobial sepsis. *J Immunol*, 2006. **177**: p. 7943-7949.
603. Hotchkiss RS, Osmon SB, Chang KC, Wagner TH, Coopersmith CM, Karl IE. Accelerated lymphocyte death in sepsis occurs by both the death receptor and mitochondrial pathways. *J Immunol*, 2005. **174**: p. 5110-8
604. Hotchkiss RS, Nicholson DW. Apoptosis and caspases regulate death and inflammation in sepsis. *Nat Rev Immunol*, 2006. **6**: p. 813-22.
605. Chang KC, Unsinger J, Davis CG, Schwulst SJ, Muenzer JT, Strasser A, Hotchkiss RS. Multiple triggers of cell death in sepsis: death receptor and mitochondrial-mediated apoptosis. *FASEB J*, 2007. **21**: p. 708-19
606. Hotchkiss RS, e.a., Apoptotic cell death in patients with sepsis, shock, and multiple organ dysfunction. *Crit Care Med*, 1999. **27**: p. 1230-51
607. Bilbault P, Lavaux T, Lahlou A, Uring-Lambert B, Gaub M-P, Ratomponirina C, Meyer N, Oudet P, Schneider F Transient Bcl-2 gene down-expression in circulating mononuclear cells of severe sepsis patients who died despite appropriate intensive care *Intensive Care Med*, 2004. **30**(3): p. 408-15.
608. Geneestier, L., Berard-Bonnefoy, N., and Revillard, J. P. Apoptosis of activated peripheral T cells. *Transplant.Proc.*, 1999. **31**: p. 335-385.
609. Parijls, L.V., and Abbas, A. K. Role of Fas-mediated cell death in the regulation of immune responses. *Curr. Opin. Immunol*, 1996. **8**: p. 355-361.
610. Van Parijls L, Abbas AK. Role of Fas-mediated cell death in the regulation of immune responses. *Curr Opin Immunol*, 1996. **8**(3): p. 355-61.
611. Scaffidi, C., Kirchhoff, S., Krammer, P., and Peter, M. E. Apoptosis signaling in lymphocytes. *Curr. Opin. Immunol*, 1999 **11**: p. 277-285.
612. Wilson, M.R., Apoptotic signal transduction: Emerging pathways. *Biochem. Cell. Biol.*, 1998. **76**: p. 573-582.
613. Williams TE, Ayala A, Chaudry IH. Inducible macrophage apoptosis following sepsis is mediated by cysteine protease activation and nitric oxide release. *J Surg Res*, 1997. **70**: p. 113-8.
614. Xu, Y., Nguyen, Q., Lo, D.C., and Czaja, M. J. c-myc -dependent hepatoma cell apoptosis results from oxidative stress and not a deficiency of growth factors. *J. Cell. Physiol*, 1997. **170**: p. 192-199.

615. Goossens, V., J. Grooten, and W. Fiers, *The oxidative metabolism of glutamine. A modulator of reactive oxygen intermediate-mediated cytotoxicity of tumor necrosis factor in L929 fibrosarcoma cells. J Biol Chem*, 1996. **271**(1): p. 192-6.
616. Harward, T.R., Coe, D. Souba, W. W. Klingman, N. Seeger, J. M. *Glutamine preserves gut glutathione levels during intestinal ischemia/reperfusion. J Surg Res*, 1994. **56**(4): p. 351-5.
617. Klimberg, V.S. and J.L. McClellan, Claude H. Organ, Jr. *Honorary Lectureship. Glutamine, cancer, and its therapy. Am J Surg*, 1996. **172**(5): p. 418-24.
618. Buttke, T.M., and Sandstrom, P. A. *Oxidative stress as a mediator of apoptosis. Immunol. Today*, 1994 **15**: p. 7-10.
619. Banki, K., Hutter, E., Gonchoroff, N. J., and Perl, A. *Molecular ordering in HIV-induced apoptosis. J. Biol. Chem*, 1998 **273**: p. 11944-11953.
620. Bauer, M.K., Vogt, M., Los, M., Siegel, J., Wesselborg, S., and Schulze-Osthoff, K. *Role of reactive oxygen intermediates in activation-induced CD95 ligand expression. J.Biol. Chem*, 1998 **273**: p. 8048-8055.
621. Chiba, T., Takahashi, S., Sato, N., Isii, S., and Kikuchi, K. *Fas-mediated apoptosis is modulated by intracellular glutathione in human T cells. Eur. J. Immunol*, 1996. **26**: p. 1164-1169.
622. Pollheimer, J., Zellner, M. Eliassen, M. M. Roth, E. Oehler, R. *Increased susceptibility of glutamine-depleted monocytes to fever-range hyperthermia: the role of 70-kDa heat shock protein. Ann Surg*, 2005. **241**(2): p. 349-55.
623. La Cava A, Van Kaer L, Fu-Dong-Shi. *CD4+CD25+ Tregs and NKT cells: regulators regulating regulators. Trends Immunol*, 2006. **27**(7): p. 322-7.
624. Colonna M, Trinchieri G, Liu YJ. *Plasmacytoid dendritic cells in immunity. Nat Immunol.*, 2004. **5**(12): p. 1219-26.
625. Marshall JS, Jawdat DM. *Mast cells in innate immunity. J Allergy Clin Immunol*, 2004 **114**(1): p. 21-7.
626. Mocikat R, Braumüller H, Gumy A, Egeter O, Ziegler H, Reusch U, Bubeck A, Louis J, Mailhammer R, Riethmüller G, Koszinowski U, Röcken M. *Natural killer cells activated by MHC class I(low) targets prime dendritic cells to induce protective CD8 T cell responses. . Immunity*, 2003. **19**(4): p. 561-9.
627. Rohde, T., Ullum H, Rasmussen JP, Kristensen JH, Newsholme E, and Pedersen BK. *Effects of glutamine on the immune system: influence of muscular exercise and HIV infection. J Appl Physiol*, 1995. **79**(1): p. 146-50.
628. Rohde, T., D.A. MacLean, and B.K. Pedersen, *Effect of glutamine supplementation on changes in the immune system induced by repeated exercise. Med Sci Sports Exerc*, 1998. **30**(6): p. 856-62.
629. Kohlmeier JE, Reiley WW, Perona-Wright G, Freeman ML, Yager EJ, Connor LM, Brincks EL, Cookenham T, Roberts AD, Burkum CE, Sell S, Winslow GM, Blackman MA, Mohrs M, Woodland DL. *Inflammatory chemokine receptors regulate CD8(+) T cell contraction and memory generation following infection. J Exp Med.*, 2011. **208**(8): p. 1621-34.
630. D'Cruz, L.M., M.P. Rubinstein, and A.W. Goldrath. *Surviving the crash: transitioning from effector to memory CD8+ T cell. Semin. Immunol*, 2009. **21**: p. 92-98.
631. Venet, F., Pachot A, Debard AL, Bohe J, Bienvenu J, Lepape A, Powell WS, Monneret G *Human CD4+CD25+ regulatory T lymphocytes inhibit lipopolysaccharide-induced monocyte survival through a Fas/Fas ligand-dependent mechanism. J Immunol*, 2006. **177**(9): p. 6540-7.
632. Aalto H, Takala A, Kautiainen H, Siitonen S, Repo H. *Monocyte CD14 and soluble CD14 in predicting mortality of patients with severe community acquired infection. Scand J Infect Dis*, 2007. **39**: p. 596-603.

633. Wolk K, Hoflich C, Zuckermann-Becker H, Docke WD, Volk HD, Sabat R. Reduced monocyte CD86 expression in postinflammatory immunodeficiency. *Crit Care Med*, 2007. **35**: p. 458-67.
634. Pangault C, Le Tulzo Y, Tattevin P, Guilloux V, Bescher N, Drenou B. Down-modulation of granulocyte macrophage-colony stimulating factor receptor on monocytes during human septic shock. *Crit Care Med*, 2006. **34**: p. 1193-201
635. Pachot A, Faudot C, Cazalis MA, Mouglin B, Lepape A, Monneret G. Decreased expression of CX3CR1 in septic shock: transcriptional regulation by LPS, cortisol and soluble fractalkine. *Inflammation Res*, 2007. **56**: p. 5131.
636. Luo, M., Bazargan, N. Griffith, D. P. Estivariz, C. F. Leader, L. M. Easley, K. A. Daignault, N. M. Hao, L. Meddings, J. B. Galloway, J. R. Blumberg, J. B. Jones, D. P. Ziegler, T. R. Metabolic effects of enteral versus parenteral alanyl-glutamine dipeptide administration in critically ill patients receiving enteral feeding: a pilot study. *Clin Nutr*, 2008. **27**(2): p. 297-306.
637. Vincent JL, de Mendonça A, Cantraine F, Moreno R, Takala J, Suter PM, Sprung CL, Colardyn F, Blecher S. Use of the SOFA score to assess the incidence of organ dysfunction/failure in intensive care units: results of a multicenter, prospective study. Working group on "sepsis-related problems" of the European Society of Intensive Care Medicine. *Crit Care Med*, 1998 **26**(11): p. 1793-800.
638. Wernerman J, Kirketeig T, Andersson B, Berthelson H, Ersson A, Friberg H, Guttormsen AB, Hendrikx S, Pettilä V, Rossi P, Sjöberg F, Winsö O. Scandinavian Critical Care Trials Group Scandinavian glutamine trial: a pragmatic multi-centre randomised clinical trial of intensive care unit patients *Acta Anaesthesiol Scand*, 2011. **55**(7): p. 812-8.
639. Ziegler, T.R., Bazargan, N. Leader, L. M. Martindale, R. G. Glutamine and the gastrointestinal tract. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 2000. **3**(5): p. 355-62.
640. Schloerb, P.R. and B.S. Skikne, Oral and parenteral glutamine in bone marrow transplantation: a randomized, double-blind study. *JPEN J Parenter Enteral Nutr*, 1999. **23**(3): p. 117-22.
641. Hulsewe, K.W., van der Hulst, R. W. van Acker, B. A. von Meyenfeldt, M. F. Soeters, P. B. Inflammation rather than nutritional depletion determines glutamine concentrations and intestinal permeability. *Clin Nutr*, 2004. **23**(5): p. 1209-16.
642. Suliman ME, Qureshi AR, Stenvinkel P, et al: Inflammation contributes to low plasma amino acid concentrations in patients with chronic kidney disease. *Am J Clin Nutr* 2005. **82**: p. 342-349.
643. Roth E, Zoch G, Schulz F, et al: Amino acid concentrations in plasma and skeletal muscle of patients with acute hemorrhagic necrotizing pancreatitis. *Clin Chem* 1985. **31**: p. 1305-1309.
644. Perez-Barcena, J., Crespi, C. Regueiro, V. Marse, P. Raurich, J. M. Ibanez, J. Garcia de Lorenzo-Mateos, A. Bengoechea, J. A. Lack of effect of glutamine administration to boost the innate immune system response in trauma patients in the intensive care unit. *Crit Care*, 2010. **14**(6): p. R233-43.
645. Fläring UB, Rooyackers OE, Hebert C, Bratel T, Hammarqvist F, Wernerman J. Temporal changes in whole-blood and plasma glutathione in ICU patients with multiple organ failure. *Intensive Care Med*, 2005. **31**(8): p. 1072-8.
646. Berg, A., Bellander, B. M. Wanecek, M Gamrin, L. Elving, A. Rooyackers, O. Ungerstedt, U. Wernerman, J. Intravenous glutamine supplementation to head trauma patients leaves cerebral glutamate concentration unaffected. *Intensive Care Med*, 2006. **32**(11): p. 1741-6.

ABSTRACT

INTRODUCTION. Glutamine (GLN) is the most abundant free amino acid in the human body, defined in critically ill patients as a conditionally essential substrate. Is an important fuel for rapidly dividing cells, including intestinal and immune cells.

Between 10 and 35% of patients admitted to ICU will develop a nosocomial infection, resulting in prolonged hospital stay, increased mortality rate and higher costs.

Several studies show a relationship between GLN depletion and the increased nosocomial infection in ICU patients. The purpose of the present study is to investigate the effects of glutamine supplemented parenteral nutrition on the occurrence of nosocomial infection and to correlate it with the evolution of lymphocyte subpopulations in critically ill patients.

METHODS. We performed a blind randomised, controlled study of GLN enriched parenteral nutrition (GLN-PN). Seventy-two critically ill patients were randomly assigned to 2 groups of nutrition therapies, as either Dipeptiven^R (0.50 g/Kg/day) supplemented parenteral nutrition (GLN group n=36) or an isocaloric and iso-nitrogenous standard parenteral nutrition (STD group n=36). Clinical, microbiological and blood samples for lymphocyte subpopulations were collected at entry, 5th and 10th day after randomization. Diagnosis of a new nosocomial infection after start total parenteral nutrition (TPN) is done by CDC criteria and associated with lymphocyte markers of activation.

RESULTS. Baseline data were similar in standard and glutamine groups. GLN-PN treated patients had less nosocomial infections during their ICU stay ($p < 0.05$). The relative risk of acquiring a new infection in ICU was 1.5 times greater in the control group.

Down regulation of immune system is common in the intensive care patients here illustrated by the control group.

Glutamine supplemented parenteral nutrition reverts this immunodepressed state with increase from day 1 to day 10 after start TPN in CD4 and CD8 lymphocytes and in lymphocyte surface markers of earlier and late activation - CD69, CD26, CD28 and HLADR.

There is a reduction of the markers of apoptosis (CD95L) in the surface of lymphocytes and monocytes, associated with a reduction of Treg lymphocytes (CD4CD25^{high}CD127) at the 10th day in the glutamine group.

There is an increase in the number of monocytes and in the monocyte HLADR expression at day 10 after the randomization in the glutamine group illustrating a better control of the immune response.

There is also an increase in the number of NK cells in the glutamine group.

Logistic regression analysis confirmed that glutamine, CD4 and CD14 HLADR at day 10 after start parenteral nutrition, were independently associated with the reduction of nosocomial infections in ICU.

The mortality is higher in the control group during ICU and Hospital stay but the difference is not statistically significant. However at six months there is a reduction in mortality rate in the glutamine group with a statistically significant difference ($p < 0.05$).

CONCLUSION. In ICU patients, parenteral nutrition with 0.35 g/Kg/day of glutamine during ten days could improve the down regulation of the immune system, reducing nosocomial infection and mortality in those patients. The glutamine immunomodulation is evidenced by an improvement in lymphocyte activation and in the regulatory mechanisms of lymphocyte proliferation.

There is a relationship between the reduction of new nosocomial infection with glutamine and the recovery of CD4 and CD8 lymphocytes and also with the increase in CD14HLADR at day 10 after randomization.

RESUMO

INTRODUÇÃO A glutamina é o aminoácido mais abundante no organismo humano, definida como um substacto condicionalmente essencial para a população de doentes graves de Medicina Intensiva. Constitui uma importante fonte de energia para as células que mais se multiplicam como as células intestinais ou as células de defesa imunológica.

As infecções nosocomiais são frequentes em doentes internados em Medicina Intensiva, contribuindo para o aumento do tempo de internamento, dos custos e da mortalidade nesta população.

Alguns estudos realizados em doente críticos relatavam já uma relação entre a depleção de glutamina e o aumento de infecções nosocomiais. O objectivo deste estudo é investigar os efeitos da suplementação da nutrição parentérica com glutamina no aparecimento de infecções nosocomiais numa população de doentes de Medicina Intensiva, correlacionando-as com a evolução das sub-populações linfocitárias.

MÉTODOS Realizámos um estudo prospectivo controlado, duplamente cego em doentes que por impossibilidade de utilizarem o tubo digestivo tinham que ser nutridos por via parentérica. Randomizámos setenta e dois doentes, repartidos por dois grupos de suporte nutricional; um de estudo a quem foi fornecido uma mistura com 0,5 g/Kg/dia de L-alanil glutamina + 1 g/Kg/dia de uma solução comercial de aminoácidos designado grupo GLN (glutamina) com 36 doentes e outro controlo suprido com 1.5 g/Kg/dia de uma mistura comercial de aminoácidos designado grupo CTR (controlo), com 36 doentes. Ambos os grupos eram isocalóricos e isoazotados. No momento de admissão, aos 5º e 10º dia após a inclusão no estudo, foram feitas colheitas de sangue periférico para determinações de populações e sub-populações linfocitárias e realizadas culturas para estudos bacteriológicos. Usámos os critérios de infecção definidos pelo *Atlanta Center for Disease Control and Prevention*, para caracterizarmos uma nova infecção não aparente no momento da admissão ou que aparecia 48 horas depois do início do suporte nutricional.

RESULTADOS. As características gerais da população deste estudo são muito semelhantes sem grandes diferenças entre os dois grupos nele incluídos. A

glutamina reduz significativamente do aparecimento de novas infecções nosocomiais durante o internamento em Medicina Intensiva. O risco de contrair uma infecção era 1,5 vezes superior no grupo CTR, comparativamente ao grupo GLN.

Verificámos que a população de doentes graves de Medicina Intensiva, aqui ilustrada pelo grupo controlo, era uma população imunodeprimida.

A administração de glutamina em dose e tempo suficientes é capaz de reverter essa imunodepressão, traduzida pelo aumento ao 5º e 10º dia após o início do suporte nutricional do número de linfócitos totais e das populações T CD4 e TCD8, aumento dos monócitos apresentadores de antígeno às células T (CD14 HLADR), aumento da expressão de moléculas co-receptoras à superfície das células T, tanto precoces (CD69, CD26, CD28) quanto tardios (HLADR), redução da apoptose traduzida pela diminuição da expressão CD95L à superfície de linfócitos e monócitos, redução do número de células T reguladoras (CD25CD4) e Foxp3 que contribui para manter o número e funcionalidade das populações linfocitárias, aumento da expressão de receptores de quimiocinas à superfície das células T promotoras da migração das células de defesa para os locais de agressão ajudando a controlar a infecção de forma mais eficaz e aumento do número de células NK traduzindo uma maior capacidade e rapidez na contenção das agressões infecciosas.

Numa análise de regressão logística a glutamina, a elevação de CD4 e de CD14 HLADR ao 10º dia do suporte nutricional estão relacionados de forma independente com a redução da infecção nosocomial no SMI.

A mortalidade no grupo glutamina era menor durante o tempo de internamento em Medicina Intensiva, no Hospital e aos 6 meses após a inclusão no estudo, embora só neste último assumisse uma diferença estatística significativa face ao controlo.

CONCLUSÃO. Em doentes graves internados em Medicina Intensiva, com impossibilidade de usarem o tubo digestivo para administração de nutrientes, a glutamina administrada por via parentérica numa dose de 0,35 g/Kg/dia, durante 10 dias, reduz significativamente o aparecimento de infecções nosocomiais e a mortalidade aos seis meses.

A glutamina contribui para reverter o estado de imunodepressão característico da população de doentes graves de Medicina Intensiva, através do aumento do

número de linfócitos e de algumas sub-populações linfocitárias com especial destaque para os linfócitos TCD4, TCD8 e para os monócitos CD14 HLADR ao 10º dia após o início do suporte nutricional.