

VALOR CRÍTICO DA CITRULINA PARA AS COMPLICAÇÕES DO ENXERTO NO TRANSPLANTE DE INTESTINO

ANDRÉ IBRAHIM DAVID*, LUIZ ARNALDO SZUTAN, JEFFREY GAYNOR, PHILLIP RUIZ, GENNARO SELVAGGI, PANAGIOTIS TRYPHONOPOULOS, GARY KLEINER, JANG I MOON, SEIGO NISHIDA, DEBBIE WEPPLER, VIOLET SQUENAZI, LOBELLA CONANAN, DAVID M LEVI; TOMOAKI KATO; ANDREAS G TZAKIS

Trabalho realizado no departamento de Cirurgia da Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo, São Paulo, SP, e na Universidade de Miami, Jackson Memorial Hospital, Miami, Flórida

RESUMO

OBJETIVO. Analisar, numa ampla amostra, o valor crítico da citrulina que confirma a presença das principais complicações do enxerto: rejeição e infecção.

MÉTODOS. Foram coletadas 2135 amostras de citrulina sérica, na forma de gota de sangue seca, de 57 doentes submetidos a transplante de intestino/multivisceral no Jackson Memorial Hospital na Universidade de Miami, de março de 2004 a abril de 2006. Todas as amostras são do pós-operatório três meses em diante, passada a conhecida curva de elevação da citrulina após a recuperação das lesões causadas pela isquemia e reperusão do pós-transplante.

RESULTADOS. Utilizando um valor limite menor que 13 μ moles/L, a sensibilidade da citrulina foi de 96,4% para detectar rejeição celular aguda (RCA) moderada ou grave. A especificidade para as complicações mais frequentes, rejeição e infecção foi de 54%-74% nas crianças e 83%-88% nos adultos, e o valor preditivo negativo (VPN) foi > 99%.

CONCLUSÃO. A citrulina pode ser utilizada como método não-invasivo para avaliar a evolução do enxerto intestinal após três meses do TI. Os episódios de RCA moderado e grave podem ser afastados quando o valor da citrulina for maior que 13 μ moles/L devido ao alto valor preditivo negativo.

UNITERMOS: Transplante de intestino. Enxerto de intestino. Rejeição do enxerto. Citrulina.

*Correspondência

Rua Cesário Motta Jr., 112
CEP 01221-020

Vila Buarque, São Paulo –
SP, Brasil

Telefone: 55 (11) 2176-
7699 / 3666-7307

Fax: 55 (11) 2176-7699

drandredavid@terra.com.br

INTRODUÇÃO

A sobrevivência do paciente e do enxerto após o transplante de intestino (TI) tem melhorado significativamente nos últimos anos¹⁻⁷. A melhora da sobrevivência se deve à experiência adquirida na técnica cirúrgica e no acompanhamento dos doentes no pós-operatório imediato e tardio. Outro fator importante é o diagnóstico precoce das complicações mais frequentes: episódios de rejeição celular aguda (RCA); infecções por bactérias, vírus e fungos; doença enxerto vs hospedeiro (DEVH) e doença linfoproliferativa pós-transplante (DLPT).

Exames de avaliação funcional do intestino como D-xylose, teste de absorção com 3-O-metilglicose e a razão da área de digestão dos nutrientes são exames demorados e de difícil aplicação na prática clínica⁸. A endoscopia com magnificação de imagem tem aplicação na visualização da mucosa intestinal, permite o reconhecimento de lesões características de RCA e o diagnóstico imediato para o tratamento da RCA, porém é um método examinador dependente⁴. O diagnóstico de certeza de RCA e o grau da rejeição são realizados com biópsia e análise histopatológica^{9,10}. Daí a necessidade de um marcador bioquímico para monitorar a função do enxerto intestinal. Um marcador que possa mostrar a lesão do enterócito, sem a influência da dieta, para o diagnóstico dos problemas intestinais¹¹.

A citrulina plasmática tem sido descrita como marcador da quantidade de enterócitos em pessoas com Síndrome do Intestino Curto^{12,13}.

Aproximadamente toda a concentração plasmática da citrulina, aminoácido não-proteico, provém da glutamina metabolizada nos enterócitos, que é liberada na circulação portal^{14,15}. A citrulina, aminoácido intermediário do ciclo da uréia, também é produzida nos hepatócitos, porém o que é produzido no fígado é metabolizado, sem sua liberação na circulação sistêmica¹⁵⁻¹⁷. Os rins extraem 83% da citrulina liberada pelo intestino e convertem 75% em arginina¹¹.

Como consequência, a concentração plasmática da citrulina se mostrou útil como marcadora da função da massa de enterócitos em doentes com Síndrome do Intestino Curto (SIC)^{8,13,18} e doença do Microvílio¹². O uso da citrulina tem sido proposto também como um simples marcador quantitativo da lesão do epitélio intestinal após radioterapia e mielossupressão^{16,19}. Tzakis et al. compararam os valores da citrulina entre doentes pré-transplante e voluntários saudáveis, sendo que os níveis dos primeiros foram significativamente menores.

Estudos preliminares têm mostrado o potencial da citrulina sérica como marcador da RCA após o TI. Especificamente, os níveis de citrulina diminuíram conforme a gravidade da RCA, tendo uma relação direta (quanto maior a rejeição, menor o valor da citrulina sérica)^{11,19-23}. Foi relatado por Pappas et al.²¹, que ocorre um atraso na normalização dos valores da citrulina naqueles receptores de TI que apresentaram episódios de RCA nos primeiros meses após o transplante. Dois estudos mostraram que em pacientes que tiveram apenas RCA leve ou não tiveram rejeição, a citrulina sérica apresentou um aumento gradual

após o transplante e na maioria dos casos chegou a um patamar de normalidade em 90 dias^{21,22}.

O valor considerado "normal" da citrulina varia de acordo com a idade e até mesmo entre populações; os valores variam de 3 a 55 $\mu\text{moles/L}$ com uma média de $38 \pm 8 \mu\text{moles/L}$ em amostras de voluntários saudáveis¹⁶. O valor "normal" entre os receptores de TI também mostrou uma larga variação entre os valores mínimos e máximos. Sabe-se que os níveis de citrulina decrescem conforme o grau de rejeição^{1,21}. A elevação habitual da citrulina no pós-transplante com RCA tem curvas desviadas para a direita, e este desvio está diretamente relacionado ao grau de rejeição²¹. Nos doentes que apresentaram episódios de RCA moderada e grave, a média da citrulina sérica foi estatisticamente menor do que a média em períodos livres de RCA²³.

YU et al.²⁴, compararam os valores da gota ressecada de sangue com os valores de citrulina medida no plasma e mostraram acurácia e confiabilidade do primeiro método.

Apesar dos inúmeros estudos envolvendo a análise da citrulina após o TI, o valor de corte mínimo para o diagnóstico de complicação no enxerto intestinal e as complicações que diminuem significamente os valores da citrulina ainda não foram elucidados. O objetivo deste estudo foi determinar o valor crítico abaixo do qual o enxerto intestinal está em risco para as mais frequentes complicações, principalmente a RCA.

MÉTODOS

Estudo revisado e aprovado pelo "Institutional Review Board", com doentes que receberam TI, desde março de 2004 a agosto de 2006. Fizeram parte do estudo 57 receptores de TI com a coleta de amostras após três meses, com um total de 2135 amostras. Cinquenta e quatro destes doentes receberam o primeiro transplante e os outros três passaram por retransplante. Trinta e sete (68,5% dos receptores) eram doentes menores de 18 anos, a mediana das idades no momento do transplante foi de um ano. Vinte (31,5%) eram receptores adultos com idade média de 36 anos. Vinte e um doentes (37%) receberam transplante de intestino isolado ou fígado e intestino (9 crianças e 12 adultos) e 36 doentes (63%) receberam transplante multivisceral ou multivisceral modificado (28 crianças e 8 adultos).

A distribuição dos valores de citrulina foi realizada conforme a classificação em cinco grupos: $K < 5$, $5 \leq X < 10$, $10 \leq Y < 15$, $15 \leq W < 20$, e $Z \geq 20 \mu\text{moles/L}$. Sendo a variável o número de valores da amostra que se encaixam em cada grupo. Os seguintes tipos de TI foram incluídos: intestino isolado, fígado-intestino, multivisceral e multivisceral modificado (i.e, multivisceral sem o fígado). A imunossupressão de manutenção foi com tacrolimus (Prograf; Fujisawa Pharmaceuticals, Deerfield, IL).

As coletas das amostras de gota ressecada de sangue para a análise da citrulina foram feitas conforme a orientação do "National Committee on Clinical Laboratory Standards" (NCCLS)²⁵ e foram analisadas por espectrometria cromatográfica hidrofílica de coluna de massa (HILIC/MS/MS). A quantificação da citrulina foi feita através do programa Xcalibur.

As coletas da citrulina foram realizadas em tempos específicos no pós-transplante para permitir um acompanhamento planejado de

cada caso. Nos doentes internados, imediatamente após o TI foram coletadas amostras diárias ou em dias intercalados até completar dois meses ou receberem alta hospitalar. Se o doente internado, em qualquer período pós-TI, tiver suspeita de rejeição (aumento do débito do estoma, dor abdominal, febre, desnutrição ou outra situação clínica de risco à vida como infecção) ou mesmo em vigência do tratamento desta rejeição, também foram coletadas amostras diárias ou em dias intercalados. Nos doentes ambulatoriais, ou seja, após três a quatro meses do TI, foram coletadas amostras uma a duas vezes por mês. No dia em que foi coletada a amostra de citrulina se analisou a condição clínica do doente com relação à presença de rejeição, infecção ou DLPT. Os episódios de RCA foram considerados quando houve sintomas, biópsia e tratamento. O diagnóstico histopatológico de maior lesão foi considerado como o grau de RCA de cada episódio.

O episódio de RCA foi considerado terminado quando duas biópsias foram normais, sem rejeição ou o doente foi retransplantado ou faleceu. Foi utilizada a graduação de rejeição do consenso do VIII Simpósio de Transplante de Intestino em 2003: sem rejeição ou indeterminada (grau 0), rejeição leve (grau 1), moderada (grau 2) e grave (grau 3)^{9,10}. A biópsia também identificou em alguns casos a presença de DLPT.

Os episódios de infecção foram definidos pela presença de sintomas clínicos e confirmados por culturas. A resolução da infecção foi considerada quando o término dos sinais clínicos e a cultura se tornaram negativos, após 14 dias de antibioticoterapia apropriada ou quando o doente faleceu. A presença de infecção sanguínea foi determinada pelo crescimento do microrganismo na cultura do sangue acompanhado de alguns dos sinais clássicos de bacteremia como febre, calafrios, hipotensão, leucocitose ou leucopenia.

A distribuição dos valores de citrulina é de uma amostra ampla de 2135 exames. A distribuição dos valores de concentração de uma substância segue um padrão logarítmico, por isso a análise estatística da citrulina foi feita nesta escala²⁶.

Em todos os testes estatísticos, o nível de significância considerado foi de 5%.

RESULTADOS

O número mediano de amostras de citrulina que cada receptor contribuiu para o total foi de 26 amostras, com uma variação de 1 a 142 amostras. O tempo médio do transplante até o dia da coleta foi de 18,8 meses (de 3 a 125,3 meses). O valor médio das amostras foi de 12,7 $\mu\text{moles/L}$, variando de 1,4 a 91,8 $\mu\text{moles/L}$, e media geométrica de 12,3 $\mu\text{moles/L}$. No período em que foram coletadas as amostras de citrulina ocorreram 25 episódios de RCA em 15 doentes, sendo que cinco deles tiveram dois episódios, um com três episódios e um com quatro. Destas RCA, nove foram leves, 11 moderadas e cinco graves. Destes 25 episódios de RCA coletaram-se 268 amostras de citrulina em gota ressecada de sangue. Houve uma alta associação de baixos níveis de citrulina e RCA ($p < 0,00001$). Mais especificamente, na presença de RCA, os valores menores que 15 $\mu\text{moles/L}$ representaram 91,4% (245/268) do total de amostras, em comparação com 55,2% (1031/1867) quando não havia RCA.

A Tabela I mostra as estimativas dos valores preditivos positivos e negativos de valores de corte entre 10 a 15 $\mu\text{moles/L}$ da citrulina para detectar RCA moderada ou grave. Entre os valores de 10 a 15 $\mu\text{moles/L}$, o valor de 13 $\mu\text{moles/L}$ apresentou, tanto em crianças como em adultos, um VPN >99% nos períodos de RCA moderada ou grave. Tiveram um valor menor que 13 $\mu\text{moles/L}$, 82% de todos os episódios de RCA.

DISCUSSÃO

A citrulina necessita de pelo menos três meses, em média, para atingir o seu patamar de estabilidade. Isto ocorre se o receptor não apresentou rejeição no período inicial após o TI, caso contrário, a rejeição pode retardar o tempo do patamar. Portanto, neste estudo, os resultados não têm a variação da citrulina do pós-operatório recente.

Nos primeiros três meses do pós-transplante ocorreu uma piora da função renal devido ao trauma cirúrgico, lesão de isquemia-reperusão e complicações como infecção e hipotensão. Nos doentes estáveis, após este período, houve melhora e estabilização da função renal³.

Na insuficiência renal há aumento na citrulina plasmática e na concentração urinária²⁷. Neste estudo, a análise da citrulina ocorreu após este período de maior variação da função renal, que, se presente, aumentaria os valores plasmáticos da citrulina. Nas crianças, a média da creatinina no pré-transplante, pós-transplante (6 e 12 meses) foram de 0,35, 0,45 e 0,45mg/dl, respectivamente, e a mediana foi de 0,30, 0,40 e 0,40mg/dl. Nos adultos, a média da creatinina no pré-transplante, pós-transplante (6 e 12 meses) foi de 0,82, 1,58 e 1,50mg/dl respectivamente e a mediana foi de 0,80, 1,40 e 1,40mg/dl.

Os resultados no pós-transplante demonstraram valores dentro da faixa normal de funcionamento do rim, portanto a variação da citrulina independeu da função renal.

De todos os casos de RCA, inclusive RCA leve, 74,2% apresentaram valores menores que 10 $\mu\text{moles/L}$ e apenas 6,8% tiveram um valor de citrulina maior que 15 $\mu\text{moles/L}$, portanto na faixa entre 10 e 15 $\mu\text{moles/L}$ deveria estar um valor de corte que pudesse ser usado na triagem dos receptores de TI. Este valor deveria ter um alto VPN (e o melhor VPP possível) para ser usado como valor de referência na triagem dos doentes transplantados²⁷.

Considerou-se uma boa sensibilidade pelo menos 80% dos valores do teste, assim este número estaria em torno de 10 $\mu\text{moles/L}$. Uma boa especificidade, de pelo menos 50%, seria com um valor em torno de 15 $\mu\text{moles/L}$. Sendo assim, consideramos os valores preditivos positivos (VPP) e negativos (VPN) dos valores entre 10 e 15 $\mu\text{moles/L}$. O melhor valor de corte não pôde ser estabelecido pelo VPP que não foi alto e pode ser explicado pelos outros fatores que diminuíram os valores da citrulina, i.e., rejeição leve, infecção sanguínea ou respiratória. Entretanto os altos valores dos VPNs mostram claramente sua utilidade clínica.

Com o objetivo de aumentar a especificidade e manter uma alta sensibilidade do exame da citrulina sérica, testamos um valor um pouco menor: 13 $\mu\text{moles/L}$. Tanto em crianças como em adultos, o VPN é >99% quando o valor de corte de 13 $\mu\text{moles/L}$ foi utilizado nos períodos de RCA moderada ou grave.

Tabela I - Estimativas dos valores preditivos positivos (VPP) e negativos (VPN) de valores de corte entre 10 a 15 $\mu\text{moles/L}$ da citrulina para detectar RCA moderada ou grave (Universidade de Miami, Jackson Memorial Hospital, 2006).

Valor de Corte da Citrulina	Crianças		Adultos	
	VPP	VPN	VPP	VPN
< x \geq 10 $\mu\text{moles/L}$	16,3%	96,6%	33,1%	97,6%
< x \geq 11 $\mu\text{moles/L}$	15,5%	97,3%	32,8%	98,9%
< x \geq 12 $\mu\text{moles/L}$	14,8%	98,0%	30,7%	99,3%
< x \geq 13 $\mu\text{moles/L}$	14,4%	99,2%	28,7%	99,5%
< x \geq 14 $\mu\text{moles/L}$	13,5%	99,3%	26,7%	99,5%
< x \geq 15 $\mu\text{moles/L}$	12,8%	99,4%	24,0%	99,5%

Fonte: prontuário eletrônico JMH/UM-2006

Apresentaram valor \leq 13 $\mu\text{moles/L}$ 82% de todos os episódios de RCA. Entre as amostras, na presença de RCA moderada ou grave, apenas dois valores da citrulina eram > 13 e \leq 15 $\mu\text{moles/L}$ (2/36 amostras). Portanto, se o valor da citrulina é menor que 13 $\mu\text{moles/L}$, com certeza o enxerto tem um problema (exame de triagem) que pode ser RCA moderada ou grave (que será confirmada pelo exame padrão-ouro: biópsia); mas se o valor é \geq 13 $\mu\text{moles/L}$, a chance deste doente estar apresentando um quadro de RCA moderada ou grave e de menos de 1% (alto VPN).

CONCLUSÃO

Conclui-se que a citrulina pode ser utilizada como método não-invasivo para avaliar a evolução do enxerto intestinal após três meses do TI. Os episódios de RCA moderada e grave podem ser afastados quando o valor da citrulina for maior que 13 $\mu\text{moles/L}$ devido ao alto valor preditivo negativo.

Conflito de interesse: não há

SUMMARY

CRITICAL VALUE OF CITRULLINE FOR COMPLICATIONS OF INTESTINAL TRANSPLANT GRAFT

OBJECTIVE. A biochemical marker for detection of acute cellular rejection following small intestine transplantation has been sought. Citrulline, a non-protein amino acid synthesized mainly by functioning enterocytes, has been proposed. Trial sensitivity has been reportedly high but with low specificity. Thus, the goal was to determine, in a sufficiently large analysis, the significant value of citrulline level in the post-transplant setting, which would correlate with complications such as rejection and infection.

METHODS. Since March, 2004 2,135 dried blood spot (DBS) citrulline samples were obtained from 57 small intestine transplant recipients three months or more after post-transplant, i.e., once the expected period of recovery in the citrulline levels had occurred.

RESULTS. Using a < 13 vs. \geq 13 $\mu\text{moles/L}$ cut off point, sensitivity of DBS citrulline for the detection of moderate or severe ACR was extremely high (96.4%). Furthermore, specificity estimates (given the absence of ACR and these particular infections), while controlling for time-to-DBS sample

were reasonably high (54%-74% in children and 83%-88% in adults), and the negative predictive value (NPV) was >99%.

CONCLUSION. Citrulline is a non-invasive marker to evaluate problems of the intestinal graft after three months post-transplant. Due to the high NPV, a moderate or severe ACR can be ruled out, based exclusively on knowledge of a high value for DBS citrulline. [Rev Assoc Med Bras 2008; 54(5): 426-9]

KEY WORDS: intestinal transplant, intestinal graft, rejection and citrulline.

REFERÊNCIAS

1. Tzakis AG, Kato T, Levi DM, DeFaria W, Selvaggi G, Wepler D, et al. 100 multivisceral transplants at a single center. *Ann Surg.* 2005;242:480-93.
2. Kato T, Gaynor JJ, Selvaggi G, Mittal N, Thompson J, McLaughlin GE, et al. Intestinal transplantation in children: a summary of clinical outcomes and prognostic factors in 108 patients from a single center. *J Gastrointest Surg.* 2005;9:75-89.
3. Kato T, Tzakis AG, Gennaro S, Gaynor JJ, David AI, Busotti A, et al. Intestinal and multivisceral transplantation in children. *Ann Surg.* 2006;243:756-66.
4. Kato T, Gaynor JJ, Nishida S, Mittal N, Selvaggi G, Levi D, et al. Zoom endoscopic monitoring of small bowel allograft rejection. *Surg Endosc.* 2006;20:773-82.
5. Gaynor JJ, Kato T, Selvaggi G, Moon JJ, Levi DM, Nishida S, et al. The importance of analyzing graft and patient survival by cause of failure: An example using pediatric small intestine transplant data. *Transplantation.* 2006;81:1133-40.
6. Selvaggi G, Kato T, Gaynor JJ, Thompson J, Nishida S, Madariaga J, et al. Analysis of rejection episodes in over 100 pediatric intestinal transplant recipients. *Transplant. Proc.* 2006;38:1711-12.
7. Quintini C, Kato T, Gaynor JJ, Ueno T, Selvaggi G, Gordon P, et al. Analysis of risk factors for the development of posttransplant lymphoproliferative disorder among 119 children who received primary intestinal transplants at a single center. *Transplant Proc.* 2006;38:1755-58.
8. Jianfeng G, Weiming Z, Ning L, Fangnan L, Li T, Nan L, Jieshou L. Serum citrulline is a simple quantitative marker for small intestinal enterocytes mass and absorption function in short bowel patients. *JSurg Res.* 2005;127:177-82.
9. Lee RG, Nakamura K, Tsamandas AC, Abu-Elmagd K, Furukawa H, Hutson WR, et al. Pathology of human intestinal transplantation. *Gastroenterology.* 1996;110:1820-34.
10. Ruiz P, Bagni A, Brown R, Cortina G, Harpaz N, Magid MS, Reyes J. Histological criteria for the identification of acute cellular rejection in human small bowel allografts: Results of the Pathology Workshop at the VIII International Small Bowel Transplant Symposium. *Transplant Proc.* 2004;36:335-7.
11. Gondolesi G, Fishbein T, Chehade M, Tschernia A, Magid M, Kaufman S, et al. Serum citrulline is a potential marker for rejection of intestinal allografts. *Transplant Proc.* 2002;34:918-20.
12. Crenn P, Vahedi K, Lavergne-Slove A, Cynober L, Matuchansky C, Messing B. Plasma citrulline: A marker of enterocyte mass in villous atrophy-associated small bowel disease. *Gastroenterology.* 2003;124:1210-19.
13. Rhoads JM, Plunkett E, Galanko J, Lichtman S, Taylor L, Maynor A, et al. Serum citrulline levels correlate with enteral tolerance and bowel length in infants with short bowel syndrome. *J Pediatr.* 2005;146:542-47.
14. Windmueller HG. Glutamine utilization by the small intestine. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol.* 1982;53:201-37.
15. Wakabayashi Y, Yamada E, Hasegawa T, Yamada R. Enzymological evidence for the indispensability of small intestine in the synthesis of arginine from glutamate. I. Pyrroline-5-carboxylate synthase. *Arch Biochem Biophys.* 1991;291:1-8.
16. Cynober LA. Plasma amino acid levels with a note on membrane transport: Characteristics, regulation, and metabolic significance. *Nutrition.* 2002;18:761-6.
17. Curis E, Nicolis I, Moinard C, Osowska S, Zerrouk N, Benazeth S, Cynober L. Almost all about citrulline in mammals. *Amino Acids.* 2005;177-205.
18. Crenn P, Coudray-Lucas C, Thuillier F, Cynober L, Messing B. Postabsorptive plasma citrulline concentration is a marker of absorptive enterocyte mass and intestinal failure in humans. *Gastroenterology.* 2000;119:1496-505.
19. Pappas PA, Saudubray JM, Tzakis AG, Rabier D, Carreno MR, Gomez-Marín O, et al. Serum citrulline and rejection in small bowel transplantation: a preliminary report. *Transplantation.* 2001;72:1212-6.
20. Pappas PA, Saudubray JM, Tzakis AG, Rabier D, Carreno MR, Gomez-Marín O, et al. Serum citrulline as a marker of acute cellular rejection for intestinal transplantation. *Transplant Proc.* 2002;34:915-7.
21. Pappas PA, Tzakis AG, Gaynor JJ, Carreno MR, Ruiz P, Huijting F, et al. An analysis of the association between serum citrulline and acute rejection among 26 recipients of intestinal transplant. *Am J Transplant.* 2004;4:1124-32.
22. Gondolesi G, Ghirardo S, Raymond K, Hoppenhauer L, Surillo D, Rumbo C, et al. The value of plasma citrulline to predict mucosal injury in intestinal allografts. *Am J Transplant.* 2006;6:2786-90.
23. David AI, Gaynor JJ, Zis PP, Conanan L, Goldsmith L, Esquenazi V, Selvaggi G, et al. An association of lower serum citrulline levels within 30 days of acute rejection in patients following small intestine transplantation. *Transplant Proc.* 2006;38:1732-32.
24. Yu HC, Tuteja S, Moon JJ, Kleiner GI, Conanan L, Gaynor JJ, et al. Utilization of dried blood spot citrulline level as a noninvasive method for monitoring graft function following intestinal transplantation. *Transplantation.* 2005;80:1729-33.
25. Mei JV, Alexander JR, Adam BW, Hannon WH. Use of filter paper for the collection and analysis of human whole blood specimens. *J Nutr.* 2001;131:1631S-6S.
26. Snedecor GW, Cochran WG. *Statistical methods.* 6th ed. Iowa: The Iowa State University Press; 1971.
27. Banchaabouchi MA, Marescan B, D'Hooghe R, Engelborghs S, De Deyn PP. Consequences of renal mass reduction on amino acid and biogenic amine levels in nephrectomized mice. *Amino Acids.* 2000;18:265-77.

Artigo recebido: 20/09/07
Aceito para publicação: 15/04/08
