

ETIENE DE AGUIAR PICANÇO

**EFEITO DA L-ARGININA E GLICINA
NA PAREDE DO CÓLON IRRADIADO
– ESTUDO EXPERIMENTAL EM
RATOS**

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

Orientadores: Prof. Dr. Francisco Lopes Paulo

Prof. Dr. Ruy Garcia Marques

Rio de Janeiro, RJ – Brasil

2010

ETIENE DE AGUIAR PICANÇO

**EFEITO DA L-ARGININA E GLICINA NA PAREDE
DO CÓLON IRRADIADO – ESTUDO
EXPERIMENTAL EM RATOS**

Dissertação de Mestrado

Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia e Ciências Cirúrgicas

Faculdade de Ciências Médicas

Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Rio de Janeiro, 05 de Maio de 2010.

BANCA EXAMINADORA:

**Prof. Dr. Waldemar Silva Costa (Presidente)
Universidade do Estado do Rio de Janeiro**

**Prof. Dr. Antonio Luiz de Araújo
Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro**

**Prof. Dr. Eduardo Haruo Saito
Universidade do Estado do Rio de Janeiro**

P585

Picanço, Etiene de Aguiar.

Efeito da L-arginina e glicina na parede do cólon irradiado – estudo experimental em ratos / Etiene de Aguiar Picanço. – 2009.
xii, 50f. 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. 35-43.

1. Aminoácidos na nutrição - Teses. 2. Radioterapia - Teses. 3. Cólon (Anatomia) - Doenças - Teses. 4. Suplementos dietéticos - Teses. 5. Arginina - Teses. 6. Intestinos - Doenças – Radioterapia - Teses. I. Paulo, Francisco Lopes. II. Marques, Ruy Garcia. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

CDU 613.2

UNIVERSIDADE DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO

Reitor: Prof. Dr. Ricardo Vieiralves de Castro

Vice-reitora: Prof^ª. Maria Christina Paixão Maioli

Sub-reitora de Pós-graduação e pesquisa: Prof^ª. Dra. Mônica da Costa Pereira Lavalle Heilbron

Diretor do Centro Biomédico: Prof. Dr. Paulo Roberto Volpato Dias

Diretor da Faculdade de Ciências Médicas: Prof. Plínio José da Rocha

Coordenador do Programa de Pós-graduação em Fisiopatologia e Ciências Cirúrgicas (PG-FISIOCIURGIA): Prof. Dr. Francisco José Barcellos Sampaio

Coordenador Adjunto do Programa de Pós-graduação em Fisiopatologia e Ciências Cirúrgicas (PG-FISIOCIURGIA): Prof. Dr. Ruy Garcia Marques

Ao meu pai, Aloisio Alves Picanço, e a minha mãe, Alaide de Aguiar Picanço, por
estarem sempre ao meu lado, apoiando todas as minhas decisões.

Ao meu irmão, Almir de Aguiar Picanço, por seu companheirismo e compreensão.

Ao meu marido, Fábio Rabelo Porto, pelo incentivo.

Ao meu filho Rafael.

AGRADECIMENTOS

Com a finalização desse trabalho, muitas pessoas merecem ser lembradas, pois de alguma maneira contribuíram para que essa etapa importante da minha vida fosse concluída.

Aos meus orientadores, Prof. Dr. Francisco Lopes-Paulo, pela oportunidade na participação da linha de pesquisa, da qual foi pioneiro, e Prof. Dr. Ruy Garcia Marques, pela atenção, cuidado e paciência em todas as etapas do trabalho, além do incentivo.

À doutoranda Cristina Fajardo Diestel, aluna da PG-FISIOCIRURGIA, por toda a ajuda, amizade e paciência, que me fez admirá-la, ainda mais, por sua força e, principalmente, disposição.

Ao doutorando Carlos Eduardo Rodrigues Caetano, também aluno da PG-FISIOCIRURGIA e médico veterinário do Laboratório de Cirurgia Experimental da Faculdade de Ciências Médicas da UERJ, pela realização dos procedimentos cirúrgicos dos animais.

Ao Sr. Afrânio Akreman e ao Luiz Fernando, físico e técnico em radiologia, respectivamente, do Centro Universitário de Controle do Câncer do Hospital Universitário Pedro Ernesto – UERJ, pelo auxílio na realização da irradiação dos animais.

Ao Prof. Dr. Waldemar Silva Costa, do Departamento de Anatomia Humana do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ, pela inestimável ajuda no esclarecimento de dúvidas durante a análise estereológica e por disponibilizar seu laboratório para a realização dessas análises.

À minha família, pais, irmão, marido e filho, pelo incentivo, compreensão e, até mesmo, na tentativa de ajuda nas situações de desespero, em algumas etapas deste longo percurso.

Às amigas nutricionistas Juliana Crucinsky e Mônica Vieira Mano

de Souza, mestranda e mestre, respectivamente, deste programa de pós-graduação, por toda trajetória, com situações tristes, engraçadas, desesperadoras, satisfatórias, mas, acima de tudo, de plena aprendizagem.

À doutoranda Helena Maria Figueiredo Pazos e à bolsista de iniciação científica Juliane Moraes, pelos ensinamentos técnicos e pela amizade que se construiu diante do tempo que esperávamos corar as lâminas.

Aos amigos Jorge Luiz Medeiros Júnior e Bruno Félix Patrício, mestrando e mestre, respectivamente, também desta pós-graduação, pela paciência com minhas intermináveis perguntas sobre o manejo com o microscópio, com os programas do computador e opinião sobre as fotos, além das dicas sobre o curso do trabalho.

À minha eterna chefe e amiga Abigail Geraisste e às amigas nutricionistas do Hospital Carlos Chagas, que me apoiaram e principalmente torceram por mim quando tudo isso era apenas um sonho.

À minha chefe Marília e às novas amigas do Hospital Cardoso Fontes, pela amizade e companheirismo.

Às amigas nutricionistas Dalila Alves Peçanha, Liliane Cristina da Silva Lobo, Roberta Abreu Côrtes, Tatiana Abirached Junqueira Lopes e Thais Locha Zangali Vargas, que me incentivam, cada uma à sua maneira, desde a graduação.

ÍNDICE

Página

LISTA DE TABELA

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

RESUMO

ABSTRACT

1 – INTRODUÇÃO	1
2 – OBJETIVO	6
3 – MÉTODO	7
3.1 – Animais e grupos	7
3.2 – Composição da ração oferecida	8
3.3 – Suplementação de aminoácidos	9
3.4 – Ingestão de ração e água e variação do peso	9
3.5 – Irradiação abdominal	10
3.6 – Extração dos segmentos intestinais	10
3.7 – Processamento histológico	11
3.8 – Estudo estereológico	11
3.9 – Análise estatística	13
3.10 – Aspectos éticos nos cuidados com os animais	13
4 – RESULTADOS	14
4.1 – Evolução dos animais	14
4.1.1 – Peso dos animais	14
4.1.2 – Ingestão de ração	15
4.1.3 – Ingestão de água	16

4.2 – Estudo estereológico	17
4.2.1 – Volume total da parede do cólon	17
4.2.2 – Volumes parciais das camadas mucosa, muscular da mucosa, submucosa e muscular própria	18
4.2.3 – Volumes parciais do epitélio e da lâmina própria da mucosa	22
4.2.4 – Superfície epitelial da mucosa	23
5 – DISCUSSÃO	25
6 – CONCLUSÃO	34
7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	35
APÊNDICE	44
ANEXO	50

LISTA DE TABELAS

	Página
Tab. 1. Composição da ração oferecida aos animais.	9
Tab. 2. Análise descritiva do percentual de variação do peso corporal nos grupos de animais.	15
Tab. 3. Análise descritiva da ingestão total de ração (g) nos grupos.	16
Tab. 4. Análise descritiva da ingestão total de água (ml) nos grupos.	17
Tab. 5. Análise descritiva do volume total da parede do cólon nos grupos de animais.	18
Tab. 6. Análise descritiva do volume parcial da camada mucosa da parede do cólon (%) nos grupos.	20
Tab. 7. Análise descritiva do volume parcial da camada muscular da mucosa da parede do cólon (%) nos grupos.	21
Tab. 8. Análise descritiva do volume parcial da camada submucosa da parede do cólon (%) nos grupos.	21
Tab. 9. Análise descritiva do volume parcial da camada muscular própria (%) da parede do cólon nos grupos.	21
Tab. 10. Análise descritiva do volume parcial do epitélio da mucosa do cólon (%) nos grupos.	22
Tab. 11. Análise descritiva do volume parcial da lâmina própria da camada mucosa do cólon (%) nos grupos de animais.	22
Tab. 12. Análise descritiva da superfície epitelial da mucosa do cólon (mm^{-1}) nos grupos de animais.	24

LISTA DE FIGURAS

	Página
Fig. 1. Sistema-teste tipo ciclóide, utilizado para a análise estereológica sob aumento de 100 X e 400 X.	12
Fig. 2. Peso dos animais no início do experimento (A) e percentual de ganho ou alteração de peso nos diversos grupos do estudo (B).	14
Fig. 3. Ingestão de ração dos animais dos diversos grupos durante o estudo.	15
Fig. 4. Ingestão de água dos animais dos diversos grupos durante o estudo.	16
Fig. 5. Comparação do volume total da parede do cólon entre os grupos de animais.	17
Fig. 6. Fotomicrografia da parede do cólon dos grupos Controle (A), Irradiado (B), Arginina (C) e Glicina (D) sob aumento de 100 X.	19
Fig. 7. Comparação dos percentuais dos volumes parciais das camadas mucosa (A), muscular da mucosa (B), submucosa (C) e muscular própria (D) da parede do cólon entre os grupos de animais.	20
Fig. 8. Comparação do volume parcial do epitélio (%) (A) e da lâmina própria (B) da mucosa do cólon entre os grupos de animais.	23
Fig. 9. Comparação da superfície epitelial (mm^{-1}) da mucosa do cólon entre os grupos de animais.	23
Fig. 10. Fotomicrografia da camada mucosa da parede do cólon dos grupos Controle (A), Irradiado (B), Arginina (C) e Glicina (D) sob aumento de 400 X.	24

LISTAS DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

μg – micrograma

μm – micrômetro

ANOVA – análise de variância

cGy – centigrays

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

d – comprimento do arco ciclóide do sistema-teste

DP – desvio padrão

I epi – número total de intercessões

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

L – levógero (ex. L-arginina)

máx – máximo

MeV – *megaelectron volt*

mín – mínimo

mm^{-1} – 1 / milímetro

n – tamanho da amostra

NO – *nitric oxide* (óxido nítrico)

P epi – número total de pontos da grade que incidem sobre o epitélio

UERJ – Universidade do Estado do Rio de Janeiro

RESUMO

A radioterapia é amplamente utilizada no tratamento de tumores pélvicos, incluindo os de bexiga, intestino e reto. Ela apresenta efeitos danosos, notadamente em tecidos que apresentam intensa renovação celular, sendo a mucosa intestinal altamente susceptível. Nesse contexto, a suplementação dietética com aminoácidos tem se mostrado uma terapia promissora para minimizar este dano. O objetivo desse estudo foi determinar o efeito da suplementação dietética com os aminoácidos L-arginina e glicina na estrutura da parede do cólon de ratos submetidos a irradiação abdominal. Quarenta ratos *Wistar* machos adultos foram distribuídos aleatoriamente em quatro grupos, cada um com dez animais: I – controle não irradiado e sem suplementação de aminoácidos; II – controle irradiado e sem suplementação de aminoácidos; III – irradiado e suplementado com L-arginina; IV – irradiado e suplementado com glicina. O período de suplementação dietética foi de 14 dias, com a irradiação ocorrendo no 8.º dia do experimento. A análise estereológica mostrou que a irradiação provocou diminuição do volume total da parede colônica dos animais dos grupos II e III em relação aos animais saudáveis, mas não dos ratos que receberam suplementação de glicina. A camada mucosa dos animais irradiados de todos os grupos diminuiu quando comparada com os ratos saudáveis não irradiados. Os animais irradiados que não receberam suplementação de aminoácido apresentaram diminuição da camada muscular da mucosa, quando comparados com os grupos I e IV, e o grupo de ratos suplementados com glicina apresentou aumento significativo da camada submucosa em relação aos grupos I e II. Os animais do grupo III mostraram diminuição da camada muscular própria em comparação aos grupos I e IV. A suplementação com L-arginina foi eficaz na manutenção do volume parcial do epitélio da camada mucosa. Nossos resultados

sugerem que a suplementação de glicina apresentou efeitos superiores ao da suplementação com L-arginina na estrutura da parede colônica, haja vista que foi capaz de manter a espessura da parede e a superfície epitelial da mucosa, enquanto a L-arginina foi capaz de manter o volume parcial do epitélio e a superfície epitelial, mas não o volume total da parede intestinal.

Palavras chave – Arginina, Glicina, Radioterapia, Colite, Nutrição.

ABSTRACT

Radiotherapy is widely used for the treatment of pelvic tumors, including malignancies of the bladder, intestine, and rectum. Radiotherapy has harmful effects, especially on tissues with intense cellular turnover, with the intestinal mucosa being highly susceptible. Within this context, dietary amino acid supplementation has proved to be a promising therapy for the minimization of this damage. The objective of the present study was to determine the effect of dietary supplementation with the amino acids L-arginine and glycine on the structure of the colon wall of rats submitted to abdominal irradiation. Forty male Wistar rats were randomly assigned to four groups of ten animals each: I – non-irradiated control with no amino acid supplementation, II – irradiated control with no amino acid supplementation, III – irradiated group supplemented with L-arginine, and IV – irradiated group supplemented with glycine. The animals received dietary supplementation for 14 days, with irradiation being applied on the 8th day of the experiment. Stereologic analysis showed that irradiation induced a reduction of the total volume of the colon wall of group II and III animals compared to healthy controls, but not of group IV. The mucosal layer of the irradiated animals of all groups was reduced compared to healthy non-irradiated animals. The irradiated animals that did not receive amino acid supplementation presented reduction of the muscle layer of the mucosa compared to groups I and IV, and the group of rats supplemented with glycine presented a significant increase of the submucosal layer compared to groups I and II. Group III animals showed a reduction of the muscularis propria layer compared to groups I and IV. Supplementation with L-arginine was effective in maintaining the partial volume of the epithelium of the mucosal layer. The present results suggest that glycine supplementation had a superior effect on the structure of the

colon wall of rats submitted to abdominal irradiation compared to L-arginine supplementation since it was able to maintain the thickness of the wall and the epithelial surface of the mucosa, whereas L-arginine maintained the partial volume of the epithelium and the epithelial surface, but not the total volume of the intestinal wall.

Keywords – Arginine, Glycine, Radiotherapy, Colitis, Nutrition.

1 – INTRODUÇÃO

O câncer é uma enfermidade crônica multifatorial, caracterizada pelo crescimento descontrolado de células. Sua prevenção tem tomado uma dimensão importante no campo da ciência, haja vista que se constitui na primeira causa de mortalidade do mundo [1-3]. Nesse contexto, os tumores de cólon e reto encontram-se entre os mais incidentes [4-6].

Uma das opções para o tratamento de tumores pélvicos, incluindo os de bexiga, intestino e reto, é a terapia por radiação ou radioterapia [7]. Envolve o uso de raios-X, gerados a partir de aceleradores lineares, e raios gama, gerados a partir de isótopos radioativos de alta energia, para destruir as células cancerosas, com ação local, atingindo as regiões que estão sendo tratadas e tentando preservar as áreas sadias adjacentes [8]. A adequação do tratamento é traduzida pelo prolongamento da expectativa de vida, sendo utilizada, no período pré-operatório, com o objetivo de diminuir a massa tumoral, e, no período pós-operatório, para evitar a recorrência da doença [9-10].

A resposta dos tecidos à radiação depende de inúmeros fatores, como a sensibilidade do tumor, sua localização e oxigenação, assim como a qualidade, a quantidade e o tempo de administração da radiação [11]. A radioterapia ocasiona dano variável ao tecido sadio, podendo causar enterite e/ou proctite [12], evidenciadas pela diminuição da atividade proliferativa nas criptas [13], diminuição da renovação das células nas vilosidades e de sua espessura, e, conseqüentemente, limitação da superfície absorptiva da mucosa [11,14].

O dano tecidual causado pela radiação é cumulativo e progressivo e certas enfermidades associadas, que influenciam diretamente na perfusão sanguínea, como o diabetes mellitus e hipertensão arterial, assim como procedimentos cirúrgicos abdominais prévios, podem aumentar a

predisposição do paciente à enterite actínica [15-17].

A radiação tem efeitos mais danosos em tecidos que possuem intensa renovação celular, sendo a mucosa intestinal bastante susceptível aos danos causados por essa terapia [18]. O íleo terminal, cólon e o reto são os locais que mais frequentemente sofrem danos causados pela radioterapia pélvica, enquanto o jejuno e íleo proximal raramente são envolvidos [19].

Ela acarreta danos à mucosa intestinal, o que pode limitar a eficácia do tratamento, comprometendo a qualidade de vida do paciente, por provocar uma série de sintomas, como vômitos, dor abdominal e diarreia [20-22]. Além disso, também determina mudanças histológicas agudas, aumento do infiltrado inflamatório da lâmina própria e, mesmo, ulcerações [19]. Um dos resultados desses acometimentos é a translocação bacteriana, decorrente do aumento da permeabilidade intestinal e do crescimento bacteriano, e diminuição dos movimentos peristálticos [23], tendo como conseqüências o advento de lesão da mucosa intestinal e sepse [24].

Os sintomas decorrentes das lesões actínicas colorretais podem ser classificados em agudos e crônicos. A fase aguda é caracterizada por náuseas, vômitos e diarreia, com intensidade diretamente relacionada à dose de irradiação, ao tempo (frequência e duração) de tratamento e ao volume de massa corpórea irradiada [11,25]. A fase crônica pode ocorrer após alguns meses ou até mesmo após vários anos, e se manifesta pela ocorrência de estenoses, hemorragias, perfurações agudas e fístulas [25], sendo que, geralmente, os efeitos crônicos adversos são proporcionais à gravidade da lesão aguda [10,11,15].

Os efeitos colaterais precoces e tardios da radioterapia sobre os órgãos pélvicos próximos ao órgão alvo são fatores que comprometem a qualidade de vida do paciente. Portanto, os cuidados para diminuir estes efeitos e proteger o intestino dos acometimentos da fase aguda são tão relevantes quanto a sua indicação e utilização precisas [10,11].

A profilaxia medicamentosa não vem se mostrando eficaz na prevenção da enterite por irradiação e, por vezes, pode determinar piora no quadro de diarreia [15]. Muitos tipos de dietas têm sido testadas para minimizar as complicações da irradiação e, dessa forma, diminuir a carga de bactérias patogênicas, pelo estímulo do sistema imune e pelo reparo tecidual [23,26,27]. Nesse aspecto, a suplementação dietética com nutrientes específicos, como o aminoácido L-arginina, tem sido estudada como uma terapia promissora [11,23].

A L-arginina é um aminoácido dibásico, não-essencial, isto é, que pode ser sintetizado por indivíduos adultos em condições fisiológicas de homeostase [28]. Este aminoácido exerce importantes ações metabólicas, notadamente no sistema imune, sendo classificado como condicionalmente essencial em situações de trauma e estresse [23,29-31]. Isto pode ocorrer devido a uma série de fatores, incluindo uma taxa aumentada de degradação de L-arginina, redução na ingestão alimentar e, mesmo, na diminuição da sua absorção intestinal [32].

Constitui-se em um metabólito intermediário do ciclo da ureia, sendo a citrulina, sintetizada pelos rins, sua principal fonte endógena. O fato do metabolismo da glutamina no tubo digestório também originar a citrulina pode explicar algumas respostas semelhantes desses dois aminoácidos [30]. Ela age como um potente estimulador do sistema endócrino, ao aumentar a secreção de hormônio do crescimento, prolactina, insulina e glucagon. Pouco se sabe sobre os mecanismos envolvidos, porém essa função pode explicar os efeitos metabólicos positivos da L-arginina após trauma e infecção, e, particularmente, a sua função na cicatrização [30,33,34].

A L-arginina encontra-se envolvida na síntese protéica, na biossíntese de aminoácidos e de seus derivados, e no metabolismo da ureia, sendo essencial a detoxicação da amônia [28,30,33,35]. Também se constitui em um precursor biológico de óxido nítrico, que desempenha papel importante

no controle da hipertensão, disfunção miocárdica, inflamação, morte celular e na proteção contra danos oxidativos [36].

Pesquisas vêm sendo desenvolvidas com o óxido nítrico, notadamente por seu efeito no sistema imune e por proporcionar proteção a tecidos após isquemia e reperfusão, diminuindo a lesão e o acúmulo de neutrófilos [37]. Em inúmeros órgãos, a L-arginina vem sendo utilizada, com sucesso, para aumentar a síntese basal de óxido nítrico, reduzindo, dessa forma, a lesão causada pela isquemia [33,35].

O efeito imunomodulador da L-arginina vem sendo amplamente pesquisado e descrito por muitos autores [11,23,34,35,38]. Tem sido sugerido que a sua suplementação oral ou enteral poderia determinar a ocorrência de efeitos protetores na mucosa intestinal no período pós-irradiação, acelerando a cicatrização, prevenindo a translocação bacteriana e a perda de peso, podendo, dessa forma, amenizar a enterite decorrente de irradiação [11,23].

Até recentemente, outro aminoácido, a glicina, vinha sendo utilizado como aminoácido controle em experimentos com aminoácidos específicos, como a L-glutamina e a L-arginina, com o objetivo de isonitrogenar as dietas [29,39-41]. Contudo, tem-se verificado que a glicina apresenta propriedade anti-inflamatória, imunomodulatória e citoprotetora [39,40,42].

Ela consiste no menor e mais simples aminoácido, classificado como não-essencial, e é composta por uma molécula de carbono ligada a um grupo amina e a um grupo carboxila [39,40,42]. O efeito protetor da glicina foi demonstrado em modelos experimentais de algumas doenças, como hepatite alcoólica [43], artrite [44], isquemia [40,45], transplante hepático e tumores em geral [46]. Os mecanismos pelo qual esse aminoácido age ainda não são inteiramente conhecidos, mas a inibição da ativação de células inflamatórias e imunes [47-48], diminuição da formação de radicais

livres e de outros mediadores tóxicos, assim como o bloqueio da permeabilidade da membrana plasmática, são algumas das possibilidades que podem justificar os seus benefícios [40].

O papel dos aminoácidos L-arginina e glicina na proteção e no reparo da enterite actínica aguda vem sendo pesquisado por inúmeros autores [11,23,29,41]. Contudo, os dados acerca de sua atuação ainda são insuficientes e inconclusivos, notadamente no que se refere a sua função no reparo da parede colônica após radioterapia.

2 – OBJETIVO

2.1 – Objetivo geral

Determinar o efeito da suplementação dietética com os aminoácidos L-arginina e glicina na estrutura da parede do cólon de ratos adultos submetidos à irradiação abdominal.

2.2 – Objetivos específicos

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

Comparar a eficácia da suplementação dos aminoácidos L-arginina e glicina na prevenção ou redução das alterações estruturais na parede do intestino dos ratos submetidos à irradiação abdominal.

3 – MÉTODO

Foi utilizado um modelo experimental com ratos *Wistar* submetidos à irradiação abdominal, com ou sem suplementação nutricional com os aminoácidos L-arginina e/ou glicina. A avaliação foi realizada por estereologia, a partir de um segmento colônico, sendo verificados o volume total e os volumes parciais de cada camada, assim como os volumes parciais do epitélio, da lâmina própria e a superfície epitelial da camada mucosa.

A experimentação ocorreu no Laboratório de Cirurgia Experimental da Faculdade de Ciências Médicas, com a colaboração de docentes do Departamento de Anatomia Humana do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes e do Setor de Radioterapia do Centro Universitário de Controle do Câncer do Hospital Universitário Pedro Ernesto – Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ).

3.1 – Animais e grupos

Foram utilizados 40 ratos *Wistar* machos albinos adultos (*Rattus norvegicus*), com peso inicial entre 270 e 330 gramas. Os animais foram distribuídos, aleatoriamente, em quatro grupos de estudo, cada um com dez animais:

Grupo I – Controle – animais saudáveis, não submetidos à irradiação abdominal;

Grupo II – Controle – animais submetidos à irradiação abdominal;

Grupo III – animais submetidos à irradiação abdominal e a suplementação dietética com L-arginina;

Grupo IV – animais submetidos à irradiação abdominal e a suplementação dietética com glicina.

O experimento teve duração de 14 dias e os animais do grupo I, utilizados como controle para a análise estereológica da parede colônica normal, foram mantidos em condições-padrão de laboratório, enquanto os animais dos grupos II, III e IV sofreram irradiação abdominal no 8.º dia do experimento. Os animais dos grupos III e IV receberam suplementação nutricional de L-arginina ou glicina durante os 14 dias do experimento. No 15.º dia, os animais de todos os grupos foram submetidos à laparotomia para ressecção de segmento colônico, visando à realização da estereologia.

Todos os animais foram oriundos do Biotério do Laboratório de Cirurgia Experimental da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade do Estado do Rio de Janeiro e receberão ração apropriada para ratos (Focus[®], Focus 1722 Roedores Ltda) e água *ad libitum*.

Os ratos foram alojados em gaiolas apropriadas, cada uma com cinco animais, em biotério climatizado, com fotoperíodos diários (claro-escuro) de 12 horas.

3.2 – Composição da ração oferecida

Todos os grupos de animais receberam a ração Focus[®] (Focus 1722 Roedores Ltda), de acordo com as recomendações do *American Institute of Nutrition Rodents Diets* (1993) [49]. Esta ração é composta por cloreto de sódio, 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 (vitamina A, vitamina E, vitamina K, vitamina B1, vitamina B2, vitamina B6, vitamina 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)

Tab. 1. Composição da ração oferecida aos animais.

Característica / ingredientes	Percentuais (%)
Umidade (máx)	13
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

3.3 – Suplementação de aminoácidos

Os animais do grupo III e IV receberam suplementação dietética de L-arginina (L-arginine® – Sigma Aldrich) e/ou glicina (Glicina® – Vetec Química Fina Ltda), na dose de 0,65 g/kg/dia. A dose diária foi preparada em solução aquosa, em concentração de 4%, perfazendo volume final de 5 ml, administrados por via intragástrica, em *bolus*, com a utilização de um cateter orogástrico, uma vez ao dia, sempre no mesmo horário.

Os animais dos grupos I (saudáveis) e II (submetidos à irradiação abdominal, sem suplementação com aminoácidos), receberam 5 ml de água filtrada, por via intragástrica, durante os 14 dias da experimentação, administrados da mesma forma descrita anteriormente, sempre no mesmo horário.

3.4 – Ingestão de ração e água e variação do peso

O peso dos ratos, bem como a ingestão de ração e água, foram verificados diariamente, sempre no mesmo horário.

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.

3.5 – 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 8.º 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/minuto, aplicados sobre o abdome, em um campo de 6 x 4 cm, com distância fonte-pele de 100 cm. A dose 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.

3.6 – Extração dos segmentos intestinais

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

O acesso à cavidade abdominal foi realizado por laparotomia mediana, com cerca de 3 cm de extensão. Em seguida, realizou-se a ressecção do segmento colônico, com cerca de 2 cm, distando entre 6 e 8 cm da margem anal, distância esta demarcada pela introdução, através do orifício anal, de um cateter 20G (Becton-Dickinson[®]), com graduação em centímetros.

Seguiu-se a morte dos animais, por sobredose anestésica (tiopental sódico). Procedeu-se a laparorráfia, em dois planos (peritônio-aponeurótico e pele), com suturas contínuas, utilizando fio cirúrgico de polipropileno 2-0

(Prolene[®] – Ethicon[®]).

3.7 – Processamento histológico

Os segmentos intestinais foram abertos no sentido longitudinal, lavados em soro fisiológico para a retirada de detritos fecais, e distendidos 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 álcoois e incluído em parafina. Durante a inclusão, as peças, com formato plano e regular, foram posicionadas perpendicularmente ao plano da microtomia. Dessa forma, obteve-se cortes aproximadamente perpendiculares à parede intestinal.

De cada segmento intestinal, foram realizados 16 cortes, com 4 μm cada. Em seguida, oito cortes foram submetidos à coloração tricrômica de Gomori, sendo montados entre lâmina e lamínula, com resina sintética.

3.8 – Estudo estereológico

Os cortes histológicos foram analisados em sistema de microscópio computadorizado, composto por microscópio óptico biológico (BH-2[®] – Olympus[®]) 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 e aumento final entre 100 e 400 vezes. A análise estereológica foi realizada em campos aleatórios, em um total de oito campos por animal.

Sob aumento de 100 vezes, foram analisados o volume total da parede do cólon e os volumes parciais das camadas mucosa, muscular da mucosa, submucosa e muscular própria. Sob aumento de 400 vezes, foram analisados os volumes parciais ocupados na mucosa pelo epitélio e pela lâmina própria, e também foi determinada a superfície epitelial, por mm^3 de

mucosa. Essas análises foram praticadas por superposição de um sistema-teste tipo ciclóide (Fig. 1), composto por 35 arcos ciclóides e 70 pontos, as imagens dos cortes da parede colônica.

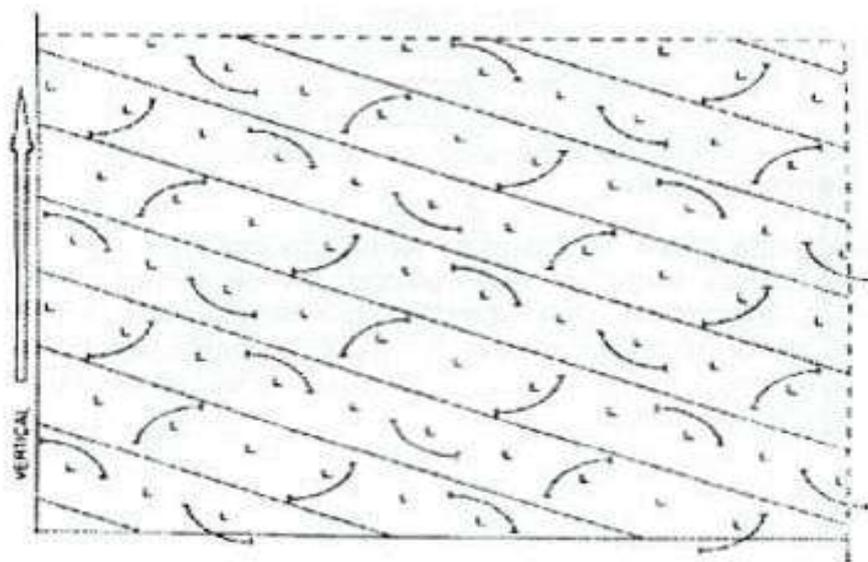


Fig. 1. Sistema-teste tipo ciclóide, utilizado para a análise estereológica, sob aumento de 100 X e 400 X [51].

Na análise do segmento colônico, considerou-se como “plano horizontal” o limite entre as camadas mucosa e submucosa, para a compensação da anisotropia. Os volumes parciais do epitélio e da lâmina própria foram calculados pela razão entre o número de pontos da grade que incidiam sobre cada um deles e o número total de pontos da grade. Para o cálculo da área de superfície epitelial, foi utilizado o número de pontos de intercessão entre os arcos ciclóide deste sistema-teste e as criptas de Lieberkühn, de acordo com a fórmula de Weibel (1979) [50], onde I_{epi} corresponde ao número total de intercessões, P_{epi} ao número total de pontos da grade que incidem sobre o epitélio e d ao comprimento do arco ciclóide da grade utilizada:

$$S_v = \frac{4 I_{epi}}{P_{epi} \cdot d}$$

3.9 – Análise estatística

As análises estatísticas visaram à comparação do grau de manutenção das características estruturais da parede do cólon dos ratos (volume total da parede do cólon, volumes parciais das camadas mucosa, muscular da mucosa, submucosa e muscular própria, volume parcial do epitélio e lâmina própria da mucosa e superfície epitelial) dos diferentes grupos de animais em estudo.

A comparação dos grupos, considerando as variáveis acima citadas, foi realizada pelo teste não-paramétrico de *Kruskal-Wallis* e pelo pós-teste de *Dunn* (usado para comparação dos grupos, dois a dois); a variação do peso e ingestão de água e ração foi realizada por análise de variância (ANOVA) – teste paramétrico – e pelo pós-teste de *Tukey* (usado para comparação dos grupos, dois a dois).

As análises foram realizadas com a utilização do programa estatístico *GraphPad Prism 4*[®] – 2003 [52]. Em todas as análises, um valor de $p \leq 0,05$ foi estabelecido para a rejeição da hipótese nula de similaridade entre os grupos.

3.10 – Aspectos éticos nos cuidados com 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 [53,54].

4 – RESULTADOS

4.1 – Evolução dos animais

Após a irradiação, um animal do grupo III (submetido à irradiação e suplementado com L-arginina) evoluiu para óbito. Nesse grupo, a análise foi realizada com nove animais.

4.1.1 – Peso dos animais

No início do experimento ($D=0$), os animais de todos os grupos não apresentaram diferença quanto ao seu peso corporal ($p>0,05$). (Fig. 2A)

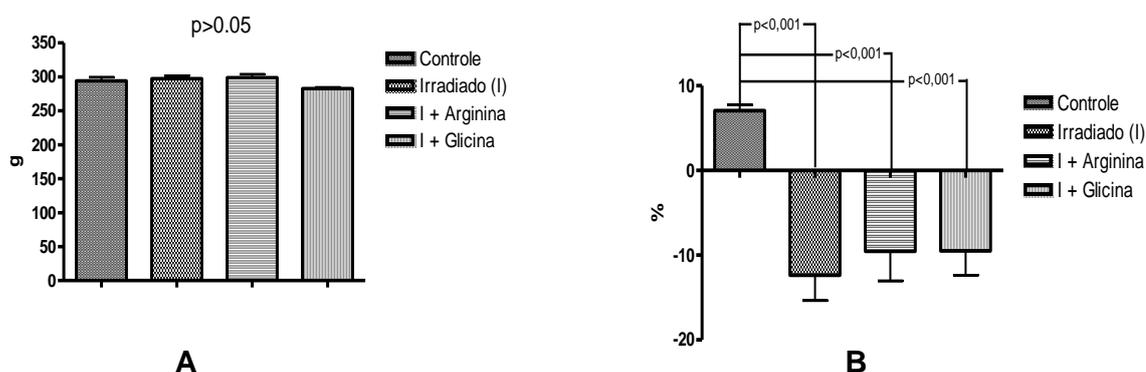


Fig. 2. Peso dos animais no início do experimento (A) e percentual de ganho ou alteração de peso nos diversos grupos do estudo (B).

Ao final do experimento, os animais dos grupos II (submetidos à irradiação e sem suplementação de aminoácidos), III (submetidos à irradiação e suplementados com L-arginina) e IV (submetidos à irradiação e suplementados com glicina) apresentaram perda de peso significativa quando comparados aos ratos do grupo I – saudáveis ($p < 0,001$ para todos) (Fig. 2B e Tab. 2)

Tab. 2. Análise descritiva do percentual de variação do peso corporal nos grupos de animais.

Grupos	n	Média	DP	Mínimo	Mediana	Máximo
I	10	7,07	2,13	3,84	6,54	10,66
II	10	-12,36	9,47	-26,85	-9,71	-1,83
III	09	-9,54	10,47	-26,11	-10,36	3,48
IV	10	-9,49	9,05	-22,51	-7,51	6,28

n – tamanho da amostra; DP – desvio padrão

4.1.2 – Ingestão de ração

Após a irradiação abdominal, observou-se uma diminuição do consumo de ração nos ratos dos grupos submetidos a esse procedimento, o que se refletiu numa ingestão total de ração menor nos animais dos grupos II, III e IV em comparação aos do grupo I ($p < 0,001$ para todos os casos). Os animais do grupo IV também ingeriram menor quantidade de ração em relação aos ratos do grupo II ($p < 0,001$). (Fig. 3 e Tab. 3)

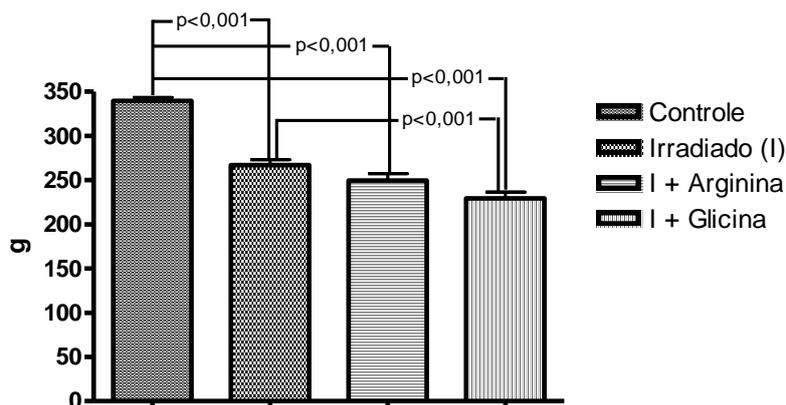


Fig. 3. Ingestão de ração dos animais dos diversos grupos durante o estudo.

Tab. 3. Análise descritiva da ingestão total de ração (g) nos grupos de animais.

Grupos	n	Média	DP	Mínimo	Mediana	Máximo
I	10	339,58	12,50	327,72	339,58	351,43
II	10	267,17	18,94	249,20	267,17	285,13
III	09	249,60	23,16	234,12	234,24	280,48
IV	10	229,35	22,51	201,61	222,23	259,72

n – tamanho da amostra; DP – desvio padrão

4.1.3. Ingestão de água

Os animais do grupo II ingeriram quantidade significativamente menor de água que os animais do grupo III ($p < 0,01$), não observando diferença entre os ratos dos demais grupos. (Fig. 4 e Tab. 4)

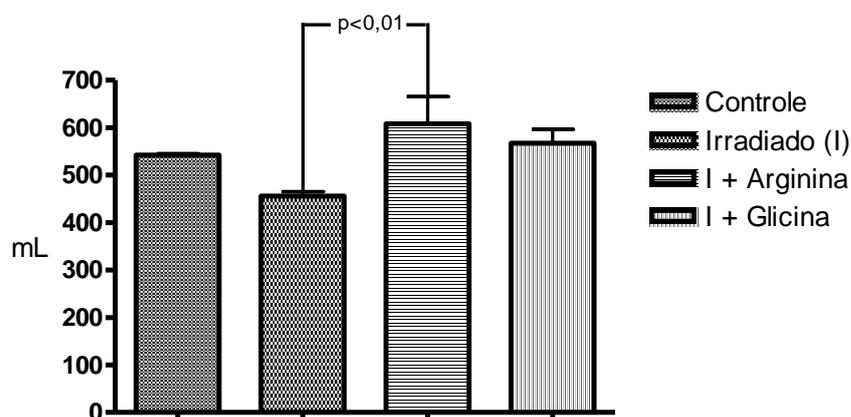


Fig. 4. Ingestão de água dos animais dos diversos grupos durante o estudo.

Tab. 4. Análise descritiva da ingestão total de água (ml) nos diferentes grupos de animais.

Grupos	n	Média	DP	Mínimo	Mediana	Máximo
I	10	542,00	9,49	533,00	542,00	551,00
II	10	456,00	28,46	429,00	456,00	483,00
III	09	608,00	171,41	446,00	620,00	816,00
IV	10	567,55	91,45	468,50	571,75	654,00

n- tamanho da amostra; DP – desvio padrão

4.2 – Estudo estereológico

4.2.1 – Volume total da parede do cólon

A radioterapia promoveu a diminuição do volume total da parede do cólon nos ratos dos grupos II e III em relação ao grupo I – controle ($p < 0,01$ e $p < 0,001$, respectivamente). Os animais do grupo IV (submetidos à irradiação abdominal e a suplementação com glicina) apresentaram volume total da parede do cólon maior que os animais do grupo III (submetidos à irradiação abdominal e a suplementação com arginina) ($p < 0,05$), porém sem diferença quando comparados aos ratos do grupo I (saudáveis). (Figs. 5 e 6 e Tab. 5)

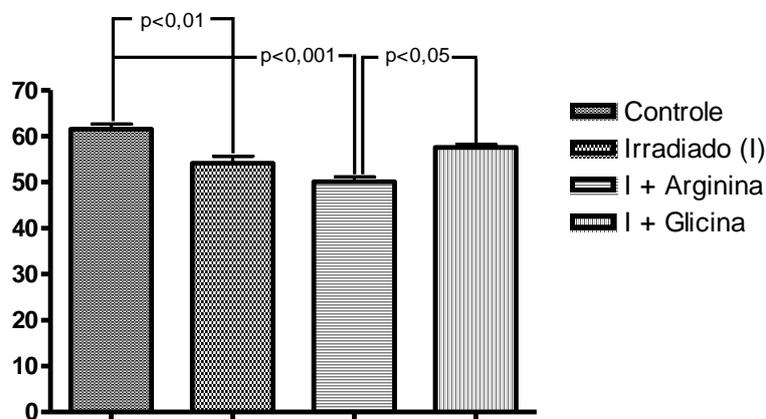


Fig. 5. Comparação do volume total da parede do cólon entre os grupos de animais

Tab. 5. Análise descritiva do volume total da parede do cólon nos diferentes grupos de animais.

Grupos	n	Média	DP	Mínimo	Mediana	Máximo
I	10	61,52	3,55	55,13	62,82	65,25
II	10	54,12	4,80	46,88	53,38	63,25
III	09	50,07	3,22	45,88	50,50	54,88
IV	10	57,53	2,00	54,50	57,69	60,88

n – tamanho da amostra; DP – desvio padrão

4.2.2 – Volumes parciais das camadas mucosa, muscular da mucosa, submucosa e muscular própria

A análise do volume parcial das diversas camadas histológicas da parede colônica evidenciou diminuição da camada mucosa nos animais dos grupos II ($p < 0,05$), III ($p < 0,01$) e IV ($p < 0,001$), quando comparados aos do grupo I (controle não irradiado). (Fig. 7A e Tab. 6)

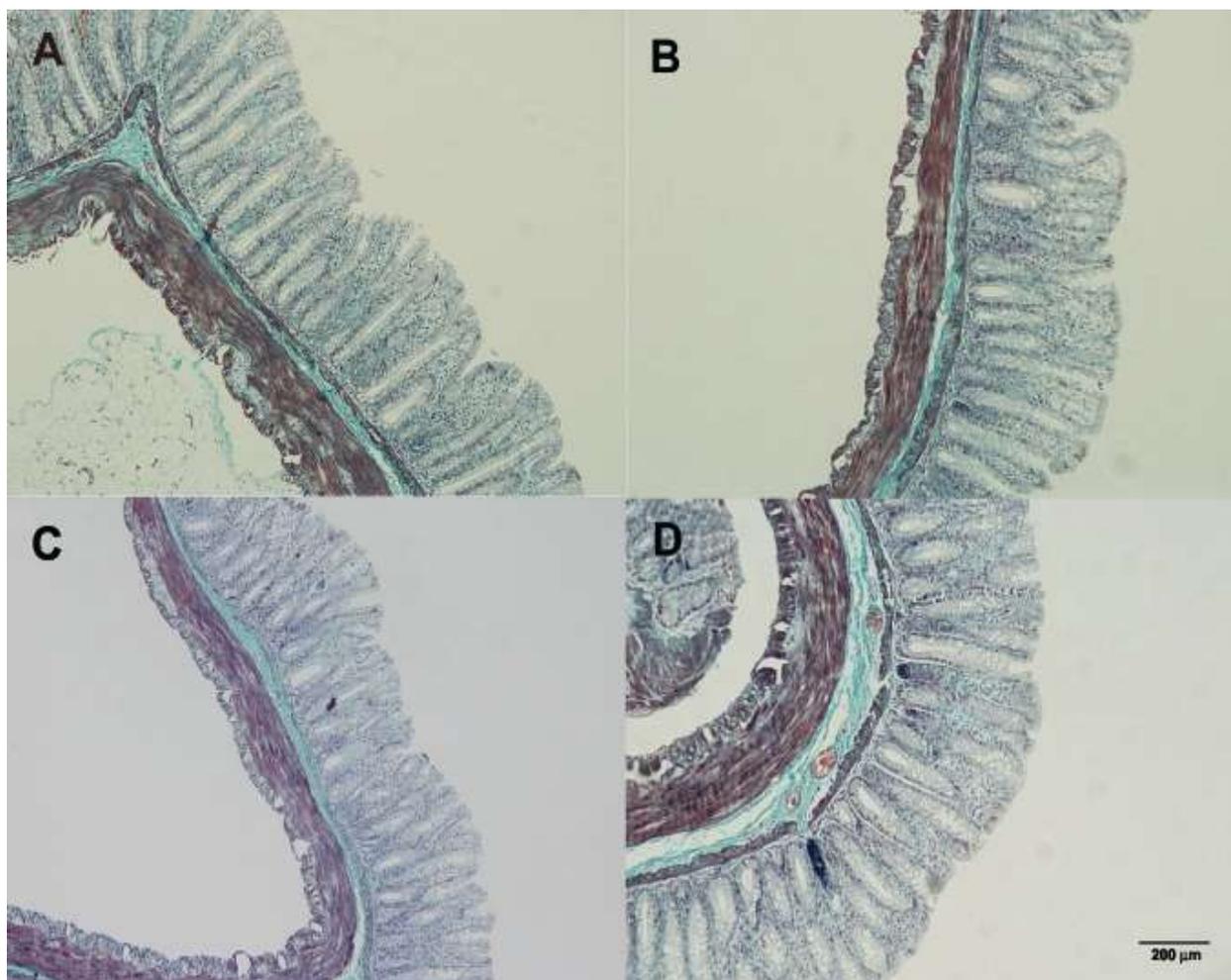


Fig. 6. Fotomicrografias da parede do cólon, submetidas à coloração tricrômica de Gomori, dos grupos Controle (A), Irradiado (B), L-arginina (C) e Glicina (D), sob aumento de 100 X.

No tocante ao volume da camada muscular da mucosa, ele se mostrou significativamente menos nos ratos do grupo II, quando comparados aos animais dos grupos I ($p < 0,001$) e IV ($p < 0,01$). (Fig. 7B e Tab. 7)

A análise estereológica da camada submucosa dos animais do grupo IV evidenciou um aumento no volume em comparação aos grupos I ($p < 0,01$) e II ($p < 0,05$). (Fig. 7C e Tab. 8)

No que se refere ao volume da camada muscular própria, ele se revelou significativamente menor nos animais do grupo III quando comparados aos grupos I e IV ($p < 0,001$ e $p < 0,01$, respectivamente). (Fig. 7D e Tab. 9)

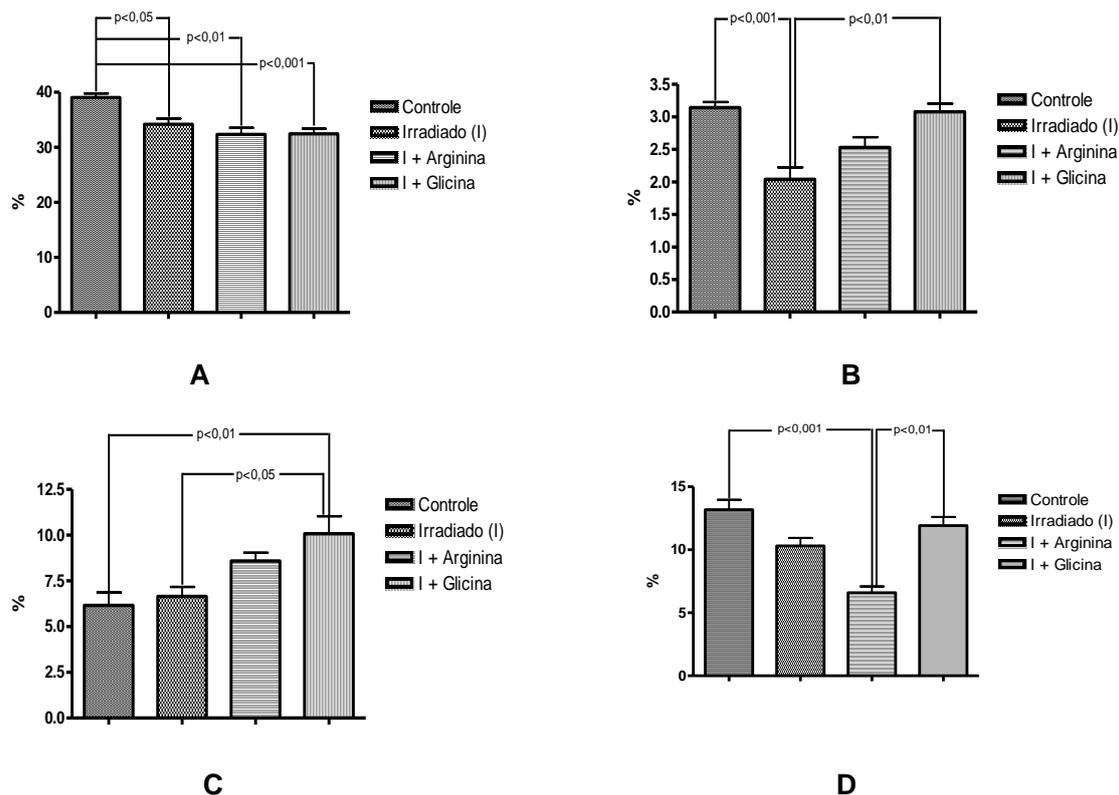


Fig. 7. Comparação dos percentuais dos volumes parciais das camadas mucosa (A), muscular da mucosa (B), submucosa (C) e muscular própria (D) da parede do cólon entre os grupos de animais.

Tab. 6. Análise descritiva do volume parcial da camada mucosa da parede do cólon (%) nos diferentes grupos de animais.

Grupos	n	Média	DP	Mínimo	Mediana	Máximo
I	10	39,04	2,31	36,13	39,07	44,13
II	10	34,77	3,65	27,88	35,57	39,88
III	09	32,36	3,59	26,63	34,00	37,13
IV	10	32,47	2,89	27,38	31,82	38,25

n – tamanho da amostra; DP – desvio padrão

Tab. 7. Análise descritiva do volume parcial da camada muscular da mucosa da parede do cólon (%) nos diferentes grupos de animais.

Grupos	n	Média	DP	Mínimo	Mediana	Máximo
I	10	3,14	0,27	2,63	3,19	3,38
II	10	2,04	0,58	1,25	2,25	2,75
III	09	2,53	0,47	2,00	2,63	3,50
IV	10	3,08	0,40	2,25	3,13	3,50

n – tamanho da amostra; DP – desvio padrão

Tab. 8. Análise descritiva do volume parcial da camada submucosa da parede do cólon (%) nos diferentes grupos de animais.

Grupos	N	Média	DP	Mínimo	Mediana	Máximo
I	10	6,17	2,23	3,75	5,88	9,88
II	10	6,65	1,64	4,00	7,07	8,75
III	09	8,59	1,34	6,50	8,38	11,25
IV	10	10,08	3,04	5,00	10,57	14,75

n – tamanho da amostra; DP – desvio padrão

Tab. 9. Análise descritiva do volume parcial da camada muscular própria (%) da parede do cólon nos diferentes grupos de animais.

Grupos	N	Média	DP	Mínimo	Mediana	Máximo
I	10	13,18	2,50	8,25	13,38	16,63
II	10	10,67	2,32	6,75	11,00	13,88
III	09	6,60	1,48	4,25	6,75	8,38
IV	10	11,92	2,20	8,50	11,26	15,25

n – tamanho da amostra; DP – desvio padrão

4.2.3 – Volumes parciais do epitélio e da lâmina própria da mucosa

Na avaliação do volume parcial do epitélio da camada mucosa observou-se que os animais dos grupos II e IV apresentaram redução desse parâmetro em comparação aos ratos do grupo I ($p < 0,001$ e $p < 0,01$; respectivamente). Essa redução também foi observada nos animais do grupo II em relação ao grupo III ($p < 0,05$). (Fig.8A e Tab.10)

O volume parcial da lâmina própria nos ratos dos grupos II e IV mostrou-se aumentado em comparação aos animais do grupo controle (grupo I) ($p < 0,001$ e $p < 0,01$, respectivamente). O aumento da lâmina própria também foi evidenciado nos animais dos grupos II, em relação ao grupo III ($p < 0,05$). (Fig. 8B e Tab. 11)

Tab. 10. Análise descritiva do volume parcial do epitélio (%) da mucosa do cólon nos diferentes grupos de animais.

Grupos	n	Média	DP	Mínimo	Mediana	Máximo
I	10	54,65	1,52	52,63	54,94	56,38
II	10	41,58	2,02	39,00	41,44	46,38
III	09	45,74	2,07	42,38	45,88	49,25
IV	10	43,52	1,96	40,88	43,57	47,38

n – tamanho da amostra; DP – desvio padrão

Tab. 11. Análise descritiva do volume parcial da lâmina própria (%) da camada mucosa do cólon nos diferentes grupos de animais.

Grupos	n	Média	DP	Mínimo	Mediana	Máximo
I	10	13,45	1,31	11,13	13,63	14,88
II	10	25,01	2,74	19,50	24,50	29,00
III	09	20,70	2,15	17,25	22,00	22,88
IV	10	22,09	1,69	19,25	22,00	24,25

n – tamanho da amostra; DP – desvio padrão

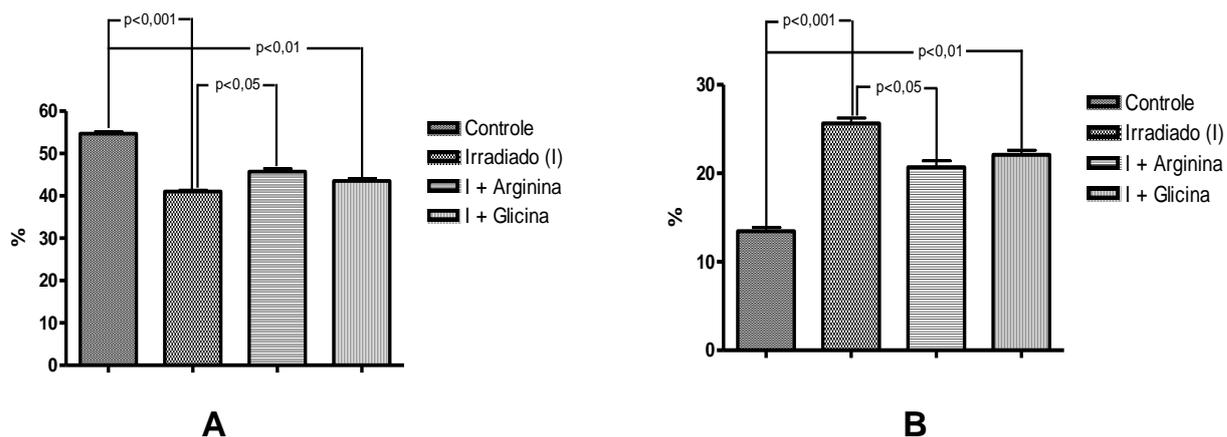


Fig. 8. Comparação do volume parcial do epitélio (%) (A) e da lâmina própria (B) da mucosa do cólon entre os grupos de animais.

4.2.4 – Superfície epitelial da mucosa

A superfície epitelial da mucosa colônica dos animais do grupo II (irradiados, sem suplementação dietética) apresentou-se significativamente diminuída em relação a dos animais dos grupos I (controle) e III ($p < 0,01$, para ambos), não sendo observada nenhuma outra diferença entre os animais dos demais grupos. (Figs. 9 e 10 e Tab.12)

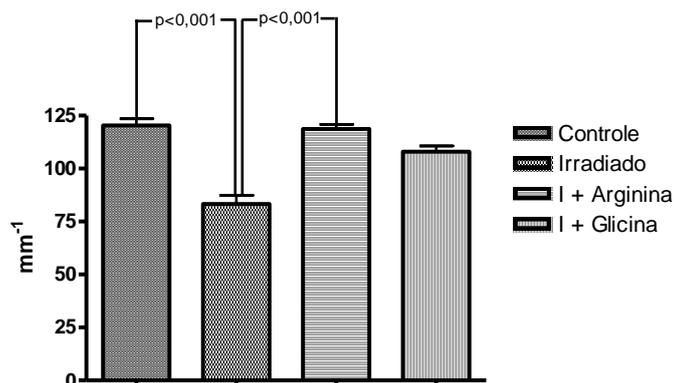


Fig. 9. Comparação da superfície epitelial (mm^{-1}) da mucosa do cólon entre os grupos de animais.

Tab. 12. Análise descritiva da superfície epitelial (mm^{-1}) da mucosa do cólon nos diferentes grupos de animais.

Grupos	n	Média	DP	Mínimo	Mediana	Máximo
I	10	120,39	9,81	107,31	118,34	141,70
II	10	83,26	12,78	62,06	83,73	98,86
III	09	118,70	6,54	108,35	119,62	126,20
IV	10	107,98	8,37	94,45	111,02	117,19

n – tamanho da amostra; DP – desvio padrão

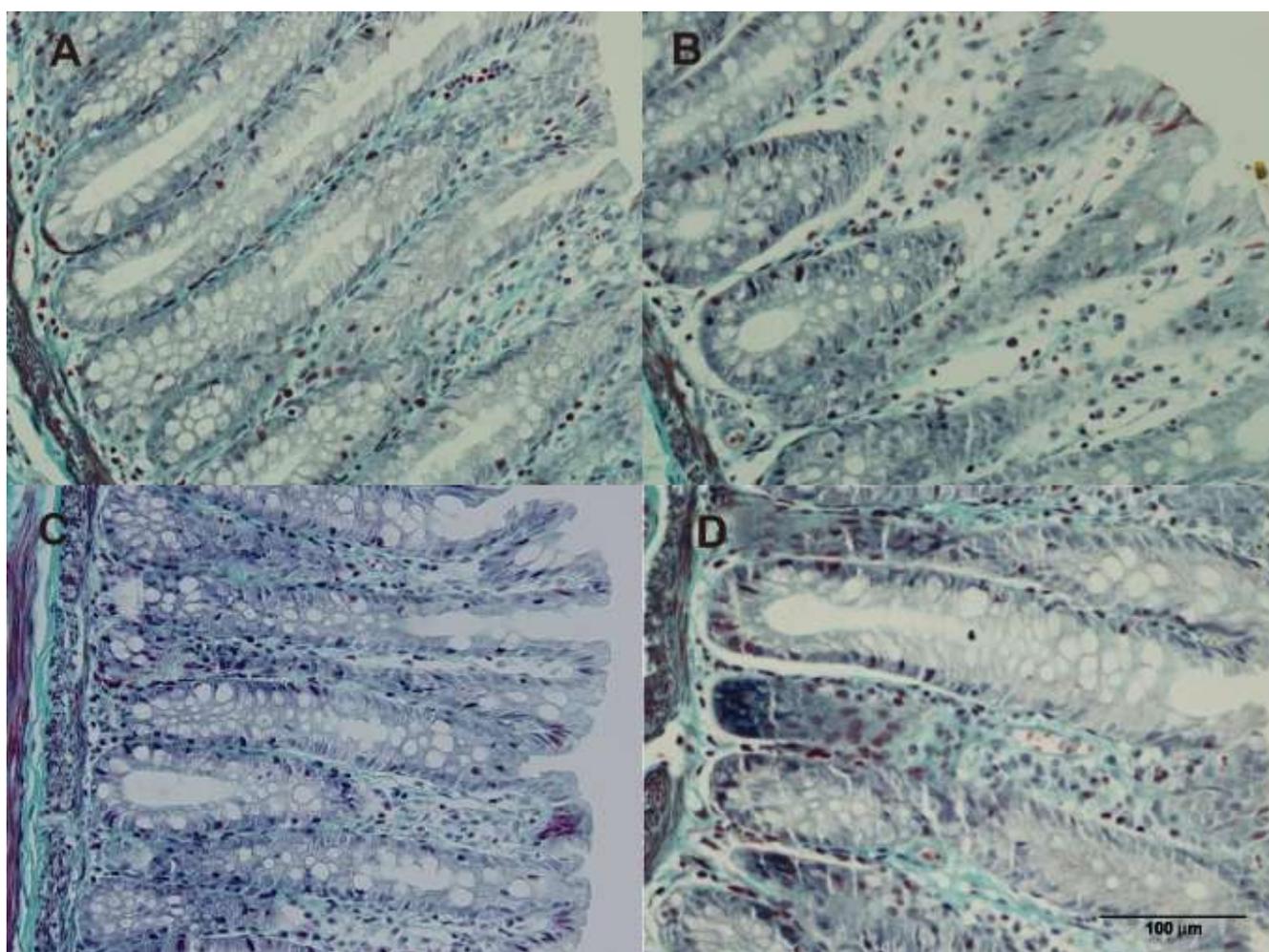


Fig. 10. Fotomicrografias da camada mucosa da parede do cólon, submetidas à coloração tricrômica de Gomori, dos grupos Controle (A), Irradiado (B), L-arginina (C) e Glicina (D), sob aumento de 400 X.

5 – DISCUSSÃO

A utilização de nutracêuticos (nutrientes com propriedades farmacológicas) na prevenção e/ou reparo de alterações estruturais e histológicas eventualmente ocasionadas nos tecidos sadios adjacentes às áreas submetidas à irradiação abdominal, como o intestino, tem sido foco de amplo debate [11,23,29,58,59].

Alguns estudos vêm descrevendo as importantes propriedades fisiológicas da L-arginina, notadamente em situações de trauma e estresse [11,23,34,35,60]. Ela age estimulando a secreção de hormônio do crescimento e a síntese de colágeno [30,33,34], caracterizando a sua participação no processo de cicatrização, além de atuar na modulação do sistema imune, ao estimular as funções de macrófagos e neutrófilos [61]. Contudo, na maioria dos casos, descrevem e avaliam a sua ação imunomoduladora em situações críticas [30,34,35,38], sendo poucos os que abordam a sua função na cicatrização tecidual [62] e, particularmente, no intestino [11,23,29].

A glicina vem sendo muito utilizada com o objetivo de isonitrogenar as dietas (aminoácido controle), em estudos cujo foco principal é a suplementação com outros aminoácidos [29,41,63,64]. Porém, recentemente, alguns autores descreveram possíveis benefícios que podem ser obtidos com a sua suplementação [39,40,42,65], além da sua atuação já conhecida na inibição da formação de radicais livres [40,66], fatores que poderiam, eventualmente, prevenir ou reparar os danos causados pela radioterapia.

Ainda não existe consenso acerca da dose ideal para a suplementação dietética com esses aminoácidos em animais. A L-arginina foi utilizada em diferentes dosagens numa série de estudos similares que avaliaram ratos submetidos a irradiação abdominal [11,23,29]. Gurbuz *et al* (1998) a

utilizaram nas dosagens de 2% e 4% do valor energético total ingerido, durante sete dias após a aplicação de dose única de 1.100 cGy de radiação [29]; Hwang *et al* (2003,) [11] estudaram animais suplementados com a dose de 2% da água ingerida três dias antes da irradiação, e com dose de radiação semelhante à utilizada por Gurbuz *et al* (1998) [29] e Ersin *et al* (2000) [23]. Em humanos, a recomendação para a sua suplementação se situa em torno de 4% a 6% do valor energético total [67].

Também não existe padronização de dose para o uso da glicina, tanto em humanos quanto em ensaios experimentais, mas ela vem sendo continuamente empregada, em diferentes doses e, muitas vezes, sem se constituir no objetivo principal de estudo [29,41]. Jacob *et al* (2003) e Kallakuri *et al* (2003) utilizaram esse aminoácido com doses de 0,5-1,0 g/kg de peso corporal, enquanto Lee *et al* (2002) a utilizaram na dose de 5% da dieta oferecida em estudos dos danos causados por isquemia e reperfusão [45,68,69].

Em uma linha de pesquisa em desenvolvimento no Laboratório de Cirurgia Experimental da Faculdade de Ciências Médicas – UERJ, desde 2004 vimos utilizando esses e outros aminoácidos, nas doses de 0,65 a 1 g/kg/dia. A dose única de radiação, correspondente a 1.164 cGy, também utilizada em outros estudos de nosso grupo, deve-se à observância do relato de diversos autores que a caracterizam como sendo capaz de provocar enterite actínica e translocação bacteriana em ratos [11,23,29].

Os animais começaram a apresentar diarreia, em média, no terceiro dia após a irradiação, período semelhante ao descrito por outros autores [41,70,71]. Sugere-se que esse efeito possa decorrer da perda da integridade epitelial, associada a alterações na motilidade e no aumento das secreções intestinais [70]. Ademais, por volta do terceiro dia após a irradiação, são evidenciados sinais de inflamação e de ulceração da mucosa intestinal [29], que também podem contribuir para o advento desse efeito

colateral.

Todos os animais submetidos à irradiação abdominal, com ou sem suplementação de aminoácidos, ingeriram quantidade menor de ração ao longo do experimento quando comparados com os animais saudáveis, confirmando o que também foi observado por Klimberg *et al.* (1990) e Diestel *et al.* (2007) [41,63]. Essa diminuição pode ser atribuída à anorexia e a efeitos colaterais (diarreia e dor abdominal), comumente observados na enterite actínica [20]. Os animais suplementados com glicina, não somente ingeriram quantidade menor de ração em comparação aos animais do grupo controle (saudáveis), como também em relação ao grupo irradiado sem suplementação. Porém, essa ingestão diminuída não foi suficiente para modificar o percentual de perda de peso dos ratos, haja vista que ela foi similar e significativa em todos os animais dos grupos irradiados, em comparação aos ratos do grupo não irradiado, que apresentaram ganho de peso, o que também foi observado por Diestel *et al.* (2007) [41].

A L-arginina regula a absorção de água e eletrólitos, pois participa do ciclo da ureia [72], e age como um importante vasodilatador, além de inibir a enzima conversora de angiotensina, um potente vasopressor [73]. Essas funções metabólicas, possivelmente, poderiam justificar o aumento significativo na ingestão de água observada nos animais que receberam a sua suplementação, quando comparados aos dos demais grupos, incluindo os saudáveis não irradiados.

A quantificação de elementos estruturais nos diversos tecidos é de grande relevância, pois em estudos anátomo-patológicos é frequente o uso de critérios subjetivos, como, por exemplo, a classificação de determinadas alterações em “leves, moderadas ou intensas”, o que torna difícil a comparação de resultados e a reprodução de experimentos. Para solucionar estas falhas, e a partir de trabalho desenvolvido pelo geólogo francês Delesse (1848), que desenvolveu um modelo para quantificar os elementos

contidos em rochas homogêneas, a estereologia tem sido usada com frequência crescente, permitindo a quantificação numérica das mais variadas estruturas, sejam elas macro ou microscópicas [74]. Essa técnica fundamenta-se em fórmulas matemáticas e geométricas, que permitem a análise tridimensional de um elemento em estudo [51,75,76].

Alguns autores ressaltam que, para ser utilizado o método estereológico, os elementos em estudo devem ser distribuídos ao acaso e homogeneamente no espaço. Dessa forma, qualquer corte bidimensional, aleatório e uniformemente isotrópico, passa a ser representativo de um todo tridimensional, independente da direção em que o corte seja realizado [50].

A mucosa intestinal não é um meio isotrópico, pois possui estruturas de orientação definida, como é o caso das criptas de Lieberkühn, que apresentam disposição paralela entre si e perpendiculares à superfície mucosa. Para contornar o problema dessas estruturas, Baddeley *et al* (1986) propuseram o método da estereologia de cortes verticais, no qual os cortes são perpendiculares a uma superfície “horizontal”, representada por um plano existente na estrutura em estudo ou criada arbitrariamente pelo pesquisador [50,77].

Avaliou-se o volume total da parede do cólon, assim como as características estruturais das camadas mucosa, muscular da mucosa, submucosa e muscular própria. A camada serosa não foi avaliada isoladamente, por ser muito delgada e de difícil visualização nos cortes histológicos, notadamente após a irradiação.

Observou-se diminuição significativa do volume total da parede do cólon nos animais submetidos à irradiação que não receberam suplementação de aminoácidos, em comparação com os ratos saudáveis do grupo controle, o que é corroborado por estudos similares [11,41]. Também em humanos, Luccichenti *et al* (2005) observaram diminuição da espessura da parede do cólon, por meio de estudo com tomografia computadorizada,

após radioterapia para tratamento de câncer de colón [78]. Esse achado pode ser atribuído ao fato da irradiação induzir o aumento da apoptose celular e da liberação e atuação de radicais livres [79].

No grupo de animais irradiados que não receberam suplementação de aminoácidos, ao avaliarmos cada camada, separadamente, observou-se que os volumes das camadas mucosa e muscular da mucosa diminuíram significativamente em relação aos ratos saudáveis, o que pode se dever ao fato dos efeitos tóxicos agudos da radioterapia serem observados com mais frequência em tecidos que contenham células de replicação rápida, como as da mucosa gastrointestinal [18]. Essa diminuição do volume na camada mucosa do cólon contribui para a atrofia do epitélio intestinal [80], aqui observada pela diminuição do volume parcial do epitélio da mucosa, e não da lâmina própria, que se mostrou significativamente aumentada devido, provavelmente, ao processo inflamatório agudo decorrente da radioterapia.

A suplementação de L-arginina não se mostrou eficaz na manutenção do volume total da parede do cólon após a irradiação, levando a valores similares aos encontrados nos animais irradiados e que não receberam suplementação de aminoácidos. No que se refere às camadas da parede colônica, no grupo suplementado com esse mesmo aminoácido observou-se a diminuição no volume da camada mucosa quando comparado aos animais saudáveis, semelhante ao observado nos animais do grupo II. Similarmente, a L-arginina não se revelou capaz de manter a espessura da camada mucosa, possivelmente por não se constituir em substrato preponderante para o epitélio intestinal, ratificando os resultados observados por Ersin *et al* (2000), em estudo similar [23].

Grande parte das funções da L-arginina advém da ação de seus metabólitos, principalmente NO, que é produzido por uma família de enzimas denominadas óxido nítrico-sintases (NOS), existentes nas isoformas indutiva (iNOS) e constitutiva (cNOS) [81]. A isoforma indutiva,

como o nome revela, deve ser induzida, e geralmente é ativada por citocinas e endotoxinas em situações de estresse, como, por exemplo na radioterapia, e produz grandes quantidades de NO por períodos prolongados de tempo, o que pode gerar desarranjos na mucosa intestinal, por inibir a proliferação celular [38] e aumentar a apoptose [82]. A iNOS aumenta a expressão do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) que também contribui para a morte celular programada [21]. A isoforma constitutiva está sempre presente no organismo em níveis basais, não tendo a sua expressão induzida e sendo capaz de reduzir a sequela da inflamação intestinal aguda [83]. Assim, pode-se especular que, além da irradiação, a suplementação de L-arginina estimulou a produção exacerbada de NO pela atividade da iNOS, prejudicando a recuperação estrutural da mucosa colônica irradiada. MacNaughton *et al* (1998) mostraram que ratos submetidos à irradiação abdominal com 1.000 cGy, sem suplementação dietética com aminoácidos, não tiveram expressão aumentada significativa de iNOS no cólon, mas apenas no íleo, embora a sua observação tenha se dado em menor período de tempo (até 48 horas) [84].

As óxido nítrico-sintases também atuam como reguladoras da ação da enzima arginase, haja vista que competem pelo mesmo substrato, a L-arginina [33,85]. Essa enzima metaboliza a L-arginina em ornitina [86], que é precursora de prolina, um importante aminoácido da molécula de colágeno. A arginase atua nas células musculares lisas, induzindo a produção dessa proteína. Poder-se-ia supor que, pelo aumento da produção de óxido nítrico (pela ação da iNOS) ocorreu inibição da sua ação, levando a diminuição significativa do volume da camada muscular própria nos ratos do grupo III, quando comparados aos animais não irradiados.

Em ratos submetidos à laparotomia, sem suplementação dietética com aminoácidos, a atividade máxima da arginase ocorre entre 10 e 14 dias após o procedimento cirúrgico (trauma), intervalo de tempo superior ao utilizado

para análise das alterações observadas neste estudo (sete dias) [87]. A ausência de suplementação com L-arginina pode, pois, ter estimulado a produção de NO, retardando a ação da arginase.

A camada mucosa é a mais afetada pela irradiação ionizante [88], ensejando a avaliação pormenorizada do volume parcial do epitélio e lâmina própria. A L-arginina, particularmente pela ação do NO, possui papel essencial na regulação da inflamação e imunidade [86]. A suplementação exógena com esse aminoácido induz o aumento da proliferação de linfócitos e monócitos, a melhora da formação das células *T-helper* e da atividade das células *natural killer*, da citotoxicidade de macrófagos e da atividade fagocítica e da produção de citocinas [38], propriedades que tornaram esse aminoácido objeto de inúmeros estudos envolvendo imunomodulação [11,23,34,35,38]. Estes mecanismos auxiliam a compreensão dos motivos pelos quais os animais suplementados com L-arginina (grupo III) apresentaram volume parcial do epitélio e lâmina própria semelhante aos ratos saudáveis (grupo I), com manutenção da superfície epitelial. Entretanto, quando esses animais são comparados aos do grupo II (irradiados sem suplementação), verifica-se a presença de volume parcial de epitélio e da superfície epitelial significativamente maiores e de lâmina própria significativamente menor, possivelmente pelo efeito antiinflamatório proporcionado pela suplementação desse aminoácido.

A glicina se mostrou eficaz em manter o volume total da parede colônica irradiada, corroborando estudos anteriormente realizados por nosso grupo [41]. Em similaridade aos animais dos outros grupos submetidos à irradiação abdominal (II e III), a suplementação com glicina também não foi capaz de manter o volume da camada mucosa, o que pode se dever ao fato de sua ação ser mais sistêmica [39,40,42] e por não se constituir em substrato preponderante para o epitélio intestinal (o que

também ocorre com a L-arginina). Outro fator que pode ter influenciado este resultado, foi a dose de suplementação, já que Diestel *et al* (2007) utilizaram dose maior desse aminoácido (1 g/kg/dia), nesse mesmo modelo de irradiação, e observaram a manutenção desse parâmetro quando comparado ao grupo de ratos saudáveis [41].

A glicina faz parte da estrutura do colágeno [39] e é sintetizada pelas células musculares lisas que depositarão essa proteína na submucosa [89]. Com sua disponibilidade aumentada, decorrente da suplementação, houve um provável aumento na produção de colágeno após a irradiação e, possivelmente, a isso se deveu a manutenção da espessura da camada muscular desses ratos e o aumento expressivo da camada submucosa, em comparação ao grupo I (animais saudáveis) [90].

Na camada mucosa, o volume epitelial apresentou-se diminuído e o volume da lâmina própria aumentado, em relação aos ratos não irradiados (grupo I), ratificando os resultados de Diestel *et al* (2007), porém com manutenção da superfície epitelial [41]. Apesar de serem descritas na literatura as propriedades imunomoduladoras da glicina [39,40,42], não se demonstrou tais benefícios neste experimento. Devido à escassez de estudos e modelos experimentais que utilizam esse aminoácido como objeto principal da pesquisa, ainda não estão estabelecidos a dose e o tempo necessários para a sua plena atuação.

A arquitetura da camada mucosa foi mantida nos animais dos grupos em que houve suplementação com aminoácidos (glicina ou L-arginina), ainda que com menor volume parcial que o observado nos animais saudáveis. Apesar disso, os resultados desta pesquisa sugerem que a suplementação de glicina apresentou efeitos superiores ao da suplementação com L-arginina, haja vista que foi capaz de manter a espessura da parede colônica e a superfície epitelial da mucosa, enquanto que, com a L-arginina, apesar de mantidos o volume parcial do epitélio e

da superfície epitelial, ocorreu diminuição do volume total da parede intestinal.

A continuação desta linha de pesquisa se faz necessária, no intuito de se determinar a eficácia da utilização de diferentes doses destes e de outros aminoácidos, por períodos diversos, na prevenção e/ou reparo de lesões intestinais em animais submetidos à irradiação abdominal, assim como o emprego de doses maiores e fracionadas de irradiação.

6 – CONCLUSÃO

A suplementação dietética com glicina apresentou efeitos superiores ao da suplementação com L-arginina, haja vista que foi capaz de manter a espessura da parede colônica e a superfície epitelial da mucosa, enquanto a L-arginina foi capaz de manter o volume parcial do epitélio e a superfície epitelial, mas não o volume total da parede intestinal.

A suplementação dietética com L-arginina e glicina não foi capaz de reverter a perda ponderal e a diminuição da ingestão de ração dos animais causada pela irradiação.

7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. World Cancer Research Fund. Food, nutrition, and prevention of cancer: A global perspective. Washington: American Institute for Cancer Research; 1997 p.35-71.
2. World Health Organization. The World Health Report 1998: Life in the 21st century a vision for all. Geneva: WHO. 1998; p. 61-111.
3. World Cancer Research Fund 2001 [cited 1 Nov 2001]. Available from: URL: <http://www.wcrf.org>.
4. Lewis CL, Brenner AT, Griffith JM, Pignone MP: The uptake and effect of a mailed multi-modal colon cancer screening intervention: a pilot controlled trial. *Implement Sci.* 2008; 3:32.
5. Freedman NA, Slattery ML, Ballard-Barbash R, Willis G, Cann BJ, Pee D, Gail MH, Pfeiffer RM: Colorectal cancer risk prediction tool for white men and women without known susceptibility. *J Clin Oncol.* 2009; 27:686-93.
6. Garófolo A, Avesani CM, Camargob KG, Barros ME, Silva SRJ, Taddei JAAC, Sigulem, DM: Dieta e câncer: um enfoque epidemiológico. *Rev Nutr.* 2004; 17:491-505.
7. 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.
8. Prise KM, Schettino G, Folkard M, Held KD: New insights on cell death from radiation exposure. *Lancet Oncol.* 2005; 6:520-28.
9. Figueredo A, Zuraw L, Wong RK, Agboola O, Rumble RB, Tandan V: The use of preoperative radiotherapy in the management of patients with clinically resectable rectal cancer: a practice guideline. *BMC Med,* 2003; 1:1.

10. Pereira MLL, Scheidt TC, Simões MJ, Mosquette R, Gomes PO: Oxigenoterapia hiperbárica em lesões actínicas de cólon de ratas: aspectos morfológicos e morfométricos. *Acta Cir Bras.* 2004; 19:658-63.
11. Hwang JM, Chan DC, Chang TM, Tsao TY, Tsou SS, Lu RH, Tsai LM: Effects of oral arginine and glutamine on radiation-induced injury in the rat. *J Surg Res.* 2003; 109:149-54.
12. Bismar MM, Sinicrope FA: Radiation enteritis. *Curr Gastroenterol Rep.* 2002; 4:361-5.
13. 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(1Supl):S2005-95.
14. Marks G, Mohiuddin M: The surgical management of the radiation-injured intestine. *Surg Clin North Am.* 1983; 63:81-96.
15. Turtel PS, Shike M: Doenças do intestino delgado. In: Shils ME, Olson JA, Shike M, Ross AC (ed). *Tratado de Nutrição Moderna na Saúde e na Doença.* 9ª ed. Barueri: Manole; 2003. pp. 1231-41.
16. Rieger KE, Hong WJ, Tusher VG, Tang J, Tibshirani R, Chu G: Toxicity from radiation therapy associated with abnormal transcriptional responses to DNA damage. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2004; 101:6635-40.
17. Lopes-Paulo F: Efeitos da irradiação com raios-X em anastomoses colônicas: estudo estereológico experimental em ratos. *Acta Cir Bras.* 2004; 19:504-10.
18. Guzman-Stein G, Bonsack M, Liberty J, Delaney JP: Abdominal radiation causes bacterial translocation. *J Surg Res.* 1989; 46:104-7.
19. Pia de la Maza M, Gotteland M, Ramirez C, Araya M, Yudin T, Bunout D, Hirsch S: Acute nutrition and intestinal changes after pelvic radiation. *J Am Coll Nutr.* 2001; 20:637-42.
20. Andreyev HJ: Gastrointestinal problems after pelvic radiotherapy: the

past, the present and the future. *Clin Oncol (R Coll Radiol)*. 2007; 19:790-99.

21. Gremy O, Benderitter M, Linard C: Acute and persisting Th2-like immune response after fractionated colorectal γ -irradiation. *World J Gastroenterol*. 2008; 14:7075-85.

22. Linard C, Grémy O, Benderitter M: Reduction of peroxisome proliferation-activated receptor gamma expression by gamma-irradiation as a mechanism contributing to inflammatory response in rat colon: modulation by the 5-aminosalicylic acid agonist. *J Pharmacol Exp Ther*. 2008; 324:911-20.

23. 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.

24. Xavier RJ, Podolsky DK: Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature*. 2007; 448:427-34.

25. Kountoras J, Zavos C: Recent advances in the management of radiation colitis. *World J Gastroenterol*. 2008; 14: 7289-301.

26. Barbul A, Lazarou SA, Efron DT, Wasserkrug HL, Efron G: Arginine enhances wound healing and lymphocyte immune responses in humans. *Surgery*. 1990; 108: 331-6.

27. Kirk SJ, Hurson M, Regan MC, Holt DR, Wasserkrug HL, Barbul A.: Arginine stimulates wound healing and immune function in elderly human beings. *Surgery*. 1993; 114:155-9.

28. Abcouwer SF, Souba WW: Glutamina e arginina. In: Shils ME, Olson JA, Shike M, Ross AC, editors. *Tratado de Nutrição Moderna na Saúde e na Doença*. 9ª ed. Barueri: Manole; 2003. p. 597-607.

29. Gurbuz AT, Kunzelman J, Ratze EE: Supplemental dietary arginine accelerates intestinal mucosal regeneration and enhances bacterial

- clearance following radiation enteritis in rats. *J Surg Res.* 1998; 74:149-54.
30. Wu G, Jaeger LA, Bazer FW, Rhoads JM: Arginine deficiency in preterm infants: biochemical mechanisms and nutritional implications. *J Nutr Biochem.* 2004; 15:442-51.
31. Morris, SM Jr: Enzymes of arginine metabolism. *J Nutr.* 2004; 134(10 Suppl): 2743S-47S.
32. Waitzberg DL, Lotierzo PHP, Duarte AJS, Schronts E, Cerra F: Imunonutrição. In: Waitzberg, DL (ed). *Nutrição Oral, Enteral e Parenteral na Prática Clínica.* 3a. ed. Atheneu; 2001. p. 1511-33.
33. Wu G, Morris SM: Arginine metabolism: nitric oxide and beyond. *Biochem J.* 1998; 33:1-17.
34. Shang HF, Wang YY, Lai YN, Chiu WC, Yeh SL: Effects of arginine supplementation on mucosal immunity in rats with septic peritonitis. *Clin Nutr.* 2004; 23:561-9.
35. Quirino IE, Correia MI, Cardoso VN: The impact of arginine on bacterial translocation in an intestinal obstruction model in rats. *Clin Nutr.* 2007; 26:335-40.
36. Cerqueira NF, Hussni CA, Yoshida WB: Pathophysiology of mesenteric ischemia/reperfusion: a review. *Acta Cir Bras.* 2002; 17-417-23.
37. Serirrom S, Raharjo WH, Chotivanich K, Loareesuwan S, Kubes P, Ho M: Anti-Adhesive Effect of nitric oxide on *Plasmodium falciparum* cytoadherence under flow. *Am J Pathol.* 2003; 162:1651-60.
38. Suchner U, Heyland DK, Peter K: Immunomodulatory actions of arginine in the critically ill. *Br J Nutr.* 2002; 87(1Suppl):S121-32.
39. Hall JC: Glycine. *J Parenter Enteral Nutr.* 1998; 22:393-8.
40. Zhong Z, Wheeler MD, Li X, Froh M, Schemmer P, Yin M, Bunzendaul H, Bradford B, Lemasters JJ: Glycine: a novel antiinflammatory, immunomodulatory, and cytoprotective agent. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2003; 6:229-40.

41. 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; 22:1523-29.
42. Roth E, Zellner M, Wessner B, Strasser E, Manhart N, Oehler R, Spittler A: Glycine – an inert amino acid comes alive. *Nutrition.* 2003; 19:817-8.
43. Limuro Y, Bradford BU, Yamashina S, Rusyn I, Nakagamy M, Enomoto N, Kono H, Frey W, Forman D, Brenner D, Thurman RG: The glutathione precursor L-2-oxothiazolidine-4-carboxylic acid protects against liver injury due to chronic enteral ethanol exposure in the rat. *Hepatology.* 2000; 31:391-8.
44. Li X, Bradford BU, Wheeler MD, Stimpson SA, Pink HM, Brodie TA, Shwab JH: Dietary glycine prevents peptidoglycan polysaccharide-induced reactive arthritis in the rat: role for glycine-gated chloride channel. *Infect Immun.* 2001; 69:5883-91.
45. 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.
46. 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.
47. 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.
48. 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.
49. Reeves PG: Components of the AIN-93 diets as improvements in the AIN-76A diet. *J Nutr.* 1997; 127(5 Suppl):S838-41.

50. Weibel ER: Stereological Methods. Practical methods for biological morphometry. Vol 1. London: Academic Press; 1979.
51. Mandarim-de-Lacerda CA: Métodos quantitativos em morfologia. Rio de Janeiro: EdUERJ; 1995.
52. Graph Pad Softwares. Graph Pad Prism[®]. CD-ROM, version 4.00 for Windows. San Diego, California, USA; 2003.
53. Petroianu A: Aspectos éticos na pesquisa em animais. Acta Cir Bras. 1996; 11:157-64.
54. Marques RG, Morales MM, Petroianu A: Brazilian law for scientific use of animals. Acta Cir Bras. 2009; 24:69-74.
55. Breiter N, Trott KR: The pathogenesis of the chronic radiation ulcer of the large bowel in rats. Br J Cancer. 1986; 53(7 Suppl): S29-30.
56. Shanna B, Pandey D, Chauhan V, Gupta D, Mokta J, Thakur SS: Radiation proctitis. JIACM. 2005; 6:146-51.
57. Mason KL, Huffnagle GB, Noverr MC, Kao JY: Overview of gut immunology. Adv Exp Med Biol. 2008; 635:1-14.
58. Nielsen OH, Vainer B, Rask-Madsen J: Non-IBD and noninfectious colitis. Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol. 2008; 5:28-39.
59. Shukla J, Chatterjee S, Thakur VS, Premachandran S, Checker R, Poduval TB: L-Arginine reverses radiation-induced immune dysfunction: the need for optimum treatment window. Radiat Res. 2009; 171:180-7.
60. Mañé J, Fernández-Bañares F, Ojanguren I, Castellá E, Bertrán X, Bartoli R, Alvarez M, Gassull MA: Effect of L-arginine on course of experimental colitis. Clin Nutr. 2001; 20:415-422.
61. Moinard C, Caldefie-Chezet F, Walrand S, Vasson MP, Cynober L: Evidence that glutamine modulates respiratory burst in stressed rat polymorphonuclear cells through its metabolism into arginine. Br J Nutr. 2002; 88:689-95.

62. Han X, Kazarinoff M, Seiler N, Stanley B: Rat colon ornithine and arginina metabolism: coordinated effects after proliferative stimuli. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2001; 280:389-99.
63. Klimberg VS, Salloum RM, Kasper M, Plumley DA, Dolson DJ, Hautamaki RD, Mendenhall WR, Bova FC, Bland KI, Copeland EM: Oral glutamine accelerates healing of the small intestine and improves outcome after whole abdominal radiation. *Arch Surg.* 1990;125:1040-5.
64. Souba WW, Klimberg VS, Hautamaki RD, Mendenhall WH, Bova FC, Howard RJ, Bland KI, Copeland EM: Oral glutamine reduces bacterial translocation following abdominal radiation. *J Surg Res.* 1990; 48:1-5.
65. Tsune I, Ikejima K, Hirose M, Yoshikawa M: Dietary glycine prevents chemical-induced experimental colitis in rat. *Gastroenterology.* 2003; 125:775-85.
66. Jackson AA: The glycine story. *Eur J Clin Nutr.* 1991; 45:59-65.
67. Baxter YC, Borghi R: Nutrientes imunomoduladores e suas aplicações. In: Silva SMC, Mura JP (ed). *Tratado de alimentação, nutrição e dietoterapia.* 1ª. ed. São Paulo 2007. pp. 917-40.
68. 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.
69. Lee MA, McCauley RD, Kong SE, Hall JC: Influence of glycine on intestinal ischemia-reperfusion injury. *J Parenter Enteral Nutr.* 2002; 26:130-5.
70. Picard C, Wysocki J, Fioramonti J, Griffiths NM: Intestinal and colonic motor alterations associated with irradiation-induced diarrhoea in rats. *Neurogastroenterol Motil.* 2001; 13:19-26.
71. Huang EY, Wang CJ, Hsu HC, Sun LM: Characteristics and predictive factors of early – onset diarrhea during pelvic irradiation. *Br J Radiol.* 2006; 79:419-24.

72. Barry MK, Aloisi JD, Pickering SP, Yeo CJ: Nitric oxide modulates water and electrolyte transport in the ileum. *Ann Surg.* 1994; 219:382-8.
73. 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.
74. Lopes-Paulo F: Emprego da estereologia em pesquisas colorretais. *Rev Bras Coloproct.* 2002; 22:73-6.
75. Mandarim-de-Lacerda CA. Stereology in normal and pathological research. *Biomed Res.* 1998; 9:153-63.
76. Mandarim-de-Lacerda CA: Stereological tools in biomedical research. *An Acad Bras Cienc.* 2003; 75:469-86.
77. Baddeley AJ, Gundersen HJ, Cruz-Orive LM: Estimation of surface area from vertical sections. *J Microsc.* 1986; 142:259-76.
78. Luccichenti G, Cademartiri F, Sianesi M, Roncoroni L, Pavone P, Krestin GP: Radiologic assessment of rectosigmoid cancer before and after neoadjuvant radiation therapy: comparison between quantitation techniques. *Am J Roentgenol.* 2005; 184:526-30.
79. 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.
80. Fajardo LF: The pathology of ionizing radiation as defined by morphologic patterns. *Acta Oncol.* 2005; 44:13-22.
81. Salzman AL: Nitric oxide in the gut. *New Horiz.* 1995; 3:33-45.
82. 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
83. Alican L, Kubes P: A critical role for nitric oxide in intestinal barrier function and dysfunctions. *Am J Physiol.* 1996; 33:225-37.

84. MacNaughton WK, Aurora AR, Bhamra J, Sharkey KA, Miller MJ: Expression, activity, and cellular localization of inducible nitric oxide synthase in rat ileum and colon post-irradiation. *Int J Radiat Biol.* 1998; 74:255-64.
85. 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.
86. Albina JE, Abate JA, Mastrofrancesco B: Role of ornithine as a proline precursor in healing wounds. *J Surg Res.* 1993; 55:97-102.
87. Witte MB, Vogt N, Stuelten C, Gotoh T, Mori M, Becker HD: Arginase acts as an alternative pathway of L-arginine metabolism in experimental colon anastomosis. *J Gastrointest Surg.* 2003; 7:378-85.
88. Igaki H, Nakagawa K, Uozaki H, Akahane M, Hosoi Y, Fukayama M, Miyagawa K, Akashi M, Ohtomo K, Malkawa K: Pathological changes in the gastrointestinal tract of a heavily radiation-exposed worker at the Tokai-mura criticality accident. *J Radiat Res.* 2008; 49:55-62.
89. 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.
90. 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.

APÊNDICE

Tab. A1. Peso inicial e final (em gramas) e percentuais de variação ponderal de cada animal, por grupo de estudo.

Animal		Grupo I	Grupo II	Grupo III	Grupo IV
1	I	298,39	301,44	280,87	282,14
	F	324,62	284,08	290,64	218,62
	VP	8,79	- 5,76	3,48	- 22,51
2	I	299,08	309,60	310,35	281,84
	F	324,29	241,64	244,67	231,56
	VP	8,43	- 21,95	- 21,16	- 17,84
3	I	285,23	309,31	289,29	286,82
	F	311,54	226,27	213,77	283,79
	VP	9,22	- 26,85	- 26,11	- 1,06
4	I	286,67	289,96	325,10	276,18
	F	305,81	284,64	290,17	258,68
	VP	6,68	- 1,83	- 10,74	- 6,84
5	I	312,03	317,36	Óbito	284,87
	F	345,29	309,61		302,75
	VP	10,66	- 2,44		6,28
6	I	275,66	277,42	309,32	288,64
	F	293,28	216,45	257,90	226,87
	VP	6,39	-21,98	- 16,62	- 21,56
7	I	278,25	304,99	287,98	284,04
	F	292,27	274,42	294,76	266,87
	VP	5,04	- 10,02	2,35	- 6,04
8	I	308,10	300,17	282,10	271,21
	F	319,93	271,97	262,27	253,04
	VP	3,84	- 9,39	- 7,03	- 6,70
9	I	323,93	288,97	292,36	285,05
	F	342,03	230,51	262,06	254,17
	VP	5,59	- 20,23	- 10,36	- 10,83
10	I	274,63	274,29	310,98	286,69
	F	291,18	265,53	312,04	262,85
	VP	6,03	- 3,39	0,34	- 8,32

I – peso inicial; F – peso final; VP – variação ponderal

Tab. A2. Ingestão total de ração de cada animal, por grupo de estudo, entre os dias 01 e 15 do experimento.

Animal	Grupo I	Grupo II	Grupo III	Grupo IV
1	351,43	249,20	234,12	201,61
2	351,43	249,20	234,24	201,61
3	351,43	249,20	234,12	259,72
4	351,43	249,20	234,24	259,72
5	351,43	249,20	Óbito	259,72
6	327,72	285,13	234,12	222,23
7	327,72	285,13	280,48	222,23
8	327,72	285,13	280,48	222,23
9	327,72	285,13	234,12	222,23
10	327,72	285,13	280,48	222,23

Tab. A3. Ingestão total de água de cada animal, por grupo de estudo, entre os dias 01 e 15 do experimento.

Animal	Grupo I	Grupo II	Grupo III	Grupo IV
1	551,00	429,00	446,00	468,50
2	551,00	429,00	620,00	468,50
3	551,00	429,00	446,00	489,50
4	551,00	429,00	620,00	489,50
5	551,00	429,00	Óbito	489,50
6	533,00	483,00	446,00	654,00
7	533,00	483,00	816,00	654,00
8	533,00	483,00	816,00	654,00
9	533,00	483,00	446,00	654,00
10	533,00	483,00	816,00	654,00

Tab. A4. Volumes totais da parede do cólon de cada animal, por grupo de estudo.

Animal	Grupo I	Grupo II	Grupo III	Grupo IV
1	58,75	54,75	50,50	60,88
2	59,38	57,25	51,13	59,25
3	64,63	59,00	54,88	55,13
4	65,25	53,88	47,75	57,38
5	55,13	48,88	Óbito	56,88
6	63,75	51,50	53,88	55,88
7	57,63	63,25	45,88	58,13
8	61,88	46,88	52,00	58,00
9	64,75	52,88	48,38	54,50
10	64,00	52,88	46,25	59,25

Tab. A5. Volumes parciais da camada mucosa da parede do cólon de cada animal, por grupo de estudo.

Animal	Grupo I	Grupo II	Grupo III	Grupo IV
1	39,50	36,75	34,25	34,13
2	38,75	36,88	34,75	38,25
3	40,75	37,75	35,63	31,38
4	38,63	35,00	30,88	30,75
5	36,13	30,13	Óbito	34,75
6	39,38	32,25	37,13	31,63
7	36,88	34,20	26,63	32,00
8	36,75	27,88	34,00	31,00
9	44,13	35,38	29,13	27,38
10	39,50	35,75	28,88	33,38

Tab. A6. Volumes parciais da camada muscular da mucosa da parede do cólon de cada animal, por grupo de estudo.

Animal	Grupo I	Grupo II	Grupo III	Grupo IV
1	2,63	1,38	2,00	3,50
2	3,38	1,25	2,75	2,25
3	3,38	1,75	3,50	3,13
4	3,38	1,25	2,00	2,63
5	2,88	2,50	Óbito	3,25
6	3,13	2,25	2,63	3,38
7	3,25	2,75	2,13	3,13
8	3,38	2,25	2,38	3,50
9	2,88	2,38	2,75	3,13
10	3,13	2,63	2,63	2,88

Tab. A7. Volumes parciais da camada submucosa da parede do cólon de cada animal, por grupo de estudo.

Animal	Grupo I	Grupo II	Grupo III	Grupo IV
1	3,75	4,88	8,38	14,75
2	5,00	7,38	9,38	9,25
3	3,88	7,63	11,25	5,38
4	6,88	4,00	6,50	9,38
5	5,00	6,00	Óbito	5,00
6	6,75	8,75	7,63	10,00
7	9,25	6,75	9,50	11,88
8	9,88	7,88	8,13	12,38
9	3,88	8,38	8,50	11,13
10	7,38	4,88	8,00	11,63

Tab. A8. Volumes parciais da camada muscular própria da parede do cólon de cada animal, por grupo de estudo.

Animal	Grupo I	Grupo II	Grupo III	Grupo IV
1	12,88	11,75	5,88	8,50
2	12,25	11,75	4,25	9,50
3	16,63	11,88	4,50	15,25
4	16,38	13,63	8,38	14,63
5	11,13	10,25	Óbito	13,88
6	14,50	8,25	6,50	10,88
7	8,25	10,30	7,63	11,13
8	11,88	8,88	7,50	11,13
9	13,88	6,75	8,00	12,88
10	14,00	9,63	6,75	11,38

Tab. A9. Volumes parciais do epitélio da mucosa do cólon de cada animal, por grupo de estudo.

Animal	Grupo I	Grupo II	Grupo III	Grupo IV
1	54,13	40,13	46,63	45,00
2	56,25	41,04	49,25	43,75
3	55,25	42,13	47,63	47,38
4	56,38	40,50	46,38	44,75
5	54,63	39,00	Óbito	44,38
6	52,75	41,25	45,88	41,88
7	55,50	42,00	44,38	41,75
8	52,63	40,13	42,38	43,38
9	56,25	41,63	45,38	42,00
10	52,75	42,63	43,75	40,88

Tab. A10. Volumes parciais da lâmina própria da camada mucosa do cólon de cada animal, por grupo de estudo.

Animal	Grupo I	Grupo II	Grupo III	Grupo IV
1	14,88	27,75	19,00	19,25
2	11,13	25,63	17,88	22,00
3	13,50	23,38	17,25	19,50
4	11,63	26,25	20,38	21,88
5	14,38	29,00	Óbito	21,63
6	13,75	23,63	22,13	23,13
7	12,63	24,25	22,38	23,25
8	14,88	27,50	22,88	22,00
9	13,25	24,75	22,00	24,00
10	14,50	24,13	22,38	24,25

Tab. A11. Superfície epitelial do cólon de cada animal, por grupo de estudo.

Animal	Grupo I	Grupo II	Grupo III	Grupo IV
1	141,70	98,86	124,51	116,61
2	130,16	73,34	119,62	103,45
3	122,17	78,85	124,59	99,56
4	114,16	85,79	114,75	112,80
5	122,99	91,98	Óbito	98,13
6	116,30	62,06	108,35	94,45
7	120,38	97,38	126,20	110,21
8	107,31	81,67	119,18	115,55
9	112,56	94,86	121,63	117,19
10	116,12	67,79	109,49	111,83

ANEXO



UNIVERSIDADE DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE BIOLOGIA ROBERTO ALCÂNTARA GOMES
COMISSÃO DE ÉTICA PARA O CUIDADO E USO DE ANIMAIS EXPERIMENTAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº **CEA/151/2006** sobre **"Efeitos da L-arginina na parede do cólon irradiado – Estudo experimental estereológico em ratos eutróficos"** sob a responsabilidade de **Etiene de Aguiar Picanço** está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética Para o Cuidado e Uso de Animais Experimentais do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes da UERJ (CEA), em **11/09/2006**. Este certificado expira em **11/09/2008**.

Rio de Janeiro, 11 de Setembro de 2006.

Prof. Jorge José de Carvalho
CEA/IBRAG/UERJ

Jorge José de Carvalho
Diretor
IBRAG UERJ
MEL. 2001.1