

MÔNICA VIEIRA MANO DE SOUZA

EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO DIETÉTICA

DE AMINOÁCIDOS NAS CAMADAS

SUBMUCOSA E MUSCULAR DA PAREDE

ILEAL EM RATOS SUBMETIDOS A

IRRADIAÇÃO ABDOMINAL

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia e Ciências Cirúrgicas – PG-FISIOCIRURGIA – Faculdade de Ciências Médicas da Universidade do Estado do Rio de Janeiro, como requisito final para obtenção do Grau de Mestre

Orientadores: Prof. Dr. Francisco Lopes Paulo
Prof. Dr. Ruy Garcia Marques

Rio de Janeiro, RJ – Brasil

2009

MÔNICA VIEIRA MANO DE SOUZA

**EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO DIETÉTICA DE
AMINOÁCIDOS NAS CAMADAS SUBMUCOSA E
MUSCULAR DA PAREDE ILEAL EM RATOS
SUBMETIDOS A IRRADIAÇÃO ABDOMINAL**

Dissertação de Mestrado

Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia e Ciências

Cirúrgicas – PG-FISIOCIRURGIA

Faculdade de Ciências Médicas

Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Rio de Janeiro, 11 de fevereiro de 2009.

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Eduardo Haruo Saito (Presidente)
Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Prof. Dr. Waldemar Silva Costa
Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Prof. Dr. Alberto Schanaider
Universidade Federal do Rio de Janeiro

S729 Souza, Mônica Vieira Mano de.

Efeito da suplementação dietética de aminoácidos nas camadas submucosa e muscular da parede ileal em ratos submetidos à irradiação abdominal / Mônica Vieira Mano de. – 2009.
xvii, 62f. il.

Orientadores: Francisco Lopes Paulo; Ruy Garcia Marques.

Dissertação (Mestrado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Faculdade de Ciências Médicas. Pós Graduação em Fisiopatologia e Ciências Cirúrgicas.
Bibliografia: f. 48-60.

1. Câncer – Radioterapia – Teses. 2. Glutamina. 3. Radioterapia – Teses. 4. Intestino - doenças. I. Paulo, Francisco Lopes. II. Marques, Ruy Garcia. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

CDU 616-006.6:615.849

À minha família, meu porto seguro, sempre presente, que me apóia, estimula e incentiva a seguir em frente, em todas as etapas da minha vida.

Ao meu marido, **Luiz Fernando José de Souza** pela abnegação, dedicação, solidariedade, amor, compreensão e paciência e o apoio incondicional.

Aos meus filhos queridos, **Murilo Vieira Mano de Souza e Rômulo Vieira Mano de Souza** pelos muitos beijinhos gostosos, massagens nos pés, os desenhos e bilhetinhos de amor e carinho que fizeram com que eu não desistisse.

Aos meus pais, **Alda Vieira Mano e Venancio Alvarez Mano** pelo incentivo e orações para que eu conseguisse paz para seguir adiante.

AGRADECIMENTOS TÉCNICOS

Ao Prof. Dr. Francisco L. Paulo, pela oportunidade de integrar sua linha de pesquisa.

Ao Prof. Dr. Ruy G. Marques, pela orientação na confecção desta tese.

Ao Prof. Dr. Luiz E. M. Cardoso, pelos ensinamentos na área de bioquímica.

Ao Prof. Dr. Waldemar S. Costa, pelo uso do laboratório e sugestões durante a execução deste trabalho.

Ao Físico Afrânio Akreman, pelo auxílio na realização dos procedimentos de irradiação.

À Doutoranda Cristina Fajardo Diestel, pelo auxílio durante toda a execução da pesquisa.

Aos Médicos Veterinários Dr. Carlos Eduardo Rodrigues Caetano à Dr^a Érica Lima, pela realização dos procedimentos cirúrgicos.

Ao Bioteristas Domingos Henrique de Souza Peçanha, Alessandra Demétrio do Nascimento e Cláudio Sérgio Correia Lau, pelo cuidado dos animais e auxílio durante os procedimentos cirúrgicos.

Às Mestrandas Etienne de Aguiar Picanço e Juliana Crucinsky, pela divisão de tarefas na parte dos experimentos desta tese.

À Doutoranda Helena Maria Figueiredo Pazos, pela análise do material histológico.

Às Nutricionistas do Hospital Estadual Carlos Chagas, em especial à chefe da Nutrição, Abigail Geraist pelo incentivo para a realização desta tese.

Às Nutricionistas do Hospital Municipal Lourenço Jorge, Renata Maria dos Santos Solano, Cláudia Oliveira da Costa, Cristiane Lopes Ferreira e Andréa Ricardo: pelas trocas de plantões quando precisei.

CONFLITOS DE INTERESSES

Nada a declarar

ÍNDICE

	Página
LISTA DE TABELAS	
LISTA DE FIGURAS	
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	
1 – RESUMO	
2 – ABSTRACT	
3 – INTRODUÇÃO	1
4 – OBJETIVOS	8
5 – MÉTODO	9
5.1 – Animais e grupos	9
5.2 – Composição da ração oferecida	10
5.3 – Irradiação abdominal	11
5.4 – Suplementação de aminoácidos	12
5.5 – Controle de peso e de ingestão de ração e água	12
5.6 – Ressecção dos segmentos intestinais	13
5.7 – Processamento histológico	13
5.8 – Análise morfométrica	15
5.9 – Análise estatística	16
5.10 – Aspectos éticos no cuidado com os animais	17
6 – RESULTADOS	18
6.1 – Evolução dos animais	18
6.1.1 – Peso dos animais	18
6.1.2 – Ingestão de ração	18
6.1.3 – Ingestão de água	21
6.2 – Análise morfométrica	23
6.2.1 – Camada submucosa do íleo	23
6.2.2 – Camada muscular do íleo	24

6.3 – Analise histológica	25
6.3.1 – Vermelho de Picro Sirius	25
6.3.2 – Imunohistoquímica	28
6.3.2.1 – Colágenos tipo I e tipo III	28
6.3.2.2 – Músculo liso (α-actina)	33
7 – DISCUSSÃO	37
8 – CONCLUSÃO	47
9 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	48
ANEXO	61

LISTA DE TABELAS

	Página
Tab. 1. Composição da ração oferecida aos animais.	11
Tab. 2. Análise descritiva do peso corporal inicial e final nos diversos grupos de animais.	19
Tab. 3. Análise descritiva da ingestão de ração, antes e após a irradiação.	20
Tab. 4. Análise descritiva da ingestão de água, antes e após a irradiação.	22
Tab. 5. Análise descritiva da espessura da submucosa nos grupos de animais.	24
Tab. 6. Análise descritiva da espessura da camada muscular nos grupos de animais.	25

LISTA DE FIGURAS

	Página
Fig.1. Fotomicrografia de íleo de rato saudável com a coloração tricrômica de Masson (400X).	16
Fig. 2. Peso dos animais no início do experimento e percentual de ganho ou alteração de peso nos diversos grupos do estudo.	20
Fig. 3. Ingestão de ração dos animais dos diversos grupos de estudo, antes e após a irradiação abdominal.	21
Fig. 4. Ingestão de água nos animais dos diversos grupos de estudo, antes e após a irradiação abdominal.	22
Fig. 5. Espessura da submucosa do íleo dos animais nos diversos grupos de estudo.	24
Fig. 6. Espessura das camadas musculares circular interna e longitudinal externa do íleo dos animais nos diversos grupos de estudo.	25
Fig. 7. Fotomicrografias do íleo de rato não irradiado e sem suplementação de aminoácidos (grupo I), sem polarização (A) e sob luz polarizada (B) (400X).	26
Fig. 8. Fotomicrografias do íleo de rato irradiado e sem suplementação de aminoácidos (grupo II), sem polarização (A) e sob luz polarizada (B) (400X).	26
Fig. 9. Fotomicrografias do íleo de rato irradiado e com suplementação de L-glutamina (grupo III), sem polarização (A) e sob luz polarizada (B) (400X).	27
Fig. 10. Fotomicrografias do íleo de rato irradiado e com suplementação de glicina (grupo IV), sem polarização (A) e sob luz polarizada (B) (400X).	27

Fig. 11. Fotomicrografias do íleo de rato irradiado e com 27
suplementação de L-arginina (grupo V), sem polarização (A)
e sob luz polarizada (B) (400X).

Fig. 12. Fotomicrografia do íleo de rato controle não- 29
irradiado (grupo I), com imunomarcção para colágeno tipo I
(400X) (*).

Fig. 13. Fotomicrografia do íleo de rato controle irradiado 29
(grupo II), com imunomarcção para colágeno tipo I (400X).

Fig. 14. Fotomicrografia do íleo de rato irradiado e submetido 30
a suplementação dietética com L-glutamina (grupo III), com
imunomarcção para colágeno tipo I (400X) (*).

Fig. 15. Fotomicrografia do íleo de rato irradiado e submetido 30
a suplementação dietética com glicina (grupo IV), com
imunomarcção para colágeno tipo I (400X) (*).

Fig. 16. Fotomicrografia do íleo de rato irradiado e submetido 31
a suplementação dietética com L-arginina (grupo V), com
imunomarcção para colágeno tipo I (400X) (*).

Fig. 17. Fotomicrografia do íleo de rato controle não-irradiado 31
(grupo I), com imunomarcção para colágeno tipo III (400X)
(*).

Fig. 18. Fotomicrografia do íleo de rato controle irradiado 32
(grupo II), com imunomarcção para colágeno tipo III (400X)
(*).

Fig. 19. Fotomicrografia do íleo de rato irradiado e submetido 32
a suplementação dietética com L-glutamina (grupo III), com
imunomarcção para colágeno tipo III (400X) (*).

Fig. 20. Fotomicrografia do íleo de rato irradiado e submetido 33
a suplementação dietética com glicina (grupo IV), com

imunomarcção para colágeno tipo III (400X) (*).

Fig. 21. Fotomicrografia do íleo de rato irradiado e submetido a suplementação dietética com L-arginina (grupo V), com imunomarcção para colágeno tipo I (400X) (*). 33

Fig. 22. Fotomicrografia do íleo de rato controle não irradiado (grupo I), com imunomarcção para α -actina (400X), com identificação das camadas musculares (*). 34

Fig. 23. Fotomicrografia do íleo de rato controle irradiado (grupo II), com imunomarcção para α -actina (400X), com identificação das camadas musculares (*). 34

Fig. 24. Fotomicrografia do íleo de rato irradiado e submetido a suplementação dietética com L-glutamina (grupo III), com imunomarcção para α -actina (400X), com identificação das camadas musculares (*). 35

Fig. 25. Fotomicrografia do íleo de rato irradiado e submetido a suplementação dietética com glicina (grupo IV), com imunomarcção para α -actina (400X), com identificação das camadas musculares (*). 35

Fig. 26. Fotomicrografia do íleo de rato irradiado e submetido a suplementação dietética com L-arginina (grupo V), com imunomarcção para α -actina (400X), com identificação das camadas musculares (*). 36

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

µm – micrômetro

ANOVA – análise de variância

cGy – *centigrays*

cNOS – *Constitutive Nitric Oxide Synthase* (óxido nítrico sintase constitutiva)

DAB – diaminobenzidina

DNA – *deoxyribonucleic acid* (ácido desoxirribonucléico)

DP – desvio padrão

GSH – Glutathione reduzida

HCl – ácido clorídrico

IGF – *Insulin Growth Factor* (fator de crescimento semelhante à insulina)

iNOS – *Inducible Nitric Oxide Synthase* (óxido nítrico sintase indutiva)

L – levógero (ex. L-glutamina)

Max. – máximo

MeV – *megaelectron volt*

mín, – mínimo

NO – *nitric oxide* (óxido nítrico)

PBS – *Phosphate Buffered Solution* (solução tampão de fosfato)

UERJ – Universidade do Estado do Rio de Janeiro

1 – RESUMO

A radioterapia é amplamente empregada no tratamento de tumores abdominais. Entretanto, o seu emprego provoca danos indesejáveis ao tecido sadio, especialmente o intestinal, refletidos por meio de manifestações clínicas e histológicas. Buscando minimizar esses efeitos colaterais, inúmeras alternativas vêm sendo estudadas, dentre elas a suplementação dietética com aminoácidos. O objetivo deste estudo foi determinar o efeito da suplementação dietética com os aminoácidos L-glutamina, L-arginina e glicina nas camadas submucosa e muscular do íleo de ratos submetidos a irradiação abdominal. Cinquenta ratos *Wistar* machos adultos foram distribuídos aleatoriamente em cinco grupos: I – Controle não irradiado e sem suplementação de aminoácidos; II – Controle irradiado e sem suplementação de aminoácidos; III – irradiado e suplementado com L-glutamina; IV – irradiado e suplementado com glicina; V – irradiado e suplementado com L-arginina. O período de suplementação dietética foi de 14 dias, com a irradiação ocorrendo no 8.º dia do experimento. A irradiação provocou diminuição da espessura da camada submucosa dos animais do grupo II, como também do conteúdo de colágeno, em comparação ao grupo controle não irradiado. A suplementação com L-arginina e glicina provocou aumento expressivo da espessura da camada submucosa, enquanto a suplementação com L-glutamina manteve a espessura dessa camada similar à observada nos animais não irradiados. Os animais com dieta suplementada com L-arginina e glicina também apresentaram aumento da espessura da camada muscular circular interna, em comparação aos ratos dos grupos I, não se observando diferenças no que se refere à camada muscular longitudinal externa. A suplementação com aminoácidos levou a aumento na intensidade de imunomarcção de colágeno tipo I nos animais do grupo IV, menos marcante no grupo III, e o grupo V foi o que mais se

assemelhou ao observado nos animais não-irradiados. No tocante ao colágeno tipo III, a imunomarcção foi mais intensa no grupo IV, menos marcante no grupo V, e no grupo de ratos suplementado com L-glutamina, foi similar à encontrada nos animais não-irradiados. Os resultados sugerem que a suplementação dietética com glicina e L-arginina leva a aumento da quantidade de colágeno na parede ileal de ratos submetidos a radioterapia abdominal, eventualmente predispondo ao surgimento de fibrose intestinal, enquanto que a suplementação com L-glutamina propicia a manutenção da espessura da camada submucosa e pode contribuir para a atenuação dos efeitos colaterais decorrentes da irradiação.

Palavras chaves: L-Glutamina; Glicina; L-Arginina; Radioterapia

2 – ABSTRACT

Radiotherapy is widely employed in the treatment of abdominal tumors. Nevertheless, its use damages healthy tissue, especially intestinal tissue, with consequent clinical and histological manifestations. In order to minimize these side effects, several alternatives are being studied, including dietary supplementation with amino acids. The aim of this study was to determine the effect of dietary supplementation with L-glutamine, L-arginine, and glycine on the submucosal and muscular layers of the ileum of rats submitted to abdominal radiation. Fifty male Wistar rats weighing 255 to 325 g were randomly divided into five groups: I – Control – not irradiated and not supplemented with amino acids; II – Control – irradiated but not supplemented with amino acids; III – irradiated and supplemented with L-glutamine; IV – irradiated and supplemented with glycine; V – irradiated and supplemented with L-arginine. The period of dietary supplementation lasted 14 days, with radiation taking place on the 8th day of the experiment. Radiation determined a decrease in the thickness and in the collagen content of the submucosal layer in group II animals compared to the non-irradiated group. Supplementation with L-arginine and glycine induced a marked increase in the thickness of the submucosal layer, while supplementation with L-glutamine caused no changes compared to non-irradiated animals. The animals receiving a diet supplemented with L-arginine and glycine also showed increased thickness of the internal circular muscle layer compared to group I rats, with no difference in the external longitudinal muscle layer. Supplementation with amino acids led to increased immunostaining of type 1 collagen in group IV animals, with less intense staining in group III and no difference in group V compared to non-irradiated animals. Regarding type III collagen, immunostaining was more intense in group IV and less intense in group V, while in rats

supplemented with L-glutamine there was no difference compared to non-irradiated animals. These results suggest that dietary supplementation with glycine and L-arginine induces an increase in the collagen content of the ileal wall of rats submitted to abdominal radiotherapy, eventually predisposing it to intestinal fibrosis, while supplementation with L-glutamine favors the maintenance of the submucosal layer thickness and can contribute to attenuating the side effects of radiation.

3 – INTRODUÇÃO

A radioterapia abdomino-pélvica é um importante aspecto da terapêutica multimodal de diversos tipos de câncer, como os de reto, cólon, bexiga, próstata, colo uterino, ovário e endométrio.^[1,2] Entretanto, a doença intestinal aguda induzida pela irradiação se constitui em um problema constante e de grande relevância, haja vista que, muitas vezes, determina a interrupção do tratamento.^[3]

O intuito da radioterapia é utilizar dose capaz de afetar o tumor e resguardar, na medida do possível, os tecidos normais adjacentes, pelos quais ocorrerá a regeneração da área irradiada.^[4-6] Ela pode provocar alterações celulares por meio de dois mecanismos: por ação direta, na qual a radiação interage diretamente com o ácido desoxirribonucléico – DNA –, produzindo alterações de ionização e quebra de fitas simples e duplas que levam à completa disfunção molecular; ou por ação indireta, quando a radiação interage com a água e o oxigênio intracelulares, produzindo radicais livres que se ionizam, quebram ligações químicas vitais do DNA e iniciam a cascata de eventos que determina a ocorrência de morte ou danos celulares.^[5]

Embora a radiação ionizante afete órgãos intra-abdominais, como fígado, rim e medula óssea, o órgão mais radiosensível é o intestino delgado,^[7-9] uma vez que os efeitos da irradiação são mais intensos em tecidos que sofrem rápida replicação celular.^[10] Pia de La Maza & Gotteland (2001) referem que o íleo terminal, o sigmóide e o reto são os locais que mais freqüentemente apresentam danos, enquanto o jejuno e íleo proximal raramente são envolvidos.^[11]

Histologicamente, a enteropatia aguda induzida pela irradiação da pelve ou do abdome é resultado da quebra da barreira intestinal e da inflamação da camada mucosa,^[12] manifestando-se clinicamente por

apresentação aguda de náuseas, vômitos, diarreia e dor abdominal.^[13] Estes sintomas, geralmente, perduram por poucas semanas após o tratamento, e então desaparecem.^[2]

Contrariamente, a enteropatia crônica, que pode manifestar-se clinicamente somente muitos anos após a radioterapia, é caracterizada por esclerose vascular e fibrose progressiva da parede intestinal. Acredita-se que a lesão microvascular possa ser o fator chave na patogênese da fibrose por irradiação em muitos órgãos, incluindo o intestino.^[12] Nele, as células musculares lisas são as produtoras predominantes de colágeno em muitos estados patológicos, incluindo a enteropatia por irradiação, que provoca um aumento marcante na taxa de proliferação das células musculares lisas, habitualmente baixa, e induz intensamente suas expressões de colágenos tipos I e III.^[14]

Uma dose de 1.100 cGy de raio-X no abdome é capaz de aumentar significativamente os escores de inflamação e vascularidade intestinal, ocasionando também um decréscimo no número e na altura de células mucosas.^[10] Stevens *et al.* (1978) mostraram que pacientes submetidos a irradiação pré-operatória evoluíram com menor recorrência de tumores pélvicos e na anastomose, mas apresentaram elevada incidência de complicações, como ruptura de anastomose e subseqüentes aderências e obstrução intestinal.^[15]

A enteropatia pela irradiação se constitui em um importante obstáculo na terapia da cura do câncer. Por esta razão, o desenvolvimento de métodos seguros e eficazes para proteger o intestino da toxicidade à irradiação tem sido foco de estudos, tanto clínicos quanto experimentais, há longo tempo. Algumas das estratégias que têm mostrado efeitos enteroprotetores incluem a utilização de hormônios peptídeos tróficos, fatores de crescimento ou aminoácidos, citocinas ou antagonistas de citocinas, sucralfato, prostaglandinas, dietas elementares, compostos

sulfidrílicos, antioxidantes e imunomoduladores.^[14] Alguns aminoácidos, como a L-glutamina, a glicina e a L-arginina, têm sido utilizados com a finalidade de minimizar as alterações agudas ou crônicas ocasionadas pela radioterapia e também melhorar o prognóstico dos pacientes submetidos a procedimentos cirúrgicos sobre o intestino após o uso da radioterapia como terapia neo-adjuvante.

A L-glutamina é um aminoácido não essencial, amplamente distribuído no organismo, que pode comportar-se como aminoácido essencial em determinadas situações clínicas que aumentam a sua demanda,^[16] por provocar um incremento no catabolismo,^[17] como no trauma, grandes procedimentos cirúrgicos, sepse, transplante de medula óssea e químio e radioterapia.^[18] Nestas situações, a concentração de glutamina intracelular diminui e, assim, o suprimento corporal desse aminoácido torna-se rapidamente depletado, podendo contribuir para a ocorrência de atrofia da mucosa intestinal.^[19] Diversos estudos mostram que a suplementação de L-glutamina pode ser efetiva na prevenção tanto da atrofia da mucosa quanto de outros danos que podem advir da irradiação no intestino delgado.^[20-22]

Constitui-se no aminoácido mais abundante no plasma e no músculo esquelético, onde se encontram cerca de 80% da glutamina corporal.^[23] Células de replicação rápida, como linfócitos, enterócitos^[17,24] e células particularmente envolvidas com o processo de cicatrização, como os fibroblastos,^[25] consomem L-glutamina como combustível preferencial durante estados de estresse e também durante a síntese de ácido nucléico.^[26] Além disso, constitui-se no substrato preponderante para a amoniogênese, uma vez que libera íon amônia que se combina com íon hidrogênio e é excretado na urina, exercendo, assim, importante papel na regulação da homeostase ácido-básica.^[27] Adicionalmente, este aminoácido

atua como condutor de nitrogênio e carbono entre os órgãos, sendo também um precursor de nucleotídeos e de glicose.^[28]

Conquanto a apoptose de células epiteliais induzida por estresse oxidativo e por citocinas se constitua em um importante regulador do *turnover* fisiológico do intestino, a apoptose aumentada pode inibir a recuperação da mucosa durante estados patológicos.^[29] A glutamina, além de ser um importante combustível metabólico para células epiteliais intestinais, é também um precursor para o antioxidante glutathiona (GSH), que exerce um efeito anti-apoptótico, tanto durante eventos espontâneos quanto em eventos induzidos,^[29] e em lesões de isquemia/reperfusão.^[30] Este antioxidante é sintetizado principalmente no intestino,^[31,32] mas a diminuição da concentração de glutamina, em presença de estresse oxidativo, torna-se um fator limitante para a sua síntese.^[32]

Outro nutriente que vem recebendo grande atenção da comunidade científica é a L-arginina (ácido 2-amino-5-guanidinovalérico), primeiramente isolado em 1886,^[33] e após estudos extensos recebeu a classificação inicial de dispensável (não-essencial) para humanos^[34] e para ratos adultos^[33] saudáveis. Entretanto, atualmente, ele é classificado como aminoácido semi-essencial ou condicionalmente essencial, haja vista que a despeito do organismo apresentar habilidade para sintetizar quantidade suficiente para as suas necessidades habituais,^[35,36] em situações de estresse, como no trauma e na sepse, a sua disponibilidade encontra-se reduzida, devendo ser considerado como essencial.^[37-40]

A síntese endógena de arginina varia conforme a espécie, estado nutricional e estágio de desenvolvimento.^[33] Ela pode ser sintetizada a partir de vários substratos, como citrulina, ornitina, prolina, glutamina, glutamato, argininosuccinato e aspartato.^[33] Assim, também seria de se esperar que várias enzimas estivessem envolvidas na sua síntese e presentes em diversos tipos celulares.^[41,42] Todas as enzimas que sintetizam arginina

estão presentes nos enterócitos da maioria dos mamíferos, provavelmente com exceção de gatos e furões.^[33] Muitas das funções da arginina são geradas pela ação de moléculas derivadas de seu metabolismo e não da sua ação isolada. Em células animais, ela atua como precursora fisiológica para a síntese de importantes moléculas, como o óxido nítrico (NO), creatina e poliaminas,^[43] uréia, prolina, agmatina e glutamato,^[33] que, por diferentes vias metabólicas, desempenham inúmeras funções em mecanismos de inflamação, cicatrização ou reparo tissular, fibrose e síntese protéica, além de agir na motilidade intestinal e detoxificação da amônia.^[44]

Além dos papéis já citados, a arginina também participa na regulação do metabolismo protéico, lipídico e glicídico,^[45] uma vez que induz a liberação de diversos hormônios, como somatotropina, prolactina e insulina.^[35,46] Estimula, ainda, a produção do fator de crescimento semelhante à insulina (IGF – *Insulin Growth Factor*) e a liberação, também, de forma antagônica, de hormônios anti-insulinêmicos, como glucagon, somatostatina, polipeptídeos pancreáticos e catecolaminas.^[35]

A glicina deixou de ser um aminoácido coadjuvante em estudos experimentais e vem ganhando crescente interesse dos pesquisadores. Trata-se do menor aminoácido, consistindo de uma molécula de carbono atada a um grupo amino e um grupo carboxila.^[47] É um aminoácido neutro e não-essencial, sendo que as suas funções estão relacionadas ao seu tamanho e à ausência de radicais acoplados à sua molécula. Estes atributos permitem que ela desempenhe um papel chave na estrutura de certas proteínas e em agir em várias posições, como um modificador biológico.^[48] Resíduos de glicina podem ser acomodados no interior hidrofóbico de proteínas, o que permite flexibilidade nas dobras de proteínas com propensão a formar hélices, como o colágeno,^[48] cuja seqüência de aminoácidos é caracteristicamente reconhecida por possuir este aminoácido repetido a cada terceira posição da seqüência, e esta repetição ocorre em

todos os colágenos, ou seja, um terço da molécula de colágeno é composto por glicina.^[49]

Ela é conhecida por possuir inúmeras funções fisiológicas, como neurotransmissão no sistema nervoso central, uma vez que as células nervosas possuem receptores específicos para este aminoácido.^[50] Receptores de glicina também existem em uma ampla variedade de locais ^[51-54] em células parenquimatosas hepáticas, em que atenua a lesão isquêmica em fígados transplantados;^[55] em células do túbulo proximal dos rins, atuando contra várias substâncias citotóxicas;^[56] no intestino delgado ^[57] ela propicia a viabilidade e a motilidade da mucosa após lesão de isquemia e reperfusão mesentéricas.^[58,59] Nesta situação, os benefícios da glicina correlacionam-se com a redução da apoptose na mucosa intestinal.^[57] Células envolvidas em respostas inflamatórias e imunes, tais como macrófagos, monócitos, neutrófilos e linfócitos T, também, possuem receptores de glicina ^[60-64] que vão mediar a inibição, por meio deste aminoácido, da formação de citocinas que desempenham um importante papel na progressão do processo inflamatório.^[65] A glicina inibe a ativação da fosfolipase A₂, causada por hipóxia, e a prevenção da degradação do fosfolípido pela inibição desta enzima pode contribuir para a manutenção da integridade da membrana celular.^[66] Além de atuar como neurotransmissor e doador de um carbono é precursora para a formação de numerosos compostos, tais como: purinas, porfirinas, creatina e glutatona.^[67] Entretanto, os mecanismos, pelos quais a glicina protege o organismo permanecem incompletamente compreendidos, sendo propostos a supressão da sinalização do cálcio, a inibição da ativação da célula inflamatória, o decréscimo na formação de radicais livres e outros mediadores tóxicos, e o bloqueio da permeabilidade da membrana plasmática.^[47]

O papel dos aminoácidos L-glutamina, L-arginina e glicina na proteção ao desenvolvimento da enterite actínica aguda no intestino delgado irradiado, mais especificamente de sua camada mucosa, vem sendo demonstrado por inúmeros autores.^[4,7,20,68-70] Contudo, os dados acerca de sua atuação em outras camadas da parede intestinal ainda são muito limitados.

4 – OBJETIVOS

4.1 – Objetivo Geral

Determinar o efeito da suplementação dietética com os aminoácidos L-glutamina, L-arginina e glicina nas camadas submucosa e muscular do íleo de ratos submetidos à irradiação abdominal.

4.2 – Objetivos Específicos

Avaliar se a suplementação com L-glutamina, L-arginina e glicina interfere no ritmo de ganho ponderal e na ingestão de água e de ração de ratos submetidos à irradiação abdominal.

Comparar a eficácia da suplementação dos aminoácidos L-glutamina, L-arginina e glicina na preservação da integridade das camadas submucosa e muscular da parede ileal de ratos submetidos à irradiação abdominal.

5 – MÉTODO

Utilizou-se um modelo experimental com ratos *Wistar* machos adultos submetidos à irradiação abdominal e a suplementação nutricional com os aminoácidos L-glutamina, L-arginina e glicina. Por meio de análise morfométrica de segmento do intestino delgado (íleo), foram avaliadas as espessuras das camadas submucosa, muscular circular interna e muscular longitudinal externa. A coloração Vermelho de Picro Sirius foi utilizada para a observação das fibras colágenas, e a imunohistoquímica, para a identificação das camadas musculares e para a diferenciação das fibras de colágeno tipos I e III.

Os procedimentos cirúrgicos e o acompanhamento dos animais foram realizados no Laboratório de Cirurgia Experimental da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ); a irradiação dos animais foi realizada no Setor de Radioterapia do Centro Universitário de Controle do Câncer do Hospital Universitário Pedro Ernesto – UERJ; e a preparação e a coloração das lâminas para estudo imunohistoquímico bem como a análise morfométrica, foram realizadas no Departamento de Anatomia Humana do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ.

5.1 – Animais e Grupos

Foram utilizados 50 ratos *Wistar* machos adultos (*Rattus norvegicus*), com peso inicial entre 255 e 325 gramas. Esses animais foram distribuídos, aleatoriamente, em cinco grupos de estudo, cada um com dez animais:

I – grupo controle – animais não submetidos a irradiação abdominal e sem suplementação nutricional de aminoácidos;

II – grupo controle irradiado – animais submetidos a irradiação abdominal e sem suplementação nutricional de aminoácidos;

III – animais submetidos a irradiação abdominal e a suplementação de L-glutamina durante todo o período da experimentação;

IV – animais submetidos a irradiação abdominal e a suplementação de glicina durante todo o período da experimentação;

V – animais submetidos a irradiação abdominal e a suplementação de L-arginina durante todo o período da experimentação.

Os animais do grupo I, utilizados para a caracterização da parede intestinal normal, foram mantidos em condição-padrão de laboratório, durante os 14 dias do experimento, enquanto os animais dos grupos II, III, IV e V foram submetidos à irradiação abdominal no 8º dia da experimentação. Os animais dos grupos III, IV e V receberam suplementação nutricional de L-glutamina, glicina e L-arginina, respectivamente, durante os 14 dias do experimento. No 15.º dia do experimento, os animais de todos os grupos foram submetidos à laparotomia para ressecção de segmento ileal.

Os ratos foram identificados e alojados em gaiolas com cinco animais cada, em biotério climatizado, com foto-períodos diários de 12 horas, e receberam ração apropriada e água *ad libitum*.

5.2 – Composição da Ração Oferecida

Os animais de todos os grupos receberam a ração comercial Focus[®] (Focus 1722[®] Roedores Ltda.), de acordo com as recomendações do *American Institute of Nutrition Rodents Diets* (1993).^[71] Esta ração é composta de cloreto de sódio (sal comum), milho integral moído (8% de proteína bruta), farelo de soja (47% de proteína bruta), farelo de trigo (14%

de proteína bruta), fosfato bicálcico (19% de fosfato e 23% de cálcio), carbonato de cálcio (39% de cálcio), DL-metionina, L-lisina, HCl (Tab. 1), aditivo antioxidante e premix mineral vitamínico (vitaminas A, E, K, B1, B2, B6 e B12, niacina, ácido pantotênico, ácido fólico, biotina, colina, ferro, zinco, cobre, iodo, manganês, selênio e cobalto). A quantidade exata utilizada dos ingredientes não é fornecida pelo fabricante, somente os seus percentuais máximo ou mínimo.

Tab. 1. Composição da ração oferecida aos animais.

Característica / ingredientes	Percentuais (%)
Umidade (máx.)	13,0
Proteína bruta (mín.)	22,0
Extrato etéreo (mín.)	4,0
Matéria mineral (máx.)	9,0
Matéria fibrosa (máx.)	8,0
Cálcio (máx.)	1,4
Fósforo (mín.)	0,8

máx.. – máximo; mín. – mínimo

5.3 – Irradiação Abdominal

Os animais dos grupos II, III, IV e V foram imobilizados em recipientes plásticos e submetidos a dose única de irradiação, de 1.164 cGy, no 8º dia da experimentação.

A irradiação foi liberada a partir de um acelerador linear de 6 MeV (modelo Clinac 2100[®] – Varian[®]), a uma velocidade de liberação de 240 cGy por minuto, aplicados sobre o abdome, em um campo de 6 x 4 cm, com distância fonte-pele de 100 cm.

A dose de irradiação foi ajustada para 1.164 cGy, a 3 cm da pele (normalização da dose), e liberada no sentido dorsal. Os ratos foram irradiados com o tórax, cabeça e extremidades situando-se fora da área de irradiação.

5.4 – Suplementação de Aminoácidos

Os animais dos grupos III, IV e V receberam suplementação de L-glutamina (Resource Glutamin[®] – Nestlé Nutrition[®]), glicina (Glicina[®] – Vetec Química Fina Ltda.) e L-arginina (Sigma-Aldrich[®]), respectivamente, uma vez ao dia, durante os 14 dias da experimentação, na dose de 0,65 g/kg/dia.

A dose diária dos aminoácidos foi preparada em solução aquosa, em concentração de 4%, perfazendo volume final de 5 ml, e administrada por via intragástrica, em *bolus*, com a utilização de um catéter orogástrico, sempre no mesmo horário.

Os animais dos grupos I (controle não irradiado) e II (controle irradiado, sem suplementação de aminoácidos), receberam 5 ml de água filtrada, por via intragástrica, durante os 14 dias da experimentação, administrada da mesma forma descrita anteriormente, sempre no mesmo horário.

5.5 – Controle de Peso e de Ingestão de Ração e Água

Diariamente, sempre no mesmo horário, os animais foram pesados e as ingestões de água e de ração foram verificadas.

O peso dos animais foi aferido em balança de precisão (modelo AdventureTM – Ohaus[®]). O consumo de ração foi aferido pelo controle do resto-ingestão da ração fornecida. A água foi ofertada em recipientes

graduados em mililitros, sendo o consumo também aferido pelo controle do resto-ingestão.

5.6 – Ressecção dos Segmentos Intestinais

No 15.º dia do experimento, os animais foram submetidos a procedimento cirúrgico, sob anestesia geral com tiopental sódico (Tiopental[®] – Abbott[®]), na dose de 50 mg/kg peso, por via intraperitoneal.

O acesso à cavidade abdominal foi realizado por laparotomia mediana, com cerca de 3 cm de extensão. Após a localização da válvula ileocecal, e a 2 cm anteriores a ela, procedeu-se à ressecção de um segmento de 2 cm de íleo.

Seguiu-se a morte dos animais, por sobredose anestésica (tiopental sódico). Procedeu-se à laparorrafia, em dois planos (peritônio-aponeurótico e pele), com suturas contínuas, utilizando-se fio cirúrgico de polipropileno 2-0 (Prolene[®] – Ethicon[®]).

5.7 – Processamento Histológico

O segmento ileal foi aberto em sentido longitudinal, lavado em soro fisiológico, para retirada de detritos fecais, e distendido sobre cortiça. A fixação foi realizada em solução de formol tamponado a 10%, por um período de 24 horas, sendo o material, em seguida, desidratado em uma série crescente de alcoóis e incluído em parafina (Parafina para Histologia[®] – Merck), de acordo com as normas para análise histológica. Posteriormente, esse material foi cortado, com o auxílio de um micrótomo *Olympus CUT 4060 Retracting*.

Um corte de cada animal foi submetido a coloração de hematoxilina e eosina para a verificação da integridade do material.

Para a quantificação das camadas que formam a parede do íleo, foi utilizada a coloração tricrômico de Masson. Para cada animal, foram corados cinco cortes, com intervalo de 100 μm entre eles. Cada corte apresentava 5 μm de espessura.

Para a observação das fibras de colágeno, utilizou-se a coloração Vermelho de Picro Sirius (*Picro Sirius Red*). Para a caracterização do colágeno, foi utilizada uma lente de polarização acoplada a microscópio óptico biológico Olympus BX 51. As fibras colágenas mais espessas e fortemente birrefringentes apresentam-se, neste método, coradas em vermelho-alaranjado (colágeno tipo I) e as fibras mais finas e dispersas, fracamente birrefringentes, apresentam coloração esverdeada (colágeno tipo III)^[72].

Para a realização da imunohistoquímica, foram utilizadas lâminas silanizadas para uma melhor fixação do tecido. Foram utilizados os seguintes anticorpos: anti- α -actina (Invitrogen[®] – mouse anti-actin 0,016mg/l 08-0106) para a observação de miofibroblastos e caracterização da presença do tecido muscular, e anti-colágeno tipos I e III (ABCAM ab6308-100[®] e ABCAM ab6310-100[®]) para a observação das respectivas fibras.

Os cortes foram desparafinados em banhos de xilol, desidratados em seqüência decrescente de álcool, lavadas em solução tampão de fosfato (PBS[®] – *Phosphate Buffered Solution*). Em seguida, passaram pela etapa de reativação antigênica em dois banhos de tampão citrato de sódio, um em aquecimento e outro em temperatura ambiente. Subseqüentemente, os cortes foram submetidos ao bloqueio da peroxidase endógena e incubadas em câmara úmida com o reagente A (Invitrogen[®]) para o bloqueio dos sítios antigênicos. Após o bloqueio, foi colocado o anticorpo primário, permanecendo os cortes em câmara úmida. O tempo de incubação no anticorpo primário variou de acordo com o anticorpo: a anti- α -actina

permaneceu duas horas à temperatura ambiente e os dois tipos de colágeno permaneceram *overnight* à temperatura de 4° C. Em seguida, os cortes foram incubados nos reagentes B (anticorpo secundário) e C (streptavidina) que representam o anticorpo secundário e o soro de cabra, respectivamente. Entre as incubações com esses reagentes, também foram realizadas lavagens dos cortes em PBS. Após a última lavagem, os cortes foram reveladas ao abrigo da luz, com o uso de diaminobenzidina (DAB). Após a revelação, os cortes foram lavados em água destilada e mergulhados em hematoxilina de Harris para a coloração das outras regiões do tecido. Em seguida, os cortes foram desidratados em banhos crescentes de álcool e preparação para a montagem de lâminas em resina (Entellan[®]) para observação em microscópio de luz.

5.8 – Análise Morfométrica

Os cortes histológicos foram analisados em sistema de microscópio computadorizado, composto por microscópio óptico biológico Olympus BX51, dotado de objetivas planas acromáticas. A ocular foi acoplada a uma câmera de vídeo Olympus DP70, que transmitia as imagens a um microcomputador, com exibição das imagens em um monitor de 22 polegadas, com *dot pitch* 0,23. Para a mensuração das espessuras de cada lâmina foram selecionados aleatoriamente quatro campos com aumento final de 400X e suas imagens automaticamente transferidas para o programa Image Pro[®] instalado em um microcomputador com resolução de 2040 x 1536 pixels e quantificadas com o auxílio do programa Image J[®]. Nesta etapa, para cada espessura das camadas, foram realizadas oito medidas para cada campo fotografado, para posterior obtenção das médias destas medidas.

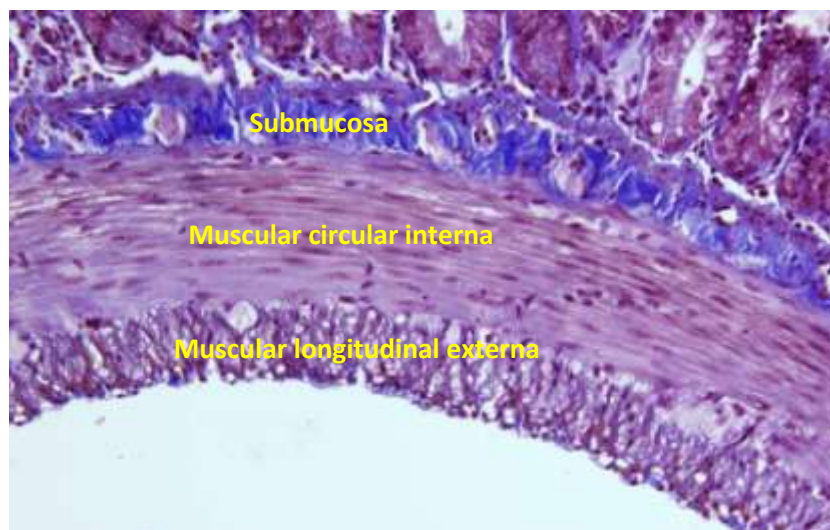


Fig. 1 – Fotomicrografia de íleo de rato saudável com a coloração tricrômico de Masson (400X).

Sob aumento de 400X e resolução de 2040 x 1536 pixels, foram obtidas imagens para a qualificação da α -actina do músculo liso pela imunohistoquímica e do colágeno pelo método de Vermelho de Picro Sirius. Para a obtenção das imagens dos colágenos tipos I e III pela imunohistoquímica, também foram utilizados os aumentos de 400X e resolução de 2040 x 1536 pixels.

5.9 – Análise Estatística

As análises estatísticas realizadas visaram a comparação do grau de manutenção das características estruturais das camadas submucosa, muscular circular interna e muscular longitudinal externa do íleo dos ratos.

A comparação dos grupos de animais, considerando as variáveis acima citadas, bem como a variação do peso e ingestão de água e ração foram realizadas por meio da Análise de Variância (ANOVA) e do pós-teste de Tukey.

As análises foram realizadas com a utilização do programa estatístico GraphPad Prism 4[®] – 2003. Em todas as análises, um valor de $p \leq 0,05$ foi

estabelecido para a rejeição da hipótese nula de similaridade entre os grupos de animais.

5.10 – Aspectos Éticos no Cuidado com os Animais

O projeto desta pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Todos os procedimentos seguiram, rigorosamente, a regulamentação existente sobre experimentação com animais.^[73,74]

6 – RESULTADOS

6.1 – Evolução dos Animais

Após a irradiação abdominal, quatro animais evoluíram para óbito, dois do grupo IV (submetidos a irradiação e a suplementação dietética com glicina) e dois do grupo V (irradiado e suplementado com L-arginina).

6.1.1 – Peso dos Animais

No primeiro dia do experimento (D0), os animais de todos os grupos não apresentaram diferença significativa quanto aos seus pesos ($p=0,0530$) (Tab. 2 e Fig. 2A). Nos sete dias que antecederam a irradiação abdominal, todos os grupos de animais apresentaram percentual de ganho ponderal semelhante ($p=0,1733$). (Fig. 2B)

Entretanto, no período após a irradiação, os animais dos grupos II (submetidos a irradiação sem suplementação de aminoácidos), IV e V apresentaram perda ponderal significativa quando comparados aos dos grupos I (controle não irradiado e sem suplementação) e III (submetidos a irradiação e a suplementação com L-glutamina) ($p<0,001$ para os grupos II, IV e V, em relação ao grupo controle; $p<0,01$ para os grupos II e IV e $p<0,001$ para o grupo V em relação ao grupo III). Não foi observada diferença no percentual de alteração do peso nos animais do grupo III em relação ao controle ($p>0,05$). (Fig. 2C).

6.1.2 – Ingestão de Ração

Nos sete dias que antecederam a irradiação abdominal, os animais do grupo IV ingeriram quantidade significativamente menor de ração, em

comparação aos ratos dos demais grupos ($p < 0,05$ em relação aos animais dos grupos I e III; $p < 0,001$ em relação aos do grupo II; e $p < 0,01$ em relação aos do grupo V). (Tab. 3 e Fig. 3A)

Tab. 2. Análise descritiva do peso corporal inicial e final nos diversos grupos de animais.

Grupos	N inicial	Peso inicial (g) *	N final	Peso final (g) *	Diferença (g) *
I	10	299,2 ± 17,7	10	309,7 ± 19,8	10,6 ± 4,31
II	10	299,2 ± 12,9	10	276,7 ± 17,7	-22,5 ± 12,9
III	10	288,9 ± 17,7	10	290,0 ± 13,6	2,4 ± 6,7
IV	10	288,2 ± 6,9	8	271,4 ± 12,2	-16,7 ± 10,4
V	10	304,9 ± 19,3	8	286,3 ± 20,1	-16,5 ± 14,3

n - número de animais

*valores expressos em média ± desvio padrão

Entretanto, após a irradiação, todos os animais dos grupos submetidos a irradiação e a suplementação dietética com algum aminoácido ou submetidos a irradiação sem suplementação, ingeriram menor quantidade de ração em comparação ao grupo controle ($p < 0,001$ pra todos). Os ratos irradiados e suplementados com glicina, da mesma maneira que no período pré-irradiação, ingeriram significativamente menos ração em comparação aos animais dos demais grupos, inclusive em relação ao grupo II, que não recebeu nenhuma suplementação de aminoácido ($p < 0,001$ em relação aos animais dos grupos II, III e IV, e $p < 0,01$ em relação aos do grupo V). (Tab. 3 e Fig. 3B)

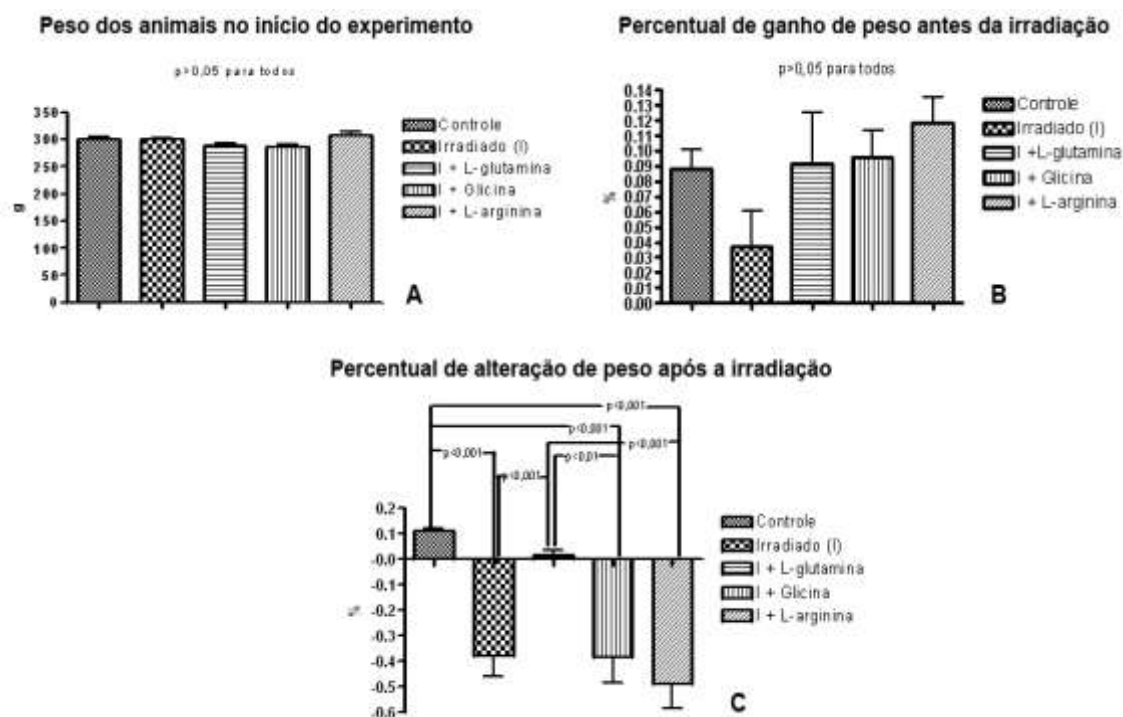


Fig. 2. Peso dos animais no início do experimento e percentual de ganho ou alteração de peso nos diversos grupos do estudo.

Tab. 3. Análise descritiva da ingestão de ração, antes e após a irradiação.

Grupos	N inicial	Ingestão diária pré-irradiação (g) *	Final	Ingestão diária pós-irradiação (g) *
I	10	22,8 ± 6,2	10	22,0 ± 1,5
II	10	24,8 ± 8,6	10	10,0 ± 5,7
III	10	23,2 ± 6,6	10	18,5 ± 2,5
IV	10	21,0 ± 3,3	8	6,4 ± 7,0
V	10	24,4 ± 3,6	8	11,5 ± 5,4

n - número de animais

*valores expressos em média ± desvio padrão

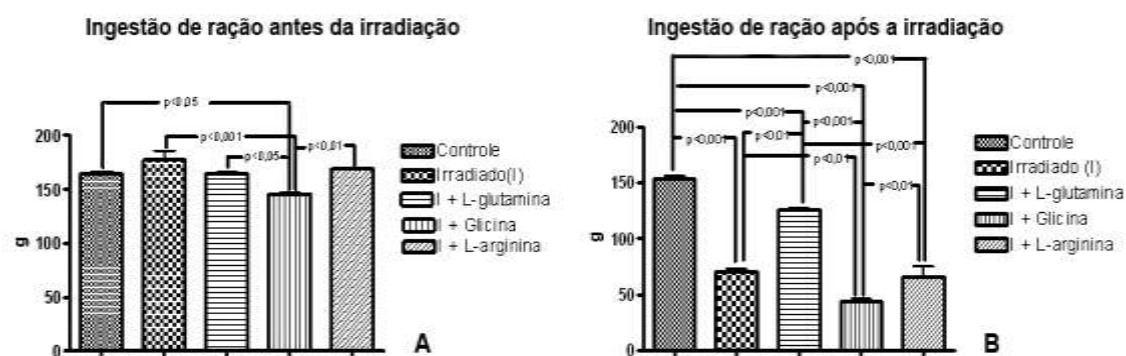


Fig. 3. Ingestão de ração dos animais dos diversos grupos de estudo, antes e após a irradiação abdominal.

Em contraposição, os ratos do grupo III, apesar de terem ingerido menor quantidade de ração quando comparados aos do grupo controle ($p < 0,001$), ingeriram significativamente mais ração dos que os animais dos grupos II, IV e V. (Tab. 3 e Fig. 3B)

Os animais irradiados e suplementados com L-arginina comportaram-se de maneira semelhante ao do grupo irradiado que não recebeu suplementação de aminoácidos ($p > 0,05$). (Tab. 3 e Fig. 3B)

6.1.3 – Ingestão de Água

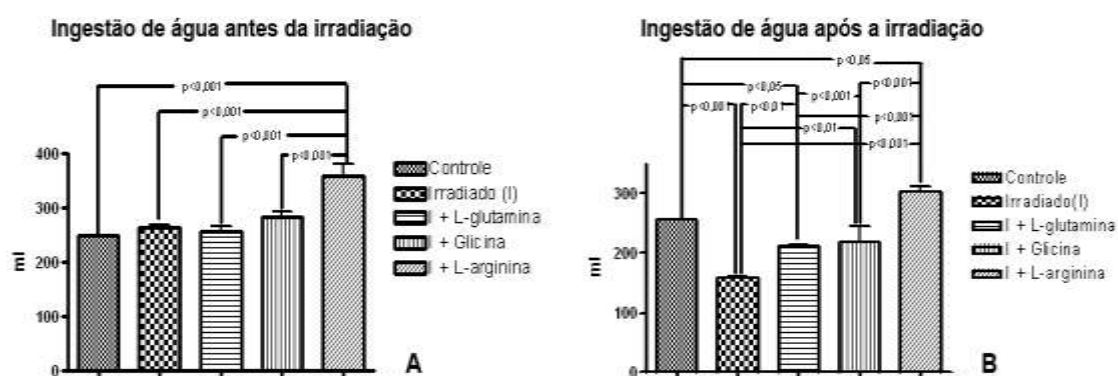
Nos sete dias que antecederam a irradiação abdominal, não houve diferença entre os grupos de animais no que se refere à ingestão de água, exceto pelo grupo suplementado com L-arginina (grupo V) que, quando comparado aos demais, apresentou ingestão significativamente superior ($p < 0,001$). (Tab. 4 e Fig. 4A)

Tab. 4. Análise descritiva da ingestão de água, antes e após a irradiação.

Grupos	n inicial	Ingestão diária pré-irradiação (ml) *	n final	Ingestão diária pós-irradiação (ml) *
I	10	34,8 ± 6,1	10	36,5 ± 3,7
II	10	36,3 ± 5,5	10	22,6 ± 10,8
III	10	35,9 ± 6,9	10	30,1 ± 4,9
IV	10	41,4 ± 11,1	8	28,9 ± 20,8
V	10	52,7 ± 13,9	8	45,3 ± 21,2

n - número de animais

*valores expressos em média ± desvio padrão

**Fig. 4. Ingestão de água nos animais dos diversos grupos de estudo, antes e após a irradiação abdominal.**

Após a irradiação, os animais dos grupos II e III ingeriram quantidade significativamente menor de água que os animais do grupo I ($p < 0,001$ e $p < 0,05$ respectivamente), diferentemente do que se observou em relação aos ratos do grupo IV ($p > 0,05$). Entretanto, os animais do grupo V apresentaram ingestão de água significativamente maior que os do grupo controle ($p < 0,05$). (Tab. 4 e Fig. 4B)

No período pós-irradiação, os animais submetidos a irradiação abdominal e que não receberam suplementação de aminoácidos (grupo II) apresentaram ingestão de água significativamente menor quando comparados aos ratos dos grupos irradiados e que receberam

suplementação de aminoácidos (grupos III, IV e V) ($p < 0,01$ em relação aos animais dos grupos III e IV, e $p < 0,001$ em relação aos do grupo V). Porém, dentre os ratos suplementados com aminoácidos, aqueles que receberam L-arginina (grupo V), apresentaram ingestão significativamente maior de água do que os que receberam L-glutamina (grupo III) ou glicina (grupo IV) ($p < 0,001$ para todos). (Tab. 4 e Fig. 4B)

6.2 – Análise Morfométrica

6.2.1 – Camada Submucosa do Íleo

Os animais do grupo II (submetidos a irradiação abdominal e sem suplementação de aminoácidos) apresentaram espessura da camada submucosa do íleo significativamente menor que os ratos de todos os demais grupos ($p < 0,01$ em relação aos do grupo I e $p < 0,001$ em relação aos dos grupos III, IV e V).

Os animais irradiados que receberam suplementação de glicina (grupo IV) e L-arginina (grupo V) apresentaram espessura da camada submucosa significativamente maior em relação aos do grupo I ($p < 0,001$ e $p < 0,05$; respectivamente), o que não se observou nos animais do grupo III (submetidos a irradiação abdominal e suplementação de L-glutamina) que mantiveram espessura da submucosa semelhante à observada no grupo controle não-irradiado ($p > 0,05$).

Adicionalmente, os animais suplementados com glicina apresentaram espessura da camada submucosa significativamente maior que os suplementados com L-glutamina ($p < 0,01$) que mantiveram a espessura dessa camada em nível similar ao observado no grupo controle não-irradiado ($p > 0,05$). (Tab. 5 e Fig. 5)

Tab. 5. Análise descritiva da espessura da submucosa nos grupos de animais.

Grupos	N	Submucosa (mm) *
I	10	22,68 ± 2,34
II	10	17,35 ± 2,04
III	10	23,92 ± 3,00
IV	8	29,90 ± 4,15
V	8	26,58 ± 12,80

N - número de animais

*valores expressos em média ± desvio padrão

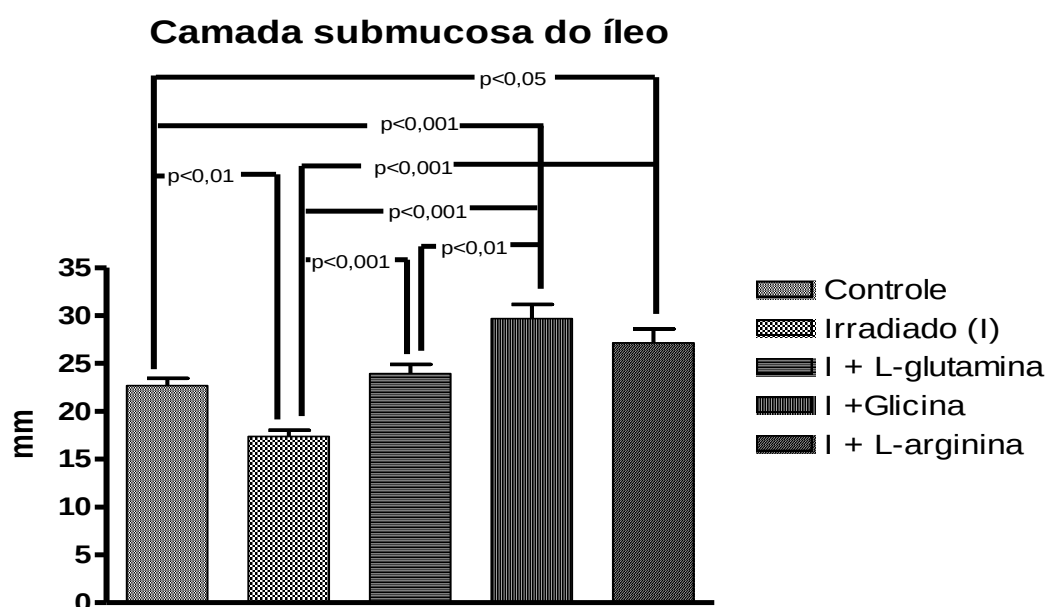


Fig. 5. Espessura da submucosa do íleo dos animais nos diversos grupos de estudo.

6.2.2 – Camada Muscular do Íleo

As espessuras da camada muscular circular interna do íleo dos animais dos grupos controle (I), irradiado sem suplementação de aminoácidos (II) e irradiado com suplementação de L-glutamina (III) não apresentaram diferenças entre si ($p>0,05$). Porém, os animais submetidos a irradiação abdominal e a suplementação com glicina (grupo IV) e L-

arginina (grupo V) apresentaram espessura desta camada significativamente maior do que a dos animais do grupo controle não-irradiado ($p < 0,05$ para ambos). (Tab. 6 e Fig. 6A)

Não foi observada diferença na espessura da camada muscular longitudinal externa do íleo dos ratos entre todos os grupos de animais ($p > 0,05$). (Tab. 6 e Fig. 6B).

Tab. 6. Análise descritiva da espessura da camada muscular nos grupos de animais.

Grupos	n	Circular interna (mm) *	Longitudinal externa (mm) *
I	10	51,04 ± 9,61	29,28 ± 6,24
II	10	56,64 ± 13,70	29,91 ± 3,71
III	10	56,90 ± 10,98	36,56 ± 10,07
IV	8	75,58 ± 22,44	38,03 ± 6,16
V	8	85,65 ± 67,89	33,56 ± 14,45

n – número de animais

*valores expressos em média ± desvio padrão

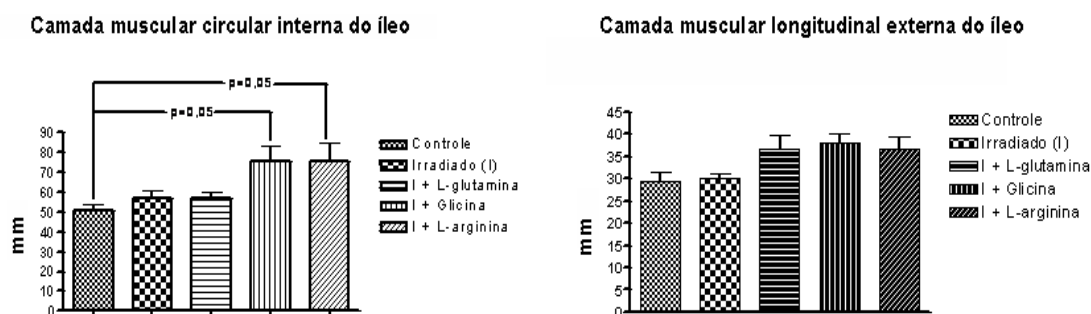


Fig. 6. Espessura das camadas musculares circular interna e longitudinal externa do íleo dos animais nos diversos grupos de estudo.

6.3 – Análise Histológica

6.3.1 – Vermelho de Picro Sirius

Verificou-se, qualitativamente, que em todos os grupos de animais houve predomínio da coloração vermelha, indicando que não existe uma diversidade de tipos de colágeno na camada submucosa do íleo e que, nesse aspecto, a irradiação e a suplementação não influenciaram as fibras colágenas. (Figs. 7 a 11)

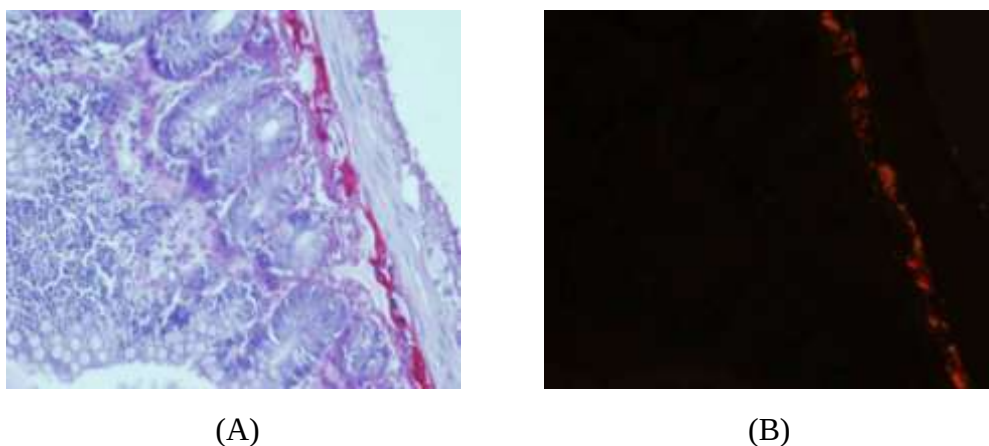


Fig. 7. Fotomicrografias do íleo de rato não irradiado e sem suplementação de aminoácidos (grupo I), sem polarização (A) e sob luz polarizada (B) (400X).

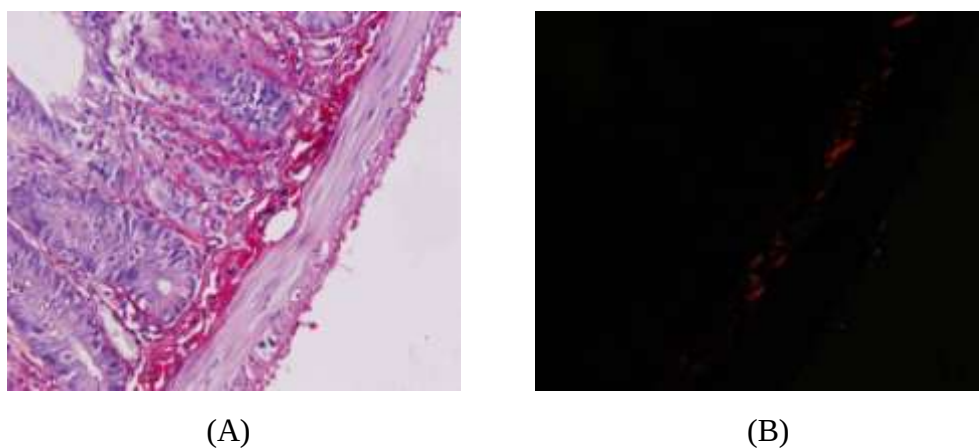


Fig. 8. Fotomicrografias do íleo de rato irradiado e sem suplementação de aminoácidos (grupo II), sem polarização (A) e sob luz polarizada (B) (400X).

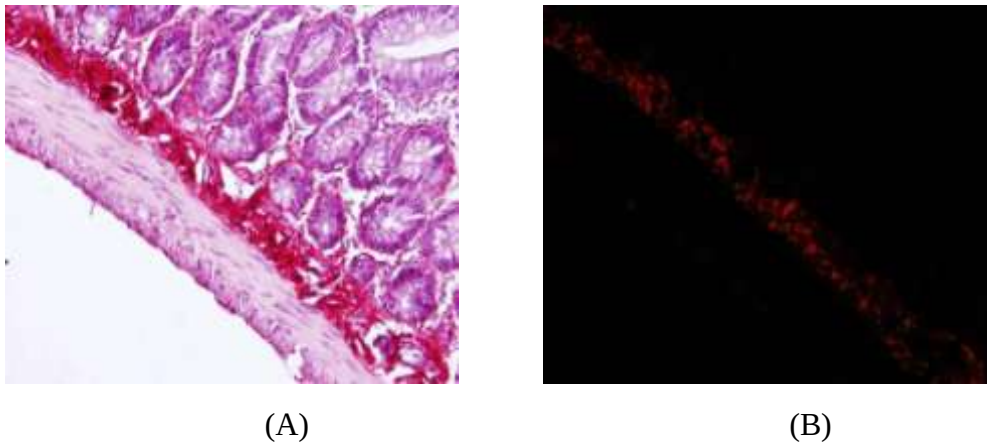


Fig. 9. Fotomicrografias do íleo de rato irradiado e com suplementação de L-glutamina (grupo III), sem polarização (A) e sob luz polarizada (B) (400X).

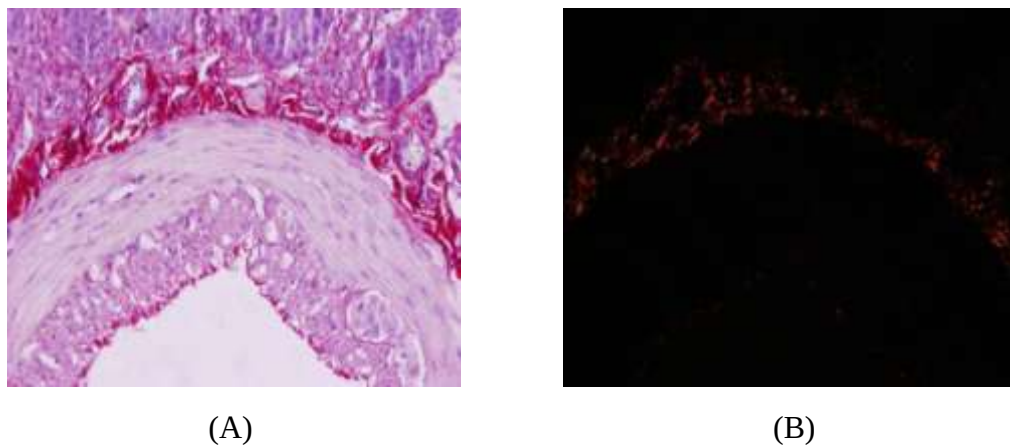


Fig. 10. Fotomicrografias do íleo de rato irradiado e com suplementação de glicina (grupo IV), sem polarização (A) e sob luz polarizada (B) (400X).

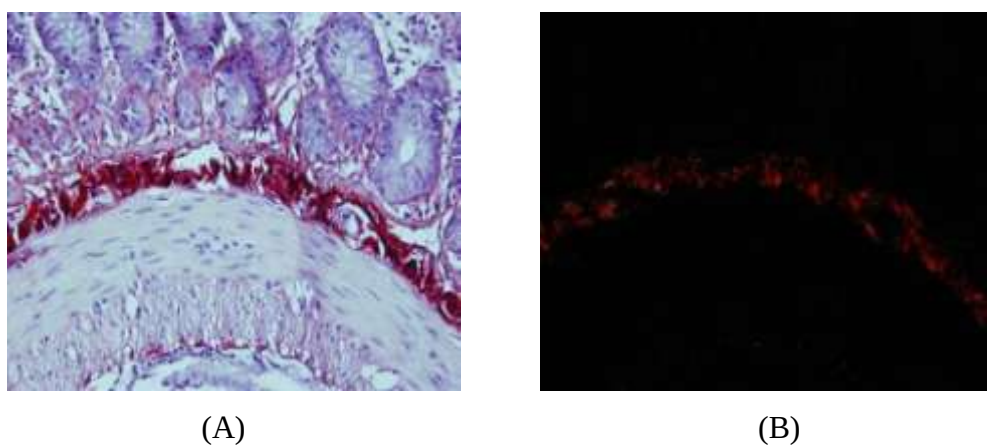


Fig. 11. Fotomicrografias do íleo de rato irradiado e com suplementação de L-arginina (grupo V), sem polarização (A) e sob luz polarizada (B) (400X).

6.3.2 – Imunohistoquímica

6.3.2.1 – Colágenos Tipo I e Tipo III

Qualitativamente, a imunohistoquímica para marcação de colágeno tipo I evidenciou que a intensidade de marcação da camada submucosa foi mais pronunciada nos grupos IV (irradiado e suplementado com glicina) (Fig. 15) e II (irradiado e sem suplementação de aminoácidos) (Fig. 13), porém este último mostrou menor quantidade de colágeno. O grupo V (irradiado e suplementado com L-arginina) (Fig. 16) mostrou uma intensidade de marcação próxima ao grupo I (controle não irradiado) (Fig. 12), enquanto o grupo III (irradiado e suplementado com L-glutamina) (Fig. 14) foi o que mostrou menor intensidade de marcação desse tipo de colágeno.

O grupo V apresentou marcação mais intensa de colágeno tipo I na camada muscular longitudinal externa (Fig. 16), seguido pelos grupos III (Fig. 14), II (Fig. 13), IV (Fig. 15) e I (Fig. 12), sendo este último com intensidade de marcação muito próxima à observada no grupo IV (Fig. 15).

Quando os grupos de animais foram comparados entre si quanto à intensidade da marcação em relação ao colágeno tipo III, o grupo IV (Fig. 20) também mostrou a marcação mais intensa deste tipo de colágeno na camada submucosa, seguido pelos grupos V (Fig. 21), III (Fig. 19) e I (Fig. 17), estes dois últimos muito semelhantes, enquanto o grupo II (Fig. 18) foi o grupo que mostrou marcação menos intensa.

Foi observada também no grupo I (Fig. 17) a marcação mais intensa de colágeno tipo III na camada muscular longitudinal externa, seguido pelo grupo III (Fig. 19) e praticamente nenhuma marcação foi observada nos grupos II (Fig. 18), IV (Fig. 20) e V (Fig. 21). O grupo II (Fig. 18) foi

aquele que mostrou a marcação menos intensa deste tipo de colágeno nas diferentes camadas.

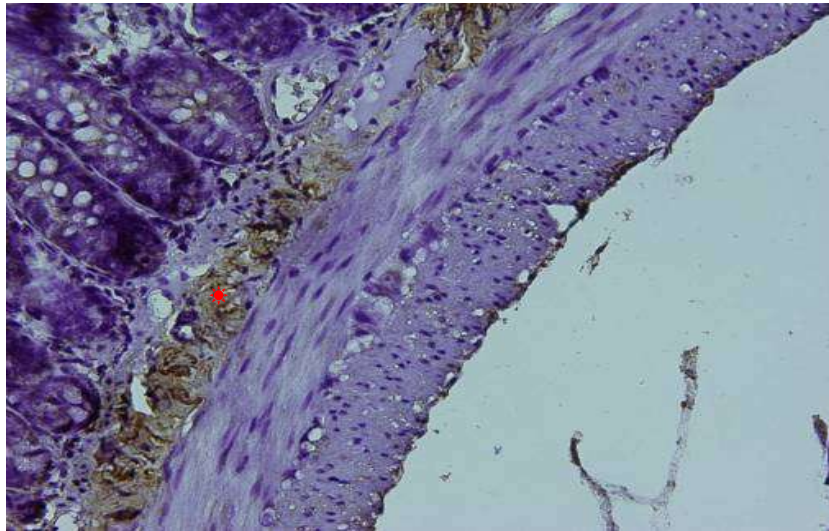


Fig. 12. Fotomicrografia do íleo de rato controle não-irradiado (grupo I), com imunomarcacão para colágeno tipo I (400X) (*).

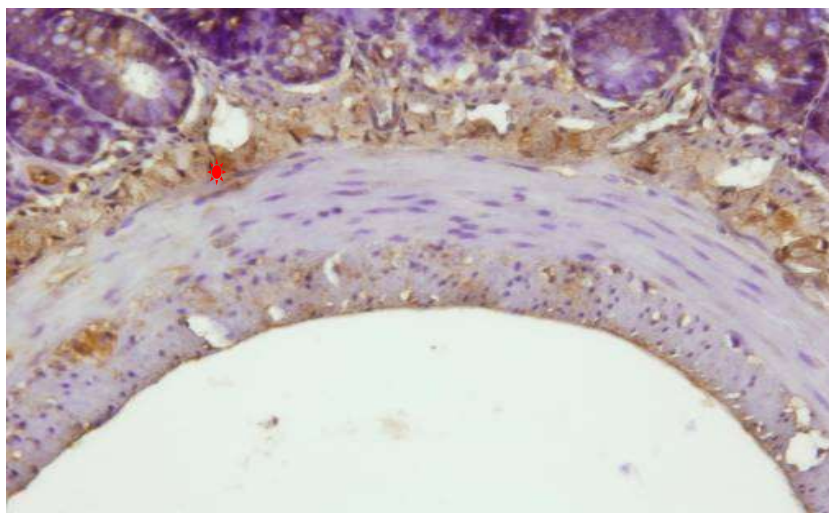


Fig. 13. Fotomicrografia do íleo de rato controle irradiado (grupo II), com imunomarcacão para colágeno tipo I (400X) (*).

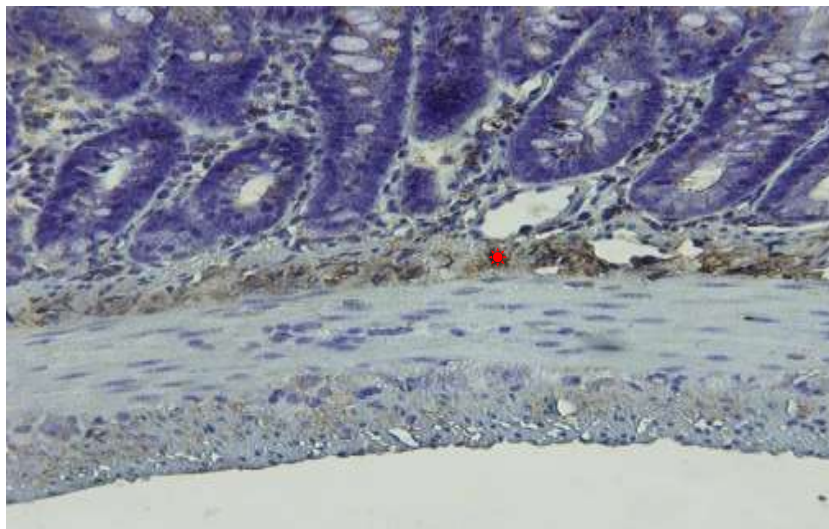


Fig. 14. Fotomicrografia do íleo de rato irradiado e submetido a suplementação dietética com L-glutamina (grupo III), com imunomarcção para colágeno tipo I (400X) (*).

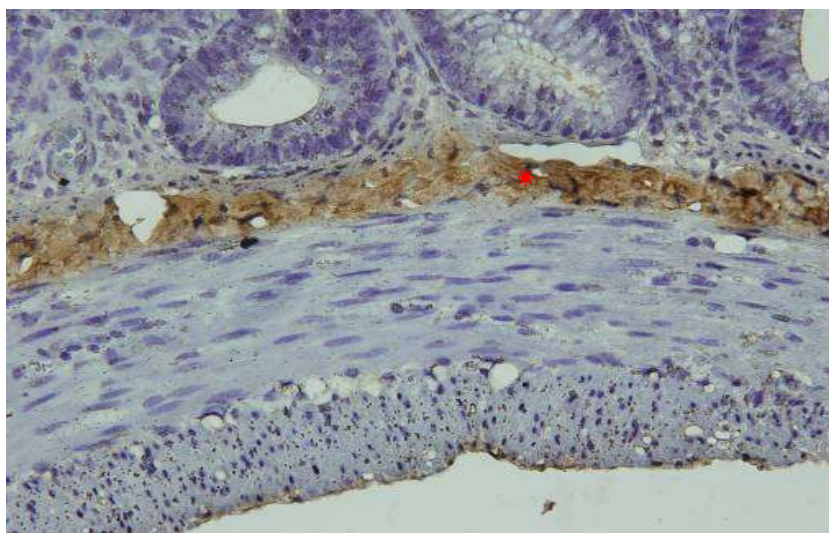


Fig. 15. Fotomicrografia do íleo de rato irradiado e submetido a suplementação dietética com glicina (grupo IV), com imunomarcção para colágeno tipo I (400X) (*).

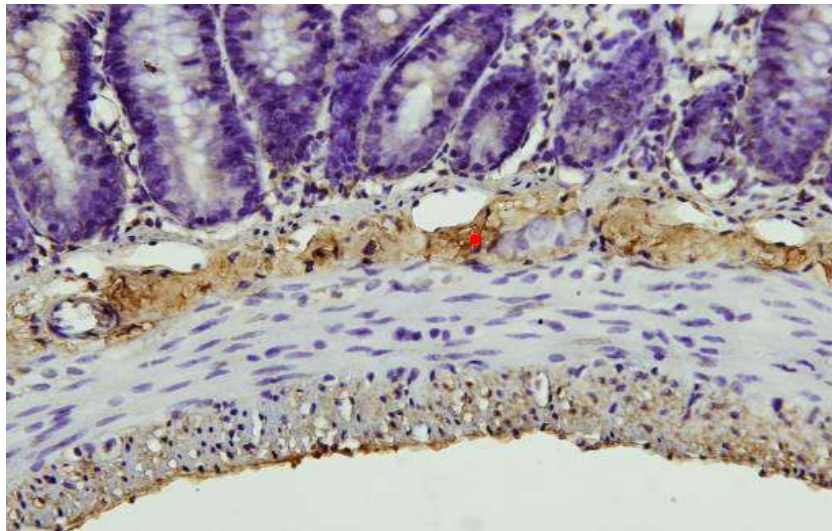
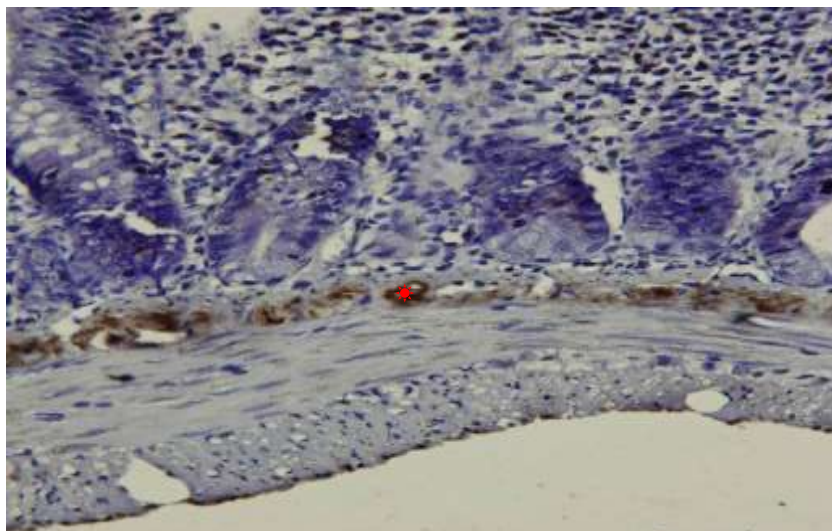


Fig. 16. Fotomicrografia do íleo de rato irradiado e submetido a suplementação dietética com L-arginina (grupo V), com imunomarcção para colágeno tipo I (400X) (*).



17. Fotomicrografia do íleo de rato controle não-irradiado (grupo I), com imunomarcção para colágeno tipo III (400X) (*).

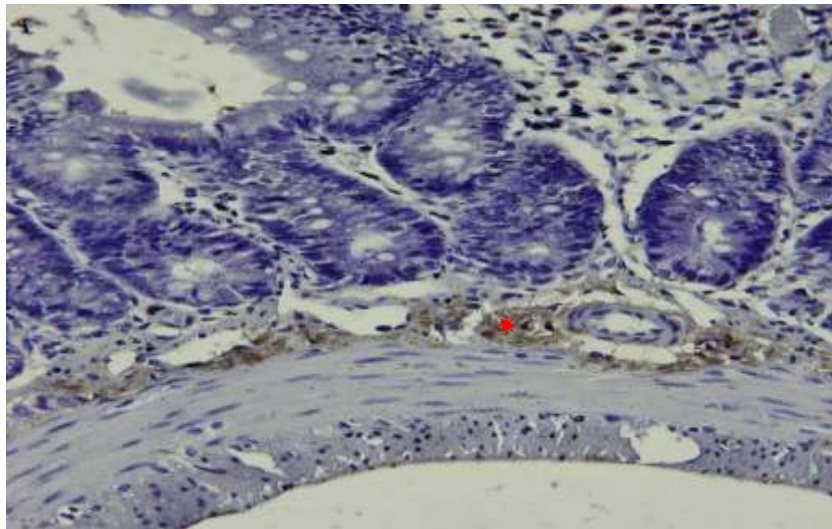


Fig. 18. Fotomicrografia do íleo de rato controle irradiado (grupo II), com imunomarcção para colágeno tipo III (400X) (*).

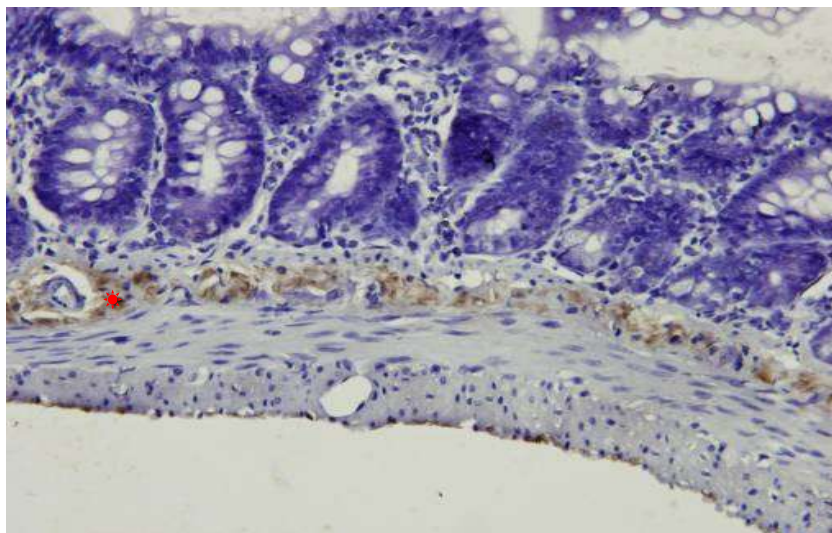


Fig. 19. Fotomicrografia do íleo de rato irradiado e submetido a suplementação dietética com L-glutamina (grupo III), com imunomarcção para colágeno tipo III (400X) (*).

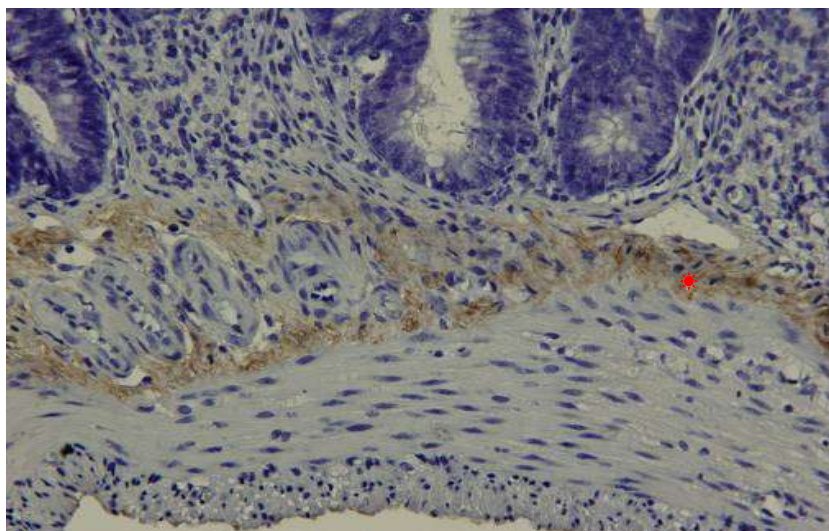


Fig. 20. Fotomicrografia do íleo de rato irradiado e submetido a suplementação dietética com glicina (grupo IV), com imunomarcagem para colágeno tipo III (400X) (*).

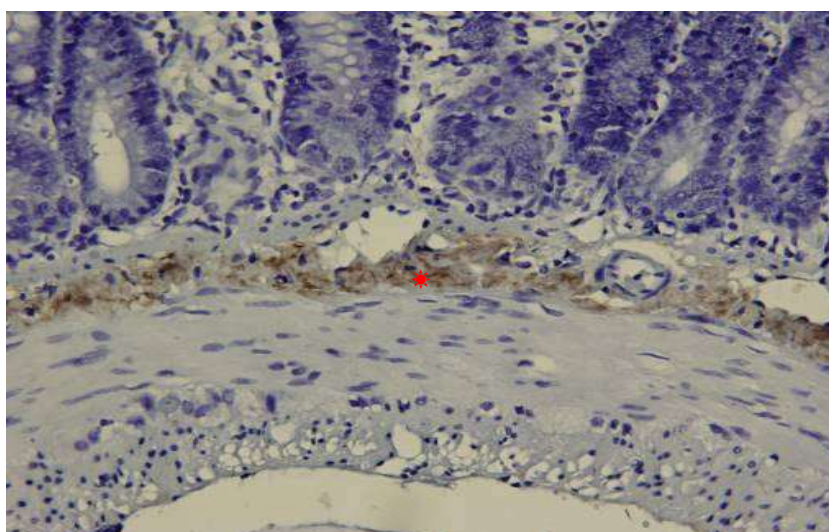


Fig. 21. Fotomicrografia do íleo de rato irradiado e submetido a suplementação dietética com L-arginina (grupo V), com imunomarcagem para colágeno tipo III (400X) (*).

6.3.2.2 – *Músculo Liso (α -actina)*

O material de todos os grupos de animais foi submetido a estudo imunohistoquímico com anti- α -actina para caracterizar a presença de músculo liso no tecido intestinal e auxiliar na identificação das diferentes

camadas musculares durante a mensuração das suas espessuras. As imunohistoquímicas para α -actina de cada grupo de animais são mostradas nas figuras 22 a 26.

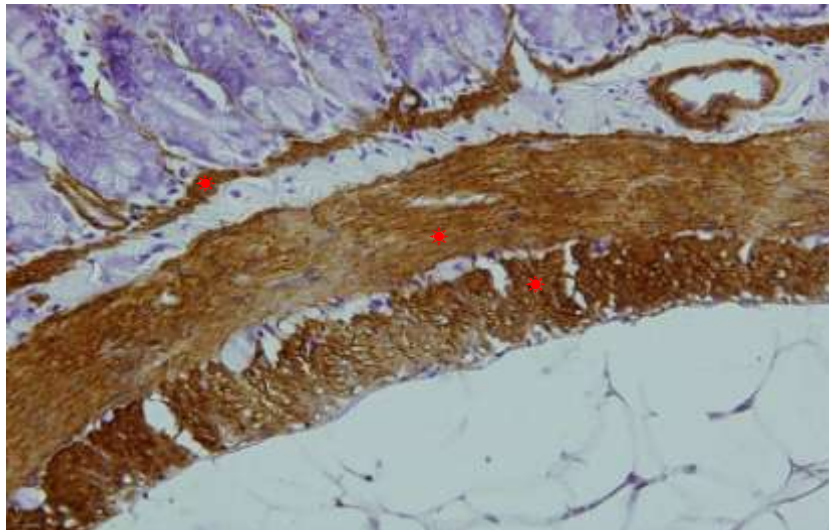


Fig. 22. Fotomicrografia do íleo de rato controle não irradiado (grupo I), com imunomarcção para α -actina (400X), com identificação das camadas musculares (*).

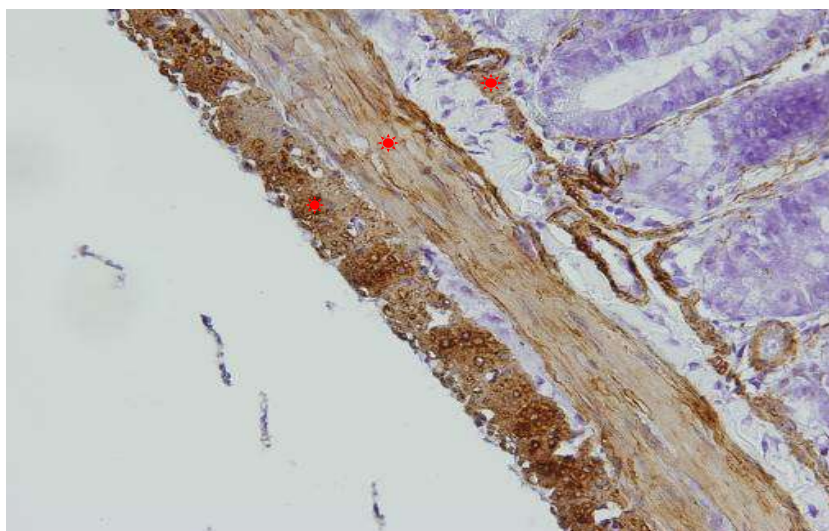


Fig. 23. Fotomicrografia do íleo de rato controle irradiado (grupo II), com imunomarcção para α -actina (400X), com identificação das camadas musculares (*).

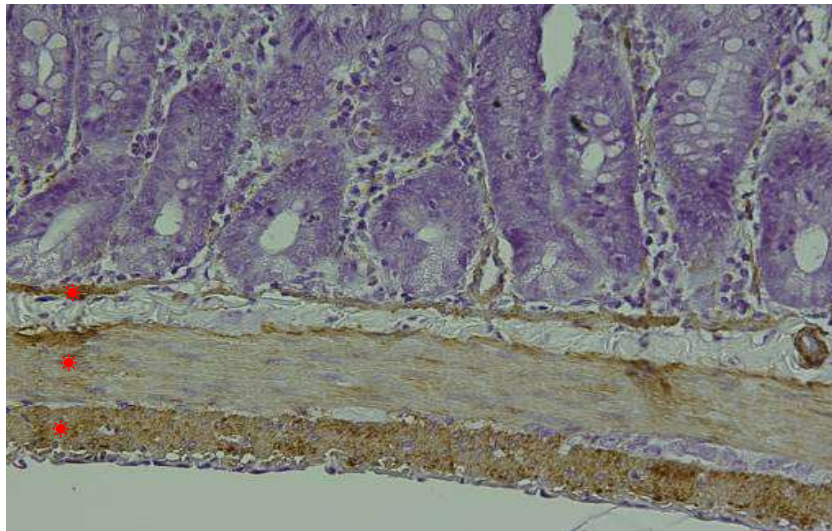


Fig. 24. Fotomicrografia do íleo de rato irradiado e submetido a suplementação dietética com L-glutamina (grupo III), com imunomarcagem para α -actina (400X), com identificação das camadas musculares (*).

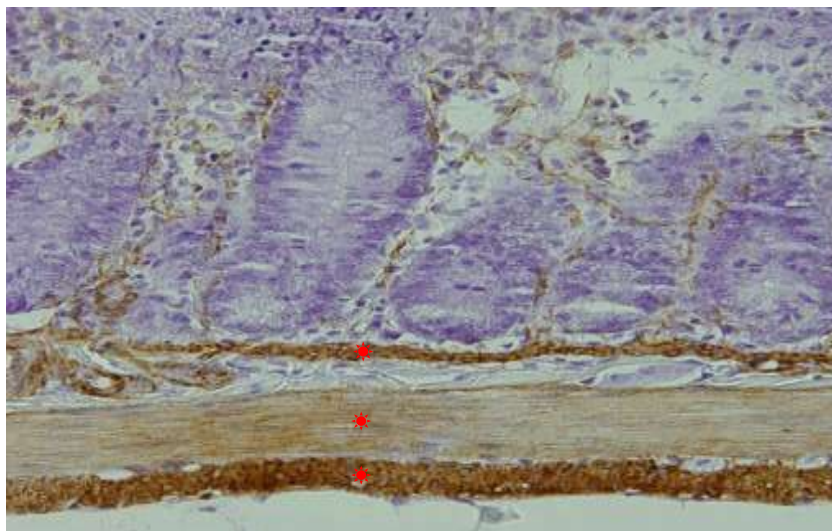


Fig. 25. Fotomicrografia do íleo de rato irradiado e submetido a suplementação dietética com glicina (grupo IV), com imunomarcagem para α -actina (400X), com identificação das camadas musculares (*).

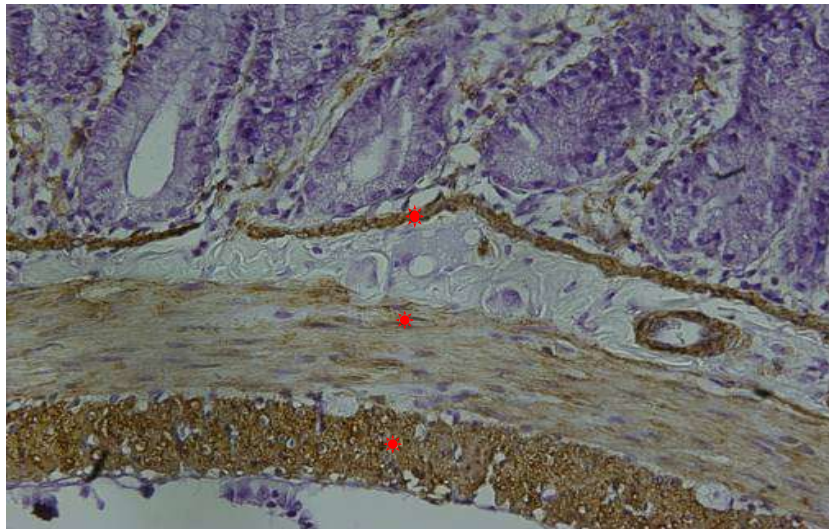


Fig. 26. Fotomicrografia do íleo de rato irradiado e submetido a suplementação dietética com L-arginina (grupo V), com imunomarcção para α -actina (400X), com identificação das camadas musculares (*).

7 – DISCUSSÃO

A radioterapia provoca danos no intestino que podem se manifestar tanto precoce quanto tardiamente. A adequada cicatrização do tecido irradiado ainda se constitui em um desafio a ser superado e requer certa urgência, uma vez que o intestino desempenha diversas funções metabólicas, dentre elas a síntese protéica. O trato gastrointestinal apresenta a maior taxa de *turnover* protéico corporal, contribuindo com 10% a 15% da síntese total de proteínas.^[75] Além disso, desempenha funções já bem conhecidas no tocante à absorção de nutrientes e funções imune e endócrina.^[76]

O tecido intestinal que sofre dano decorrente de irradiação passa por mudanças estruturais que são refletidas na capacidade do epitélio em absorver os nutrientes. Além disso, os efeitos colaterais ocasionados pela enterite actínica, como náuseas, enjôo, dor abdominal e diarreia, são capazes não somente de limitar a utilização da radioterapia no tratamento anti-neoplásico, como também de influenciar na ingestão hídrica e alimentar e no peso corporal, constituindo-se em indicadores prognósticos. Assim, esses efeitos afetam, sobremaneira, a qualidade de vida dos pacientes e 5% a 10% deles desenvolvem severa toxicidade intestinal, caracterizada, mais tardiamente, por fibrose transmural, que pode levar a obstrução intestinal.^[77]

Tem-se verificado que quanto maior a severidade dos sintomas agudos decorrentes da irradiação, maior a incidência de efeitos crônicos adversos, sugerindo que a resposta precoce à radiação ionizante de alguma forma altera a fisiologia do intestino e assim o torna mais susceptível à inflamação.^[78] Por esta razão, torna-se de grande importância proteger o intestino da lesão causada pela irradiação na fase aguda.^[68]

Inúmeros estudos vêm sugerindo que alguns nutrientes podem minimizar os efeitos negativos da irradiação sobre o intestino ^[4,20,68,79,80] e, assim, permitir a melhor tolerância a essa terapia. Sugere-se que esses nutrientes são capazes de interferir positivamente na estrutura intestinal, recuperando a capacidade absorptiva do epitélio e a cicatrização da parede, como um todo. ^[81,82]

Optou-se por avaliar a ação dos aminoácidos L-arginina e L-glutamina, que são condicionalmente essenciais, tendo sua necessidade aumentada em situações de estresse, ^[17,18,38,39] como ocorre durante o emprego da radioterapia. Além de suas funções específicas, estes aminoácidos participam da síntese protéica, em especial de colágeno, que, durante ou após a irradiação, pode ter sua síntese diminuída. Adicionalmente, desempenham um papel na minimização dos processos inflamatórios, ^[4,44,83] de grande relevância no reparo tissular, e, ainda, participam na formação de moléculas antioxidantes, como a glutathione, o que pode diminuir a ação dos radicais livres liberados durante a irradiação. ^[29,65,84]

A glicina, que tem sido utilizada por muitos autores como aminoácido-controle, com o objetivo principal de manter o mesmo aporte de aminoácidos, neste estudo não foi utilizada como tal, mas como um dos objetos de estudo. ^[20,22,85] Utilizá-la como controle é passível de crítica, haja vista que esse aminoácido possui propriedade antioxidante reconhecida, como a de suprimir a ação de radicais livres ^[67] e de inibir a formação de citocinas pró-inflamatórias, ^[60-64] além de participar na constituição da molécula de colágeno. ^[48]

Muitas são as dosagens para a suplementação de aminoácidos que vêm sendo utilizadas, tanto em animais ^[6,68,86,87] quanto em humanos, ^[88,89] dificultando a padronização dos resultados, pois muitas das ações desses aminoácidos podem depender da dose e do tempo de sua utilização.

Em humanos, a recomendação para o uso de glutamina em pacientes em períodos pré e pós-operatório varia de 0,35-0,65 g/kg de peso corporal/dia^[90] a valores médios de 20-30 g/dia.^[16] Também em animais, é grande a diversidade, variando entre 1,0 g/kg/dia^[20] e 4,5 g/kg/dia,^[91] mas também sendo preconizados a utilização de valor correspondente a 2% da água ingerida ao dia^[68, 79] ou de solução a 3%.^[85]

No que se refere à arginina, as recomendações de dosagens para humanos situam-se entre 300 a 500 mg/kg de peso/dia, acima de 4% a 6% do valor energético total ou acima de 10 a 12 g/dia, havendo tolerância até altas doses (30-60 g/dia).^[92] Hwang *et al.* (2003), que também avaliaram o íleo irradiado em ratos, utilizaram suplementação da arginina na dose de 2% da água ingerida, enquanto Gonce *et al.* (1990) utilizaram diversas doses, também em relação à ingestão hídrica, variando entre 2% e 6%.^[93]

Até o momento, a glicina é utilizada como suplemento dietético somente em desenhos experimentais, com doses de 0,5-1,0 g/kg de peso corporal,^[57,58] 5% da dieta ou em solução de reperfusão a 20%,^[59] não havendo ainda padronização de dosagem para humanos.

Optou-se por utilizar uma dose padrão de 0,65 g/kg/dia dos três aminoácidos – L-arginina, glicina e L-glutamina –, fundamentado em pesquisas anteriormente realizadas por nosso grupo com L-glutamina e pelo fato de que este é, até o momento, o aminoácido mais estudado. Desta forma, a suplementação de aminoácidos nas dietas dos animais manteve-se quantitativamente uniforme para todos os grupos, eliminando-se a possibilidade de que eventuais diferenças nos resultados pudessem ser atribuídas, eventualmente, a diferenças em sua oferta.

No período pré-irradiação, os animais suplementados com glicina (grupo IV) ingeriram menor quantidade de ração quando comparados aos demais grupos. Porém, esta menor ingestão não alterou o ganho de

peso, que foi, neste mesmo período, semelhante entre todos os grupos de animais.

No período pós-irradiação, os animais de todos os grupos irradiados apresentaram ingestão de ração significativamente menor do que o grupo controle não irradiado (grupo I), ratificando os resultados encontrados por Klimberg *et al.* (1990) e Diestel *et al.* (2007). Isto demonstra que a irradiação interfere negativamente neste parâmetro, possivelmente por gerar alterações no sistema digestório, como diarreia, dor abdominal e náuseas. Entretanto, dentre os animais irradiados, os que receberam suplementação de L-glutamina (grupo III) apresentaram maior ingestão de ração em comparação aos demais grupos irradiados (II, IV e V), mantendo o seu peso corporal similar ao dos ratos não irradiados. Outros autores mostram discrepância nessa observação. Enquanto alguns obtiveram resultados similares,^[82,87] atribuindo-os ao fato da L-glutamina possuir um efeito de preservação de proteína no *pool* de aminoácidos livres intracelular e na síntese protéica muscular,^[94,95] outros mostraram que animais irradiados com dieta suplementada com aminoácidos apresentaram perda de peso semelhante à daqueles não-suplementados no período pós-irradiação.^[20,68]

Todavia, os animais suplementados com glicina (grupo IV) continuaram a apresentar menor ingestão alimentar no período pós-irradiação, com conseqüente perda de peso, quando comparados com os ratos de todos demais grupos, inclusive com aqueles submetidos a irradiação e que não receberam qualquer suplementação de aminoácido (grupo II). Isso se contrapõe aos achados de Tsune *et al.* (2003) que suplementaram a dieta de ratos submetidos à indução de colite com glicina a 5% e observaram a preservação do peso corporal desses animais.^[50] Possivelmente, isto se deve ao fato da glicina se tornar indisponível para reutilização após a sua incorporação em alguns compostos, o que ocorre

sob certas circunstâncias, como em estados de estresse intenso, em que a demanda maior por este aminoácido pode exceder a sua taxa de síntese.^[96]

No que se refere à L-arginina, há controvérsias quanto a sua influência no peso corporal. Neste estudo, a sua suplementação não se mostrou eficaz na manutenção do ganho ponderal em animais irradiados, em concordância com os dados de Barbul *et al.* (1984) que mostraram que ratos com fratura óssea induzida, mesmo recebendo arginina (por via endovenosa, em infusão contínua por 24 horas, em três diferentes doses: 1,55, 4,05 e 7,9 g/dia) perderam peso até o 5.º dia após o trauma.^[40] Entretanto, Mane *et al.* (2001), em experimento com ratos com colite induzida, observaram que o uso desse aminoácido, em diferentes dosagens (30-500 mg/dia), acelera o ganho de peso, tanto antes quanto após a indução dessa condição inflamatória.^[44]

No que tange aos efeitos da suplementação com L-arginina na ingestão de água, observou-se que os animais suplementados com este aminoácido ingeriram significativamente mais água em comparação aos demais grupos, tanto antes quanto após a irradiação. Em ratos, a maioria das modificações morfológicas e funcionais do intestino surge a partir do 4.º dia após a irradiação abdominal.^[10] Neste mesmo período, um decréscimo na absorção de água e cloreto de sódio é descrito, mostrando que a função intestinal é afetada pela irradiação e pode contribuir para a diarreia induzida pela radiação ionizante.^[20,97]

Também se sugere que a arginina, pela produção endógena de óxido nítrico, atue como um modulador fisiológico pró-absortivo do transporte ileal de água e eletrólitos em mamíferos,^[98] além de se constituir em vasodilatador e apresentar ação inibitória sobre a enzima conversora de angiotensina.^[99] Em situações de estresse, a demanda pela L-arginina está aumentada, com o intuito de promover a síntese endógena de seus metabólitos, inclusive do óxido nítrico,^[100] o que pode ser amplificado com

o aumento do aporte dietético desse aminoácido, potencializando seus efeitos e, possivelmente, contribuindo para estimular o aumento da ingestão hídrica.

A maior parte das publicações que refere o uso da L-glutamina na prevenção ou controle de seqüelas da irradiação no intestino delgado tem se restringido à sua importante ação na mucosa,^[22,69,79,82] sendo ainda muito limitados os dados acerca de seu eventual papel nas outras camadas da parede intestinal, foco do presente estudo. O mesmo se observa com a L-arginina e seus metabólitos, principalmente o óxido nítrico, cujos estudos disponíveis não caracterizam morfometricamente toda a parede intestinal irradiada,^[68] e com a glicina, em que o foco, em sua maioria, está na caracterização de eventos relacionados à isquemia/reperfusão em diversos órgãos.^[54,55,57]

O colágeno se constitui na proteína predominante do tecido conjuntivo do intestino e os seus tipos I e III são encontrados na lâmina própria, na submucosa e na camada muscular,^[101] sendo as células musculares lisas preponderantes em sua produção em muitos estados patológicos, incluindo a enteropatia por irradiação.^[14] Neste estudo, o colágeno foi avaliado qualitativamente por meio da imunohistoquímica e da coloração Vermelho de Picro Sirius, sendo as alterações estruturais do tecido conjuntivo das camadas submucosa e muscular longitudinal e circular observadas por análise morfométrica. Pela imunohistoquímica, foram evidenciados os dois tipos de colágeno, I e III, com diferentes intensidades.

A espessura da parede intestinal, desde a camada serosa até a muscular da mucosa, correlaciona-se com a extensão da deposição de tecido conjuntivo após a irradiação.^[12] As camadas musculares da parede intestinal foram evidenciadas por meio da imunohistoquímica da α -actina de músculo liso, sendo as camadas submucosa e muscular longitudinal e

circular utilizadas para estudo morfométrico. As camadas muscular da mucosa e serosa não foram mensuradas, haja vista as suas espessuras serem muito delgadas. Apesar de importantes alterações que ocorrem na camada mucosa após a irradiação, como destruição das células proliferativas das criptas, diminuição da altura das vilosidades e ulceração,^[68,87,102] ela não foi avaliada, devido a irregularidade de sua estrutura, o que dificulta a análise morfométrica.^[103]

Nos animais submetidos a irradiação abdominal e que não receberam suplementação de aminoácidos (grupo II) houve uma diminuição significativa da camada submucosa em relação a todos os demais grupos. Isto se justifica pelo fato da irradiação abdominal ser capaz de aumentar a expressão de citocinas inflamatórias na camada muscular ileal de ratos,^[104,105] bem como elevar, simultaneamente, a síntese e a atividade de metaloproteinases no intestino irradiado.^[105-107] Esta família de enzimas degrada todos os componentes do tecido conjuntivo, leva a um aumento da expressão de citocinas pró-inflamatórias e fibrogênicas^[104] e tem sido implicada como um dos fatores responsáveis por complicações da cicatrização, como, p. ex. deiscência de anastomoses intestinais.^[108] Em contrapartida, quando os animais foram irradiados e submetidos a suplementação dietética com aminoácidos (grupos III, IV e V) observou-se aumento da espessura da camada submucosa, em comparação aos animais do grupo II, o que pode se dever ao maior aporte de proteínas na dieta e/ou à ação específica de cada um dos aminoácidos.

Ainda na submucosa, os ratos do grupo III (submetidos a irradiação e suplementados com L-glutamina) não mostraram diferença em comparação aos do grupo I (controle), demonstrando que o aminoácido L-glutamina, possivelmente, foi aquele que apresentou melhores propriedades protetoras e/ou preventivas, mantendo um padrão histológico mais próximo do normal.

Em outras situações clínicas graves, como choque, sepse e trauma, também já foi descrita a influência da L-glutamina na manutenção da integridade e na prevenção da atrofia e da disfunção intestinal em ratos.^[109,110]

O papel da L-glutamina na manutenção da integridade intestinal pode ser atribuído a sua conversão a prolina^[111] e ao estímulo da síntese protéica nos enterócitos,^[75] em especial a do colágeno, que constitui uma das etapas do processo de cicatrização. Além disso, por meio da ação da glutathione, um metabólito da L-glutamina e potente antioxidante,^[29] pode promover diminuição da ação dos radicais livres liberados durante a irradiação, minimizando o dano na parede intestinal. Outro efeito recentemente atribuído a este aminoácido seria a inibição do aumento da expressão das metaloproteinases no intestino, após isquemia, e do aumento da expressão da óxido nítrico sintase indutiva (iNOS).^[112]

Diferentemente dos animais do grupo III, os dos grupos IV (submetidos a irradiação e suplementados com glicina) e V (submetidos a irradiação e suplementados com L-arginina) mostraram aumento expressivo da camada submucosa, maior, inclusive, que dos ratos do grupo controle, o que pode se justificar pelo papel específico desempenhados por estes aminoácidos na síntese de colágeno.

A prolina, que tem ornitina, glutamato e glutamina como seus precursores, encontra-se em grande quantidade na ferida e é fundamental para a síntese de colágeno.^[113] A ornitina é sintetizada a partir da L-arginina, pela ação da enzima arginase, nas células musculares lisas,^[111] que são as principais produtoras de colágeno no intestino.^[111]

A arginase inibe a produção de óxido nítrico^[114] que, dependendo da enzima que o gerou, age tanto na prevenção quanto na indução da lesão intestinal. Esta molécula é derivada da ação de duas enzimas: óxido nítrico sintase constitutiva (cNOS), que produz óxido nítrico em níveis

fisiológicos e vai desempenhar um papel na manutenção da integridade vascular e da barreira mucosa, e óxido nítrico sintase indutiva (iNOS), que é estimulada por citocinas inflamatórias ou endotoxinas.^[100] Esta última, quando ativada, é responsável pela produção de grandes quantidades de óxido nítrico por longo período de tempo, gerando desarranjos estruturais^[100], por inibir a proliferação das células musculares lisas,^[115] como também por promover a sua apoptose,^[116] tornando prejudicada a síntese de colágeno. A habilidade da arginase em competir com a iNOS pelo substrato L-arginina pode prejudicar a síntese de NO^[114] e, desta forma, pode ter contribuído para o aumento da espessura da camada submucosa nos animais do grupo V.

Em similaridade aos animais suplementados com L-arginina, aqueles suplementados com glicina apresentaram aumento importante da camada submucosa. Como existe grande quantidade de glicina na molécula do colágeno, esse aumento sugere que o dano tissular causado pela irradiação pode ter gerado maior incorporação deste aminoácido ao colágeno, uma vez que sua disponibilidade tornou-se aumentada pela suplementação dietética. Além disso, a glicina, como a L-arginina, ocorre em altas concentrações, particularmente na pele e no tecido conjuntivo, e pode, por esta razão, ser requerida em quantidades relativamente grandes para o reparo tissular.^[117,118] Adicionalmente, outras funções importantes que têm sido atribuídas à glicina podem, eventualmente, ter contribuído para este resultado, como sua ação antiinflamatória e citoprotetora,^[47] e propriedades que interferem positivamente na perfusão tecidual comprometida pela irradiação.^[57]

A morfometria das camadas musculares não mostrou diferença na camada muscular longitudinal externa entre os diferentes grupos de animais. Entretanto, a camada muscular circular interna nos animais dos grupos IV e V apresentou aumento significativo quando comparada à do

grupo I, sugerindo que a proliferação das células musculares lisas pode ter contribuído para o aumento da síntese de colágeno na camada submucosa desses animais.

Os aminoácidos em estudo mostraram-se capazes de estimular a síntese de colágeno no intestino delgado irradiado, notadamente glicina e L-arginina. Este achado pode sugerir que estes aminoácidos não deveriam ser indicados para suplementação dietética na concomitância de irradiação abdominal, haja vista que levaram a aumento acentuado da camada submucosa, com conseqüente aumento da concentração de colágeno, o que pode se configurar em risco aumentado de desenvolvimento de fibrose intestinal.

Assim, a L-glutamina foi o aminoácido que mostrou melhores resultados na proteção do intestino delgado contra a exposição à radiação ionizante, propiciando a manutenção estrutural da camada submucosa e das camadas musculares longitudinal externa e circular interna, em nível similar ao observado nos animais saudáveis. Poder-se-ia especular que esse efeito também poderia diminuir o risco de desenvolvimento de fibrose intestinal pós-irradiação, como observado por Chang *et al.* (2001), em estudo em ratos com indução de obstrução intestinal mecânica.^[119]

Os resultados desta pesquisa provêm novos subsídios para a eventual aplicabilidade clínica destes aminoácidos na prevenção e no reparo da lesão da parede ileal irradiada. Estudos adicionais são necessários, com quantificação dos colágenos tipos I e III, bem como da expressão das metaloproteinases, no sentido de se determinar a eficácia da utilização de diferentes dosagens de aminoácidos, de maneira isolada ou combinada, por períodos de tempo distintos, assim como o emprego de doses maiores e fracionadas de irradiação.

8 – CONCLUSÃO

A suplementação dietética com L-glutamina, glicina e L-arginina levou a aumento diferenciado da espessura da camada submucosa ileal. Com a L-arginina e glicina, a camada submucosa se tornou mais espessada do que observado nos ratos não irradiados, enquanto com a L-glutamina a espessura dessa camada não apresentou diferença em relação a esses mesmos animais.

A suplementação dietética com L-arginina e glicina aumentou a espessura da camada muscular circular interna, sem alterar a camada muscular longitudinal externa, em comparação aos animais não irradiados, irradiados ou com suplementação com L-glutamina.

A ingestão de ração pós-irradiação diminuiu em todos os grupos de animais submetidos à irradiação abdominal. No tocante à ingestão de água pós-irradiação, ela somente aumentou no grupo suplementado com L-arginina.

Após a radioterapia, apenas o grupo de animais suplementados com L-glutamina apresentou ganho ponderal similar ao observado nos ratos não irradiados.

9 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Waddell BE, Rodriguez-Bigas MA, Lee RJ, Weber TK, Petrelli NJ: Prevention of chronic radiation enteritis. *J Am Coll Surg*. 1999; 189:611-24.
2. Yeoh EK, Horowitz M: Radiation enteritis. *Surg Gynecol Obstet*. 1987;165:373-9.
3. Demirer S, Aydintug S, Aslim B, Kepenekci I, Sengul N, Evirgen O, Gerceker D, Andrieu MN, Ulusoy C, Karahuseyinoglu S: Effects of probiotics on radiation-induced intestinal injury in rats. *Nutrition*. 2006;22:179-86.
4. Erbil Y, Öztezcan S, Giris M, Barbaros U, Olgac V, Bilge H, Kucucuk H, Toker G: The effect of glutamine on radiation-induced organ damage. *Life Sci*. 2005;78:376-82.
5. Andrade RS, Kalnicki S, Heron DE. Considerações nutricionais na radioterapia. In: Watzberg DL (ed). *Dieta, Nutrição e Câncer*. São Paulo. Editora Atheneu;2004.p. 106-16.
6. Campos FG, Waitzberg DL, Mucerino DR, Goncalves EL, Logulo AF, Habr-Gama A, Rombeau JL: Protective effects of glutamine enriched diets on acute actinic enteritis. *Nutr Hosp*. 1996 ;11:167-77.
7. Savarese DM, Savy G, Vahdat L, Wischmeyer PE, Corey B: Prevention of chemotherapy and radiation toxicity with glutamine. *Cancer Treat Rev*. 2003;29:501-13.
8. Agrawal A, Chandra D, Kale RK: Radiation induced oxidative stress: II studies in liver as a distant organ of tumor bearing mice. *Mol Cell Biochem*. 2001;224:9-17.

9. Emami B, Lyman J, Brown A, Coia L, Goitein M, Munzenrider JE, Shank B, Solin LJ, Wesson M: Tolerance of normal tissue to therapeutic irradiation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 1991;21:109-22.
10. Guzman-Stein G, Bonsack M, Liberty J, Delaney JP: Abdominal radiation causes bacterial translocation. *J Surg Res*. 1989;46:104-7.
11. Pia de la Maza M, Gotteland M, Ramirez C, Araya M, Yudin T, Bunout D, Hirsch S: Acute nutritional and intestinal changes after pelvic radiation. *J Am Coll Nutr*. 2001;20:637-42.
12. Wang J, Zheng H, Ou X, Fink LM, Hauer-Jensen M: Deficiency of microvascular thrombomodulin and up-regulation of protease-activated receptor-1 in irradiated rat intestine: possible link between endothelial dysfunction and chronic radiation fibrosis. *Am J Pathol*. 2002 ;160:2063-72.
13. Trier JS, Browning TH: Morphologic response of the mucosa of human small intestine to x-ray exposure. *J Clin Invest*. 1966 ;45:194-204.
14. Wang J, Zheng H, Hauer-Jensen M: Influence of Short-Term Octreotide Administration on Chronic Tissue Injury, Transforming Growth Factor beta (TGF-beta) Overexpression, and Collagen Accumulation in Irradiated Rat Intestine. *J Pharmacol Exp Ther*. 2001 ;297:35-42.
15. Stevens KR Jr., Fletcher WS, Allen CV: Anterior resection and primary anastomosis following high dose preoperative irradiation for adenocarcinoma of the recto-sigmoid. *Cancer*. 1978 ;41:2065-71.
16. Garcia-de-Lorenzo A, Zarazaga A, Garcia-Luna PP, Gonzalez-Huix F, Lopez-Martinez J, Mijan A, Quecedo L, Casimiro C, Usan L, del Llano J: Clinical evidence for enteral nutritional support with glutamine: a systematic review. *Nutrition*. 2003 ;19:805-11.
17. Souba WW, Smith RJ, Wilmore DW: Glutamine metabolism by the intestinal tract. *J Parenter Enteral Nutr*. 1985;9:608-17.

18. Tapiero H, Mathe G, Couvreur P, Tew KD: II. Glutamine and glutamate. *Biomed Pharmacother.* 2002 ;56:446-57.
19. Souba WW: Glutamine: a key substrate for the splanchnic bed. *Annu Rev Nutr.* 1991;11:285-308.
20. Diestel CF, Marques RG, Lopes-Paulo F, Paiva D, Horst NL, Caetano CE, Portela MC: Role of L-glutamine and glycine supplementation on irradiated colonic wall. *Int J Colorectal Dis.* 2007 ;22:1523-9.
21. Fox AD, Kripke SA, De Paula J, Berman JM, Settle RG, Rombeau JL: Effect of a glutamine-supplemented enteral diet on methotrexate-induced enterocolitis. *J Parenter Enteral Nutr.* 1988 ;12:325-31.
22. Klimberg VS, Salloum RM, Kasper M, Plumley DA, Dolson DJ, Hautamaki RD, Mendenhall WR, Bova FC, Bland KI, EM III, Souba WW: Oral glutamine accelerates healing of the small intestine and improves outcome after whole abdominal radiation. *Arch Surg.* 1990;125:1040-5.
23. Bergstrom J, Furst P, Noree LO, Vinnars E: Intracellular free amino acid concentration in human muscle tissue. *J Appl Physiol.* 1974 ;36:693-7.
24. Souba WW, Klimberg VS, Plumley DA, Salloum RM, Flynn TC, Bland KI, Copeland EM III: The role of glutamine in maintaining a healthy gut and supporting the metabolic response to injury and infection. *J Surg Res.* 1990 ;48:383-91.
25. Zielke HR, Ozand PT, Tildon JT, Sevdalian DA, Cornblath M: Reciprocal regulation of glucose and glutamine utilization by cultured human diploid fibroblasts. *J Cell Physiol.* 1978 ;95:41-8.
26. Newsholme EA, Crabtree B, Ardawi MS: Glutamine metabolism in lymphocytes: its biochemical, physiological and clinical importance. *Q J Exp Physiol.* 1985 ;70:473-89.
27. Pitts RF: Renal Production and Excretion of Ammonia. *Am J Med.* 1964 ;36:720-42.

28. Chwals WJ: Regulation of the cellular and physiological effects of glutamine. *Mini Rev Med Chem.* 2004;4:833-8.
29. Evans ME, Jones DP, Ziegler TR: Glutamine prevents cytokine-induced apoptosis in human colonic epithelial cells. *J Nutr.* 2003 ;133:3065-71.
30. Harward TR, Coe D, Souba WW, Klingman N, Seeger JM: Glutamine preserves gut glutathione levels during intestinal ischemia/reperfusion. *J Surg Res.* 1994 ;56:351-5.
31. Cao Y, Feng Z, Hoos A, Klimberg VS: Glutamine enhances gut glutathione production. *J Parenter Enteral Nutr.* 1998;22:224-7.
32. Rouse K, Nwokedi E, Woodliff JE, Epstein J, Klimberg VS: Glutamine enhances selectivity of chemotherapy through changes in glutathione metabolism. *Ann Surg.*1995 ;221:420-6.
33. Wu G, Morris SM Jr.: Arginine metabolism: nitric oxide and beyond. *Biochem J.*1998;15;336 :1-17.
34. Rose WC, Haines WJ, Warner DT: The amino acid requirements of man. V: The role of lysine, arginine, and tryptophan. *J Biol Chem.* 1954;206:421-30.
35. Barbul A: Arginine: biochemistry, physiology, and therapeutic implications. *J Parenter Enteral Nutr.* 1986;10:227-38.
36. Beaumier L, Castillo L, Yu YM, Ajami AM, Young VR: Arginine: new and exciting developments for an "old" amino acid. *Biomed Environ Sci.* 1996;9:296-315.
37. Barbul A, Sisto DA, Wasserkrug HL, Yoshimura NN, Efron G: Nitrogen-sparing and immune mechanisms of arginine: differential dose-dependent responses during postinjury intravenous hyperalimentation. *Curr Surg.*1983;40:114-6.
38. Kirk SJ, Barbul A: Role of arginine in trauma, sepsis, and immunity. *J Parenter Enteral Nutr.* 1990;14:226S-9S.

39. Nirgiotis JG, Hennessey PJ, Andrassy RJ: The effects of an arginine-free enteral diet on wound healing and immune function in the postsurgical rat. *J Pediatr Surg.*1991;26:936-41.
40. Barbul A, Wasserkrug HL, Yoshimura N, Tao R, Efron G: High arginine levels in intravenous hyperalimentation abrogate post-traumatic immune suppression. *J Surg Res.*1984;36:620-4.
41. Aral B, Schlenzig JS, Liu G, Kamoun P: Database cloning human delta 1-pyrroline-5-carboxylate synthetase (P5CS) cDNA: a bifunctional enzyme catalyzing the first 2 steps in proline biosynthesis. *C R Acad Sci III.*1996;319:171-8.
42. Wu G, Davis PK, Flynn NE, Knabe DA, Davidson JT: Endogenous synthesis of arginine plays an important role in maintaining arginine homeostasis in postweaning growing pigs. *J Nutr.*1997;127:2342-9.
43. Flynn NE, Meininger CJ, Haynes TE, Wu G: The metabolic basis of arginine nutrition and pharmacotherapy. *Biomed Pharmacother.*2002;56:427-38.
44. Mane J, Fernandez-Banares F, Ojanguren I, Castella E, Bertran X, Bartoli R, Alvarez M, Gassull MA: Effect of L-arginine on the course of experimental colitis. *Clin Nutr.*2001;20:415-22.
45. Reitano G, Grasso S, Distefano G, Messina A: The serum insulin and growth hormone response to arginine and to arginine with glucose in the premature infant. *J Clin Endocrinol Metab.*1971;33:924-8.
46. Reyes AA, Karl IE, Klahr S: Role of arginine in health and in renal disease. *Am J Physiol.*1994;267:F331-46.
47. Zhong Z, Wheeler MD, Li X, Froh M, Schemmer P, Yin M, Bunzendaul H, Bradford B, Lemasters JJ: L-Glycine: a novel antiinflammatory, immunomodulatory, and cytoprotective agent. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.*2003;6:229-40.

48. Hall JC: Glycine. *J Parenter Enteral Nutr.*1998;22:393-8.
49. Barbul A: Proline precursors to sustain Mammalian collagen synthesis. *JNutr.* 2008;138:2021S-4S.
50. Tsune I, Ikejima K, Hirose M, Yoshikawa M, Enomoto N, Takei Y, Sato N: Dietary glycine prevents chemical-induced experimental colitis in the rat. *Gastroenterology.*2003;125:775-85.
51. Qu W, Ikejima K, Zhong Z, Waalkes MP, Thurman RG: Glycine blocks the increase in intracellular free Ca²⁺ due to vasoactive mediators in hepatic parenchymal cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.*2002;283:G1249-56.
52. Yamashina S, Konno A, Wheeler MD, Rusyn I, Rusyn EV, Cox AD, Thurman RG: Endothelial cells contain a glycine-gated chloride channel. *Nutr Cancer.* 2001;40:197-204.
53. Miller GW, Schnellmann RG: A putative cytoprotective receptor in the kidney: relation to the neuronal strychnine-sensitive glycine receptor. *Life Sci.*1994;55:27-34.
54. Zhang Y, Ikejima K, Honda H, Kitamura T, Takei Y, Sato N: Glycine prevents apoptosis of rat sinusoidal endothelial cells caused by deprivation of vascular endothelial growth factor. *Hepatology.* 2000;32:542-6.
55. Zhong Z, Jones S, Thurman RG: Glycine minimizes reperfusion injury in a low-flow, reflow liver perfusion model in the rat. *Am J Physiol.*1996;270:G332-8.
56. Weinberg JM, Davis JA, Abarzua M, Kiani T, Kunkel R: Protection by glycine of proximal tubules from injury due to inhibitors of mitochondrial ATP production. *Am J Physiol.*1990;258:C1127-40.
57. Jacob T, Ascher E, Hingorani A, Kallakuri S: Glycine prevents the induction of apoptosis attributed to mesenteric ischemia/reperfusion injury in a rat model. *Surgery.* 2003;134:457-66.

58. Kallakuri S, Ascher E, Pagala M, Gade P, Hingorani A, Scheinman M, Mehraein K, Jacob T: Protective effect of glycine in mesenteric ischemia and reperfusion injury in a rat model. *J Vasc Surg.* 2003;38:1113-20.
59. Lee MA, McCauley RD, Kong SE, Hall JC: Influence of glycine on intestinal ischemia-reperfusion injury. *J Parenter Enteral Nutr.* 2002;26:130-5.
60. Ikejima K, Iimuro Y, Forman DT, Thurman RG: A diet containing glycine improves survival in endotoxin shock in the rat. *Am J Physiol.* 1996;271:G97-103.
61. Li X, Bradford BU, Wheeler MD, Stimpson SA, Pink HM, Brodie TA, Schwab JH, Thurman RG: Dietary glycine prevents peptidoglycan polysaccharide-induced reactive arthritis in the rat: role for glycine-gated chloride channel. *Infect Immun.* 2001;69:5883-91.
62. Wheeler MD, Rose ML, Yamashima S, Enomoto N, Seabra V, Madren J, Thurman RG: Dietary glycine blunts lung inflammatory cell influx following acute endotoxin. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2000;279:L390-8.
63. Wheeler M, Stachlewitz RF, Yamashina S, Ikejima K, Morrow AL, Thurman RG: Glycine-gated chloride channels in neutrophils attenuate calcium influx and superoxide production. *Faseb J.* 2000;14:476-84.
64. Stachlewitz RF, Li X, Smith S, Bunzendahl H, Graves LM, Thurman RG: Glycine inhibits growth of T lymphocytes by an IL-2-independent mechanism. *J Immunol.* 2000;164:176-82.
65. Hanada T, Yoshimura A: Regulation of cytokine signaling and inflammation. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2002;13:413-21.
66. Venkatachalam MA, Weinberg JM: Mechanisms of cell injury in ATP-depleted proximal tubules: Role of glycine, calcium, and polyphosphoinositides. *Nephrol Dial Transplant.* 1994;9 Suppl 4:15-21.

67. Jackson AA: The glycine story. *Eur J Clin Nutr.* 1991;45:59-65.
68. Hwang JM, Chan DC, Chang TM, Tsao TY, Tsou SS, Lu RH, Tsai L M: Effects of oral arginine and glutamine on radiation-induced injury in the rat. *J Surg Res.* 2003;109:149-54.
69. Ersin S, Tuncyurek P, Esassolak M, Alkanat M, Buke C, Yilmaz M, Telefoncu A, Kose T: The prophylactic and therapeutic effects of glutamine- and arginine-enriched diets on radiation-induced enteritis in rats. *J Surg Res.* 2000;89:121-5.
70. Gurbuz AT, Kunzelman J, Ratzer EE: Supplemental dietary arginine accelerates intestinal mucosal regeneration and enhances bacterial clearance following radiation enteritis in rats. *J Surg Res.* 1998;74:149-54.
71. Reeves PG: Components of the AIN-93 diets as improvements in the AIN-76A diet. *J Nutr.* 1997;127:S838-41S.
72. Junqueira LC, Cossermelli W, Brentani R: Differential staining of collagens type I, II and III by Sirius Red and polarization microscopy. *Arch Histol Jpn.* 1978;41:267-74.
73. Marques RG, de Miranda ML, Caetano CE, Biondo-Simoes ML: Rumo à regulamentação da utilização de animais no ensino e na pesquisa científica no Brasil. *Acta Cir Bras.* 2005 ;20:262-7.
74. Petroianu A: Aspectos éticos na pesquisa em animais. *Acta Cir Bras* 1996;11:157-64.
75. Higashiguchi T, Hasselgren PO, Wagner K, Fischer JE: Effect of glutamine on protein synthesis in isolated intestinal epithelial cells. *J Parenter Enteral Nutr.* 1993;17:307-14.
76. Junqueira LC, Carneiro L. O trato digestivo. In: Junqueira LC (ed). *Histologia Básica.* Rio de Janeiro. Editora Guanabara Koogan. 2004.p.284 - 316.
77. Hauer-Jensen M, Wang J, Denham JW: Bowel injury: current and evolving management strategies. *Semin Radiat Oncol.* 2003;13:357-71.

78. Johnson RJ, Carrington BM. Pelvic radiation disease: Clin Radiol. 1992;45:4-12.
79. Chun H, Sasaki M, Fujiyama Y, Bamba T: Effect of enteral glutamine on intestinal permeability and bacterial translocation after abdominal radiation injury in rats. J Gastroenterol. 1997;32:189-95.
80. Carroll MP, Zera RT, Roberts JC, Schlafmann SE, Feeney DA, Johnston GR, West MA, Bubrick MP: Efficacy of radioprotective agents in preventing small and large bowel radiation injury. Dis Colon Rectum. 1995;38:716-22.
81. Diestel CF, Lopes-Paulo F, Marques RG, Horst NL, Caetano CE: Efeito da suplementação oral de L-glutamina na parede colônica de ratos submetidos à irradiação abdominal. Acta Cir Bras. 2005;20 Suppl 1:139-45.
82. Klimberg VS, Souba WW, Dolson DJ, Salloum RM, Hautamaki RD, Plumley DA, Mendenhall WM, Bova FJ, Khan SR, Hackett RL, Bland KI, Copeland EM III: Prophylactic glutamine protects the intestinal mucosa from radiation injury. Cancer. 1990; 66:62-8.
83. Erbil Y, Dibekoglu C, Turkoglu U, Ademoglu E, Berber E, Kizir A, Mercan S, Toker G: Nitric oxide and radiation enteritis. Eur J Surg. 1998;164:863-8.
84. Bronte V, Serafini P, Mazzoni A, Segal DM, Zanovello P: L-arginine metabolism in myeloid cells controls T-lymphocyte functions. Trends Immunol. 2003;24:302-6.
85. Souba WW, Klimberg VS, Hautamaki RD, Mendenhall WH, Bova FC, Howard RJ, Bland KI, Copeland EM III: Oral glutamine reduces bacterial translocation following abdominal radiation. J Surg Res. 1990;48:1-5.
86. Scott TE, Moellman JR: Intravenous glutamine fails to improve gut morphology after radiation injury. J Parenter Enteral Nutr. 1992;16:440-4.

87. Souba WW, Klimberg VS, Copeland EM III: Glutamine nutrition in the management of radiation enteritis. *J Parenter Enteral Nutr.* 1990;14(4 Suppl):S106-8S.
88. Barbul A, Sisto DA, Wasserkrug HL, Efron G: Arginine stimulates lymphocyte immune response in healthy human beings. *Surgery.* 1981;90:244-51.
89. Daly JM, Reynolds J, Thom A, Kinsley L, Dietrick-Gallagher M, Shou J, Ruggieri B: Immune and metabolic effects of arginine in the surgical patient. *Ann Surg.* 1988;208:512-23.
90. Wischmeyer PE: Clinical applications of L-glutamine: past, present, and future. *Nutr Clin Pract.* 2003;18:377-85.
91. Margaritis VG, Filos KS, Michalaki MA, Scopa CD, Spiliopoulou I, Nikolopoulou VN, Vagianos CE: Effect of oral glutamine administration on bacterial translocation, endotoxemia, liver and ileal morphology, and apoptosis in rats with obstructive jaundice. *World J Surg.* 2005;29:1329-34.
92. Baxter YC, Borghi R. Nutrientes imunomoduladores e suas aplicações. In: Silva SMCS (ed). *Tratado de alimentação, nutrição e dietoterapia.* São Paulo. Editora Roca;2007. p. 917-40.
93. Gonce SJ, Peck MD, Alexander JW, Miskell PW: Arginine supplementation and its effect on established peritonitis in guinea pigs. *J Parenter Enteral Nutr.* 1990;14:237-44.
94. MacLennan PA, Brown RA, Rennie MJ: A positive relationship between protein synthetic rate and intracellular glutamine concentration in perfused rat skeletal muscle. *FEBS Lett.* 1987;215:187-91.
95. Jepson MM, Pell JM, Bates PC, Millward DJ: The effects of endotoxaemia on protein metabolism in skeletal muscle and liver of fed and fasted rats. *Biochem J.* 1986;235:329-36.

96. Gibson NR, Jahoor F, Ware L, Jackson AA: Endogenous glycine and tyrosine production is maintained in adults consuming a marginal-protein diet. *Am J Clin Nutr.* 2002;75:511-8.
97. Dublineau I, Ksas B, Griffiths NM: Functional changes in the rat distal colon after whole-body irradiation: dose-response and temporal relationships. *Radiat Res.* 2000;154:187-95.
98. Barry MK, Aloisi JD, Pickering SP, Yeo CJ: Nitric oxide modulates water and electrolyte transport in the ileum. *Ann Surg.* 1994;219:382-8.
99. Higashi Y, Oshima T, Ono N, Hiraga H, Yoshimura M, Watanabe M, Matsuura H, Kambe M, Kajiyama G: Intravenous administration of L-arginine inhibits angiotensin-converting enzyme in humans. *J Clin Endocrinol Metab.* 1995;80:2198-202.
100. Suchner U, Heyland DK, Peter K: Immune-modulatory actions of arginine in the critically ill. *Br J Nutr.* 2002;87 Suppl 1:S121-32.
101. Matthes H, Herbst H, Schuppan D, Stallmach A, Milani S, Stein H, Riecken EO: Cellular localization of procollagen gene transcripts in inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology.* 1992 ;102:431-42.
102. Berthrong M: Pathologic changes secondary to radiation. *World J Surg.* 1986;10:155-70.
103. Dou Y, Fan Y, Zhao J, Gregersen H: Longitudinal residual strain and stress-strain relationship in rat small intestine. *Biomed Eng Online.* 2006;5:37.
104. Linard C, Ropenga A, Vozenin-Brotons MC, Chapel A, Mathe D: Abdominal irradiation increases inflammatory cytokine expression and activates NF-kappaB in rat ileal muscularis layer. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2003;285:G556-65.
105. Strup-Perrot C, Vozenin-Brotons MC, Vandamme M, Linard C, Mathe D: Expression of matrix metalloproteinases and tissue inhibitor

metalloproteinases increases in X-irradiated rat ileum despite the disappearance of CD8a T cells. *World J Gastroenterol*. 2005 ;11:6312-21.

106. Bedirli A, Kerem M, Karahacioglu E, Ofluoglu E, Yilmaz TU, Pasaoglu H, Tater OP, Sakrak O, Pak Y: Effects of two conventional preoperative radiation schedules on anastomotic healing in the rat colon. *Eur Surg Res*. 2007;39:141-7.

107. Seifert WF, Wobbes T, Hoogenhout J, de Man BM, Hendriks T: Intra-operative irradiation prolongs the presence of matrix metalloproteinase activity in large bowel anastomoses of the rat. *Radiat Res*. 1997;147:354-61.

108. Savage FJ, Lacombe DL, Boulos PB, Hembry RM: Role of matrix metalloproteinases in healing of colonic anastomosis. *Dis Colon Rectum*. 1997;40:962-70.

109. Ardawi MS, Jamal YS, Ashy AA, Nasr H, Newsholme EA: Glucose and glutamine metabolism in the small intestine of septic rats. *J Lab Clin Med*. 1990;115:660-8.

110. Souba WW, Herskowitz K, Klimberg VS, Salloum RM, Plumley DA, Flynn TC, Copeland EM III: The effects of sepsis and endotoxemia on gut glutamine metabolism. *Ann Surg*. 1990;211:543-51.

111. Albina JE, Abate JA, Mastrofrancesco B: Role of ornithine as a proline precursor in healing wounds. *J Surg Res*. 1993;55:97-102.

112. Robinson EK, Kelly DP, Mercer DW, Kozar RA: Differential effects of luminal arginine and glutamine on metalloproteinase production in the postischemic gut. *J Parenter Enteral Nutr*. 2008;32:433-8.

113. Durante W: Regulation of L-arginine transport and metabolism in vascular smooth muscle cells. *Cell Biochem Biophys*. 2001;35:19-34.

114. Durante W, Johnson FK, Johnson RA: Arginase: a critical regulator of nitric oxide synthesis and vascular function. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2007;34:906-11.

115. Albina JE, Mills CD, Henry WL Jr., Caldwell MD: Temporal expression of different pathways of 1-arginine metabolism in healing wounds. *J Immunol.* 1990; 15;144:3877-80.
116. Liu XM, Chapman GB, Peyton KJ, Schafer AI, Durante W: Carbon monoxide inhibits apoptosis in vascular smooth muscle cells. *Cardiovasc Res.* 2002;55:396-405.
117. Sitren HS, Fisher H: Nitrogen retention in rats fed on diets enriched with arginine and glycine. 1. Improved N retention after trauma. *Br J Nutr.* 1977;37:195-208.
118. Cuthbertson DP, Fell GS, Tilstone WJ: Nutrition in the post-traumatic period. *Nutr Metab.* 1972;14:92-109.
119. Chang T, Lu R, Tsai L: Glutamine ameliorates mechanical obstruction-induced intestinal injury. *J Surg Res.* 2001;95:133-40.

ANEXO

Tab. A1. Peso inicial e final de cada animal por grupo.

Grupos Pesos (g)	I - Controle		II - Irrradiado		III - L- glutamina		IV - Glicina		V -L-arginina	
	inicial	final	inicial	final	inicial	final	inicial	final	inicial	final
Rato 0	298,39	323,74	301,44	284,61	278,98	287,99	282,14	232,30	280,87	292,59
Rato 1	299,08	326,12	309,60	252,20	273,90	296,20	281,84	235,24	310,35	259,24
Rato 2	285,23	302,92	309,31	234,65	282,78	297,80	286,82	271,63	289,29	234,45
Rato 3	286,67	305,90	289,96	281,52	266,20	283,66	276,18	254,02	325,10	287,80
Rato 4	312,03	345,70	317,36	305,63	278,52	278,76	284,87	295,98	302,58	Óbito
Rato 5	275,66	292,30	277,42	220,60	256,41	268,84	288,64	235,05	309,32	261,09
Rato 6	278,25	291,83	304,99	262,34	302,18	288,15	284,04	Óbito	287,98	Óbito
Rato 7	308,10	315,21	300,17	271,91	321,08	307,68	271,21	254,35	282,10	250,83
Rato 8	323,93	338,14	288,97	236,40	285,36	294,95	285,05	254,90	292,36	254,45
Rato 9	274,63	291,46	274,29	262,77	304,65	303,98	286,69	Óbito	310,98	308,35

Tab. A2. Ingestão total de ração e água por grupo de animais entre os dias 01 e 15 do experimento.

Grupos	Ração (g)		Água (ml)	
	Ratos 0 a 4	Ratos 5 a 9	Ratos 0 a 4	Ratos 5 a 9
I - Controle	1.732,5	1.614,3	2.730,0	2.640,0
II - Irrradiado	1.228,0	1.406,2	2.100,0	2.370,0
III - L- glutamina	1.578,6	1.565,9	2.320,0	2.680,0
IV - Glicina	952,3	1.109,8	2.000,0	3.270,0
V -L-arginina	1.622,0	1.403,1	2.800,0	4.080,0

Tab. A3. Espessura (mm) das camadas submucosa e muscular de cada animal dos grupos controle (I) e irradiado (II).

Grupos Animais	submucosa	Controle		IRRADIADO		
		circular interna	longitudinal externa	submucosa	circular interna	longitudinal externa
0	27,22	59,79	33,86	15,32	36,49	26,61
1	24,01	57,50	33,06	14,36	50,57	26,95
2	22,26	46,36	25,89	18,05	41,48	24,48
3	24,51	52,90	29,12	16,53	67,97	34,09
4	20,90	35,80	16,85	21,15	72,21	31,02
5	24,50	48,24	31,49	19,35	45,81	30,02
6	20,32	38,52	24,82	18,72	67,69	29,39
7	19,81	53,97	36,93	15,84	72,22	32,69
8	20,93	67,78	36,07	16,48	65,10	36,43
9	22,35	49,56	24,78	17,78	46,96	27,53

Tab. A4. Espessura (mm) das camadas submucosa e muscular de cada animal dos grupos L-glutamina (III) e glicina (IV).

Grupos Animais	GLUTAMINA			GLICINA		
	submucosa	circular interna	longitudinal externa	submucosa	circular interna	longitudinal externa
0	28,89	75,31	45,22	34,55	79,16	46,85
1	22,61	49,27	30,07	36,58	88,04	38,63
2	20,18	49,59	26,68	31,00	12,40	44,42
3	20,63	41,82	22,93	23,77	61,89	41,54
4	21,66	54,23	32,48	27,42	62,86	31,48
5	25,77	46,44	29,88	28,19	63,04	37,93
6	23,96	69,00	55,45	Óbito	Óbito	Óbito
7	28,53	61,48	43,10	27,82	72,53	34,18
8	23,23	54,25	36,16	28,20	53,20	29,26
9	23,83	67,68	43,74	Óbito	Óbito	Óbito

Tab. A5. Espessura (mm) das camadas submucosa e muscular de cada animal do grupo arginina (V).

Grupos Animais	ARGININA		
	submucosa	circular interna	longitudinal externa
0	49,26	24,39	46,70
1	31,07	66,25	33,00
2	23,69	73,83	40,07
3	25,24	61,38	29,53
4	Óbito	Óbito	Óbito
5	29,33	78,06	38,77
6	Óbito	Óbito	Óbito
7	23,34	47,36	26,32
8	24,60	73,14	47,16
9	32,75	12,70	40,56