



**Universidade do Estado do Rio de Janeiro - UERJ**  
**Centro Biomédico - Faculdade de Ciências Médicas**  
**Programa de Pós - Graduação em Fisiopatologia**  
**e Ciências Cirúrgicas PG - FISIOCIRURGIA**

**A SUPLEMENTAÇÃO NUTRICIONAL COM L-ARGININA**  
**PREVINE AS MODIFICAÇÕES NA MORFOLOGIA, DENSIDADE**  
**E FATORES REGULADORES DOS VASOS SANGUÍNEOS NA**  
**PAREDE DA BEXIGA DO RATO**

**Mônica Nunes Prazeres Ribeiro**

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia e Ciências Cirúrgicas, PG-Fisiocirurgia, UERJ, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre.

**Orientador: Prof. Dr. Waldemar Silva Costa**

**Co-orientador: Prof. Dr. Francisco José Barcellos Sampaio**

**Rio de Janeiro, RJ - Brasil**

**2010**

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**Universidade do Estado do Rio de Janeiro - UERJ  
Centro Biomédico - Faculdade de Ciências Médicas  
Programa de Pós - Graduação em Fisiopatologia  
e Ciências Cirúrgicas PG - FISIOCIRURGIA**

**Mônica Nunes Prazeres Ribeiro**

**A SUPLEMENTAÇÃO NUTRICIONAL COM L-  
ARGININA PREVINE AS MODIFICAÇÕES NA  
MORFOLOGIA, DENSIDADE E FATORES  
REGULADORES DOS VASOS SANGUÍNEOS NA PAREDE  
DA BEXIGA DO RATO**

**Rio de Janeiro**

**2010**

CATALOGAÇÃO NA FONTE  
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

R484 Ribeiro, Mônica Nunes Prazeres.

A suplementação nutricional com L-arginina previne as modificações na morfologia, densidade e fatores reguladores dos vasos sanguíneos na parede da bexiga do rato / Mônica Nunes Prazeres Ribeiro. - 2010.  
xii, 67f. : il.

Orientador : Waldemar Silva Costa.

Co-orientador : Francisco José Barcellos Sampaio.

Dissertação (Mestrado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Faculdade de Ciências Médicas. Pós-Graduação em Fisiopatologia e Ciências Cirúrgicas PG - Fisiocirurgia.

Bibliografia: f. 49-53.

1. Bexiga - Teses. 2. Radiação - Teses. 3. Vasos sanguíneos - Teses. 4. Arginina - Teses. I. Costa, Waldemar Silva. II. Sampaio, Francisco José Barcellos. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

CDU 616.62

Autorizo apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta tese.

---

Assinatura

---

Data

O presente trabalho foi realizado na Unidade de Pesquisa Urogenital, Centro Biomédico, Universidade Estadual do Rio de Janeiro. Recebeu apoio financeiro, direta ou indiretamente, de CNPq, FAPERJ e CAPES.

## **AGRADECIMENTOS TÉCNICOS**

À professora Cristiane da Fonte Ramos, chefe do laboratório de Biologia Molecular, pela orientação na técnica de RT-PCR.

À Flávia Meireles Gombar, aluna de iniciação científica, pela ajuda na realização da técnica de RT-PCR.

À Carla Braga Mano Gallo pela edição das imagens.

## **CONFLITO DE INTERESSES**

Não há conflito de interesses.

# ÍNDICE

	Página
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	
RESUMO	
ABSTRACT	
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 A bexiga urinária	2
1.2 Os vasos sanguíneos	3
1.3 Radioterapia	4
1.3.1 Efeitos da radiação nos vasos	5
1.4 L-arginina	5
1.5 Fatores pró-angigênicos	7
2. OBJETIVO	8
3. MATERIAL E MÉTODOS	10
3.1 Cuidados com os animais	11
3.2 Suplementação de L-arginina	12
3.3 Radiação abdominal	13
3.4 Dissecção	14
3.5 Preparação da amostra	15
3.6 Análise morfométrica	16
3.6.1 Densidade vascular e área vascular relativa	17
3.6.2 Espessura da parede arterial	19
3.7 RT-PCR semi-quantitativo	20
3.8 Análise estatística	21
4. RESULTADOS	22
5. DISCUSSÃO	31
6. CONCLUSÃO	35
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	37
8. ANEXOS	43



## **LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

VEGF = fator de crescimento endotelial vascular (vascular endothelial growth factor)

FGF = fator de crescimento de fibroblastos (fibroblast growth factor)

RT-PCR = Reação em cadeia da polimerase com transcrição reversa (reverse transcription-polymerase chain reaction)

mRNA = ácido ribonucléico mensageiro

ON = óxido nítrico

MeV = Mega elétron volts

Gy = Gray

PBS = salina tamponada (Phosphate buffered saline)

HE = hematoxilina-eosina

µm = micrometros

c-DNA = ácido desoxirribonucléico complementar

GAPDH = Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase)

GC = grupo controle

GI = grupo irradiado

GIA = grupo irradiado suplementado com L- arginina

## **RESUMO**

### **Objetivo**

Determinar se a L-arginina tem efeitos protetores contra as alterações na morfologia e fatores regulatórios dos vasos sanguíneos vesicais, induzidas por irradiação utilizando um modelo de radiação pélvica em ratos.

### **Materiais e Métodos**

Ratos machos, com idade de 3-4 meses foram divididos nos seguintes grupos de dez animais cada: controle, que consistia em animais intactos, ratos somente irradiados, e ratos irradiados recebendo suplementação de L-arginina. A irradiação foi feita em uma sessão de 10 Gy e visava à região pélvico- abdominal. A L-arginina foi administrada uma vez por dia (0,65 g / kg de peso corporal), com início sete dias antes da irradiação e continuando até o sacrifício no 16º dia após a irradiação. A densidade, a área relativa e a espessura da parede dos vasos sanguíneos foram medidas na lâmina própria vesical utilizando métodos histológicos, e a expressão de VEGF e FGF na parede da bexiga foi avaliada por RT-PCR.

### **Resultados**

Os animais irradiados quando comparados com os animais controles, mostraram que a irradiação diminuiu a densidade e a área relativa de vasos sanguíneos de 32% ( $p < 0,01$ ) e 25% ( $p < 0,05$ ), respectivamente, e reduziu a espessura da parede arterial em 42% ( $p < 0,004$ ). Os níveis de mRNA VEGF e FGF após a irradiação foram diminuídos em 67% ( $p < 0,002$ ) e 56% ( $p < 0,04$ ), respectivamente, quando comparados com os controles. Todas essas mudanças não foram significativas nos animais irradiados suplementados com L-arginina.

### **Conclusões**

A irradiação pélvica provoca significativas alterações vesicais, como na morfologia dos vasos sanguíneos e na expressão de VEGF e FGF. Todas

essas mudanças, no entanto, foram impedidas pelo tratamento com L-arginina. Esses resultados reforçam, portanto, o uso potencial desse aminoácido como um radioprotetor.

Palavras-chave: bexiga, irradiação, vasos sanguíneo, L-arginina

## **ABSTRACT**

### **Purpose**

To determine whether L-arginine has protective effects against radiation-induced alterations in the morphology and regulatory factors of vesical blood vessels using a rat model of pelvic radiation.

### **Materials and Methods**

Male rats aged 3-4 months were divided into the following groups of ten animals each: controls, which consisted of intact animals; radiated-only rats; and radiated rats receiving L-arginine supplementation. Radiation was in one session of 10 Gy and was aimed at the pelvico-abdominal region. L-arginine was administered once a day (0.65 g/kg body weight), starting seven days before radiation and continuing until sacrifice on the 16th day after radiation. The density, relative area, and wall thickness of blood vessels were measured in the vesical lamina propria using histological methods, and the expression of VEGF and FGF in the bladder wall was assessed by RT-PCR.

### **Results**

Compared with controls, radiation alone decreased the density and relative area of blood vessels by 32% ( $p < 0.01$ ) and 25% ( $p < 0.05$ ), respectively, and reduced arterial wall thickness by 42% ( $p < 0.004$ ). VEGF and FGF mRNA levels after radiation were diminished by 67% ( $p < 0.002$ ) and 56% ( $p < 0.04$ ), respectively, when compared with controls. All these changes were significantly absent in radiated animals supplemented with L-arginine.

### **Conclusions**

Pelvic radiation leads to significant vesical modifications, as in the morphology of blood vessels and in VEGF and FGF expression. All these changes, however, were prevented by L-arginine treatment. These results

emphasize, therefore, the potential use of this aminoacid as a radioprotective drug.

Key words: bladder, radiation, blood vessels, L-arginine

# **1 – INTRODUÇÃO**

## INTRODUÇÃO

### A Bexiga Urinária

A bexiga urinária é um órgão muscular oco que recolhe a urina produzida pelos rins e funciona como um reservatório temporário [1]. É constituída por mucosa (revestida por epitélio de transição), camada muscular e adventícia.

Apesar de a urina apresentar pH e osmolaridade diferentes do plasma, ela pode ser armazenada por longos períodos sem modificação de sua composição. Isso se dá devido à presença de uma barreira de permeabilidade na bexiga que impede a passagem de moléculas da urina para o interstício [2].

A superfície interna da bexiga urinária é coberta por urotélio que apresenta de 3 a 7 camadas de células de transição as quais repousam sobre uma membrana basal composta de matriz extracelular (colágeno, glicoproteínas) [1]. As células da camada mais superficial são grandes e hexagonais e possuem regiões especializadas formadas por placas rígidas que garantem a integridade da barreira de permeabilidade da bexiga [2].

Além da membrana basal existe a lâmina própria, que é composta por tecido conjuntivo que varia de frouxo a denso [3]. Nesta área concentram-se o maior número de vasos sanguíneos [4].

O músculo liso da parede da bexiga forma o músculo detrusor. A túnica muscular é formada por três camadas, longitudinal interna, circular e longitudinal externa, entretanto essas camadas são mal definidas [3]. Os feixes musculares do detrusor apresentam um arranjo pouco regular estando aleatoriamente misturados ao colágeno [5] (Figura 1).

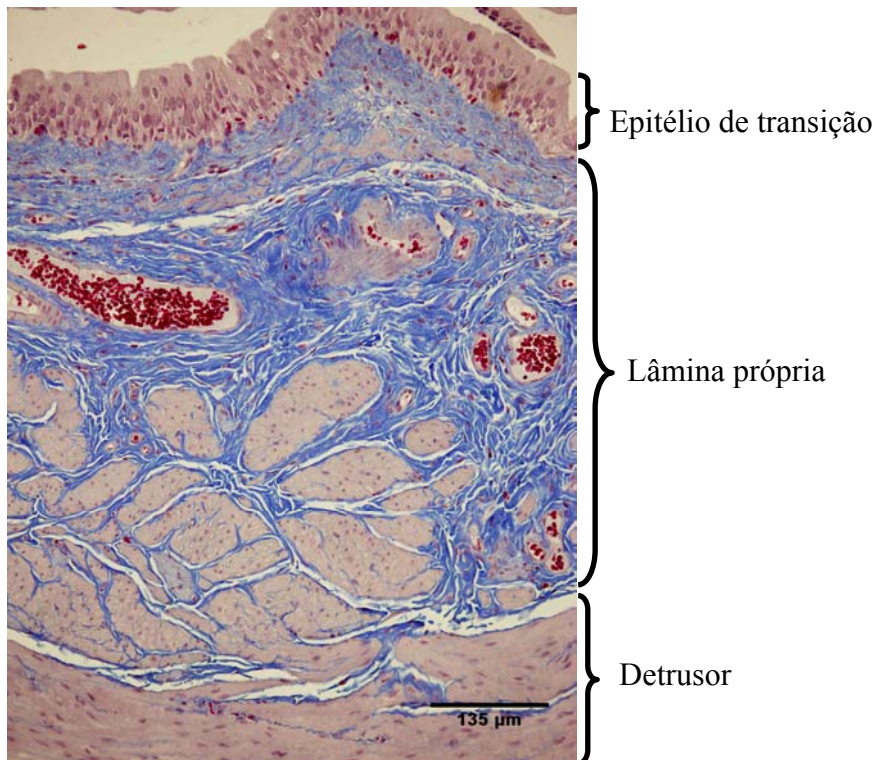


Figura 1: Fotomicrografia da parede da bexiga. Coloração Tricômico de Masson. 200x.

## Os Vasos Sanguíneos

As artérias e veias são formadas por três camadas:

A túnica íntima que é a camada mais interna formada pelo endotélio, lâmina basal e camada subepitelial composta de tecido conjuntivo frouxo. Nas artérias há ainda uma camada de fibras elásticas, denominada membrana elástica interna [5]. O endotélio possui características para facilitar a circulação do sangue. Ele inibe a agregação plaquetária excessiva, a adesão leucocitária e produz um balanço de moléculas vasoconstritoras e vasodilatadoras. Estas moléculas coordenam o tônus vascular, inibem a deposição da matriz extracelular e previnem a proliferação de células musculares lisas [6].

A túnica média que é formada por camadas de células musculares, entre as quais existem quantidades variáveis de fibras elásticas, colágeno tipo III, proteoglicanos e glicoproteínas. Nas artérias a túnica média é mais



espessa e possui uma camada de fibras elásticas, a membrana elástica externa [3].

A túnica adventícia formada por colágeno e fibras elásticas. Esses elementos se fundem gradualmente ao tecido conjuntivo frouxo que circunda os vasos [5].

## **Radioterapia**

Grande parte dos pacientes portadores de câncer pélvico são submetidos ao tratamento com radioterapia, seja isoladamente ou combinado com cirurgia e/ou quimioterapia [7,8]. Avaliando-se a incidência de câncer nos Estados Unidos e Europa Ocidental, pode-se estimar que 100.000 a 150.000 pacientes recebam radiação pélvica a cada ano [9]. A radioterapia tem um papel importante no tratamento de tumores malignos pélvicos e melhora significativamente o prognóstico [10]. Entretanto, as lesões induzidas pela radiação em tecidos saudáveis adjacentes ainda são um fator limitante no tratamento. Estes efeitos adversos limitam a dose de radiação usada e afetam a qualidade de vida do paciente. [7]

Um dos órgãos freqüentemente afetado pela radioterapia pélvica é a bexiga, por estar incluído no campo de tratamento de grande variedade de tumores como de reto, próstata, útero e cérvix [11]. Os sintomas de dano vesical induzido por radiação são disúria, noctúria, urgência e aumento da freqüência de micção e são baseados na diminuição da capacidade de armazenamento da bexiga [12]. Tais alterações obedecem a um curso trifásico. A fase inicial começa durante o tratamento e se resolve em poucas semanas após o término da radioterapia. A segunda fase é dose dependente e livre de sintomas podendo se prolongar por meses a muitos anos. Finalmente, ocorre uma terceira fase de resposta tardia progressiva e

irreversível [11]

A progressão dos efeitos decorrentes da ação da radiação nos tecidos normais parece ser conseqüência de uma fase inicial inflamatória seguida por alterações tardias do estroma [13].

A fase tardia é caracterizada por mudanças irreversíveis no metabolismo do colágeno. Morfologicamente a irradiação resulta em fibrose pronunciada principalmente ao redor dos vasos sanguíneos [11]. Modelos experimentais em ratos mostraram efeitos nocivos na bexiga dose e tempo dependente. A partir de 10 Gy as alterações são notadas [14].

### ***Efeitos da radiação nos vasos***

As mudanças características na histologia dos capilares após radiação incluem descolamento das células endoteliais da membrana basal, picnose celular, trombose e perda de segmentos inteiros de capilares resultando em isquemia tecidual ou revascularização em alguns órgãos [14].

Nos grandes vasos, os danos induzidos pela radiação se manifestam como aterosclerose, resultando em eventos tromboembólicos severos e estenose. Nos pequenos vasos, manifestam-se como telangiectasia, causando sangramento excessivo necessitando de intervenção, quando ocorre na mucosa do reto ou da bexiga. [15].

### **L-arginina**

Os efeitos da radioterapia, no entanto, são minimizados por certas substâncias da dieta usadas terapeuticamente antes e durante a radioterapia e podem produzir uma ação radioprotetora para os tecidos [9,16]. Entre estas substâncias encontra-se a L-arginina.

A L-arginina é o substrato nitrogenado para a produção de óxido nítrico (ON) que, no endotélio, é produzido pela enzima óxido nítrico sintase endotelial [17]. A L-arginina é considerada um aminoácido

essencial para mamíferos jovens, particularmente em condições de estresse severo [18]. Sua capacidade reguladora foi evidenciada por estimular a secreção de hormônios anabólicos como o hormônio do crescimento, a prolactina e o fator de crescimento 1. Também exerce uma ação imunomoduladora e estimula a cicatrização [19]. O ON é um potente vasodilatador. Ele está envolvido na fisiologia da bexiga normal regulando o tônus arteriolar, o relaxamento do músculo liso e a proliferação das células epiteliais [20]. Atua como mensageiro (ou sinalizador inter e intracelular) e como toxina em inúmeros processos patológicos [21].

Estudos em humanos mostram que a biodisponibilidade oral da L-arginina é em torno de 70% e que, quando administrada por via oral não apresenta efeitos hemodinâmicos importantes como hipotensão (Figura 2) [22]. Os efeitos da L-arginina e os seus mecanismos básicos variam de acordo com a concentração plasmática atingida [23].

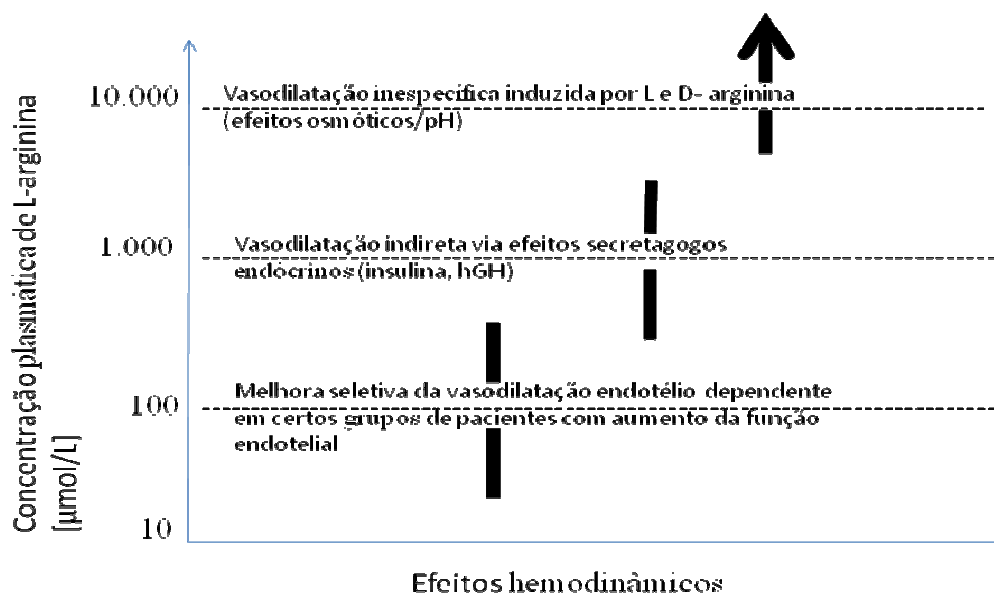


Figura 2: Associação entre a concentração plasmática de L-arginina e efeitos vasculares durante a administração de L-arginina por diferentes vias. As barras pretas verticais indicam as concentrações plasmáticas de L-arginina para cada tipo de efeito hemodinâmico indicado na figura. O eixo Y apresenta uma escala logarítmica. hGH, human growth hormone (hormônio do crescimento) Adaptado de Boger and Bode-Boger [24].

## **Fatores pró-angiogênicos**

Métodos terapêuticos promovendo a angiogênese através de fatores de crescimento foram utilizados em diferentes situações [17]. Vários estudos mostraram que fatores de crescimento e citocinas em condições experimentais são estimuladores potentes da arteriogênese capazes de reduzir sinais de isquemia [25]. O ON também tem um papel importante na secreção do Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) e Fibroblast Growth Factor (FGF) combinando diferentes fatores de crescimento que estimulam diferentes parâmetros do crescimento angiogênico [18].

O VEGF é uma citocina que funciona como indutor da permeabilidade vascular e como mitógeno endotelial. Em adição a sua função angiogênica, o VEGF também atua como inibidor de apoptose em células endoteliais e musculares lisas e como um fator neurotrófico envolvido na regeneração de nervos [26].

O FGF é um fator que influencia a migração e a replicação de células endoteliais, epiteliais e fibroblastos e tal como o VEGF atua nas vias de angiogênese [27]. Ele tem um importante papel numa grande variedade de condições fisiológicas e patológicas. A ausência de FGF parece favorecer a desagregação das células endoteliais por perda de complexos juncionais tanto em artérias como em veias [28]. A incubação de células endoteliais com FGF conduz a ramificações microvasculares sugerindo um mecanismo de recuperação nas lesões vasculares [29]. No entanto pouco se conhece do papel da L-arginina em relação VEGF e ao FGF.

A L-arginina pode se apresentar, portanto como um potencial radioprotetor vesical devido às suas características.

## **2 – OBJETIVO**

## **OBJETIVO**

O objetivo do trabalho é determinar se a L-arginina tem efeitos protetores contra as alterações na morfologia e fatores regulatórios dos vasos sanguíneos vesicais, induzidas por irradiação utilizando um modelo de radiação pélvica em ratos.

## **3 - MATERIAL E MÉTODOS**

## MATERIAL E MÉTODOS

Foram analisados os seguintes parâmetros: densidade vascular, área vascular relativa e espessura da parede arterial, expressão do VEGF e expressão do FGF.

### Cuidados com os animais

O Projeto foi realizado na Unidade de Pesquisa Urogenital, e foi aprovado pela Comissão de Ética para o Cuidado e Uso de Animais Experimentais (CEA) do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes (IBRAG), da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ) com o protocolo número CEA/224/2008.

Foram utilizados 30 ratos Wistar machos com idade entre 90 e 120 dias, pesando entre 270g e 320g. Os animais foram alocados em caixas com cinco indivíduos cada e mantidos em condições ambientais controladas de temperatura ( $23 \pm 2^\circ\text{C}$ ), umidade relativa do ar (Ca. de 70%) e ciclo claro-escuro constante (12 horas cada), recebendo ração comercial (Nuvital<sup>®</sup>, Nuvilab Ltd., Curitiba, PR, Brasil) e água *ad libidum*. Os animais foram pesados diariamente para avaliação do ganho de peso ponderal.

Os animais foram divididos aleatoriamente em três grupos de dez indivíduos:

GI – ratos submetidos à radiação sem suplementação com L-arginina;

GIA – ratos submetidos à radiação e suplementados com L-arginina;

GC – grupo controle, sem nenhuma intervenção.

No 22º dia do experimento, os animais foram mortos como recomendado pelas normas de ética em experimentação animal adotadas



pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

### Suplementação de L- arginina

Os animais do grupo GIA receberam suplementação de L-arginina (L-arginine – Sigma-Aldrich A5006, Saint Louis, MO, USA) por via intragástrica, na dose de 0,65g/kg/dia. A dose diária foi preparada em solução aquosa, em concentração a 4% [30], perfazendo volume final de 5 ml e administrada em *bolus*, com a utilização de uma sonda gástrica metálica, uma vez ao dia, sempre no mesmo horário. Essa suplementação foi iniciada 7 dias antes da irradiação e se manteve até a data da morte dos animais (Figura 3).

Os animais dos grupos – GC e GI (sem suplementação com aminoácidos), receberam 5 ml de água filtrada, por via intragástrica, durante todos os dias da experimentação, administrada da mesma forma descrita anteriormente.



Figura 3: Contenção do animal e administração da solução de aminoácido através de sonda oro-gástrica metálica.

## Radiação Abdominal

Investigações prévias caracterizaram um modelo de radiação pélvico-abdominal em dose única capaz de causar, em curto prazo, danos morfológicos e funcionais extensos no intestino de ratos. [16,30].

Os animais dos grupos GI e GIA foram imobilizados em tubos plásticos, um por tubo, na posição dorsal (Figura 4) e submetidos à dose única de irradiação, de 1.164 cGy, no 8º dia da experimentação. A radiação foi liberada a partir de um acelerador linear de 6 MV (Clinac 2100C, Varian, Palo Alto, USA), 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 100cm. A dose foi ajustada para 1.164 cGy, a 3 cm da pele (normalização da dose), e liberada no sentido dorso-ventral. Os ratos foram irradiados com o tórax, cabeça e extremidades superiores situando-se fora da área de irradiação (Figura 5).



Figura 4: Acelerador linear com os animais dispostos e contidos na posição dorsal.

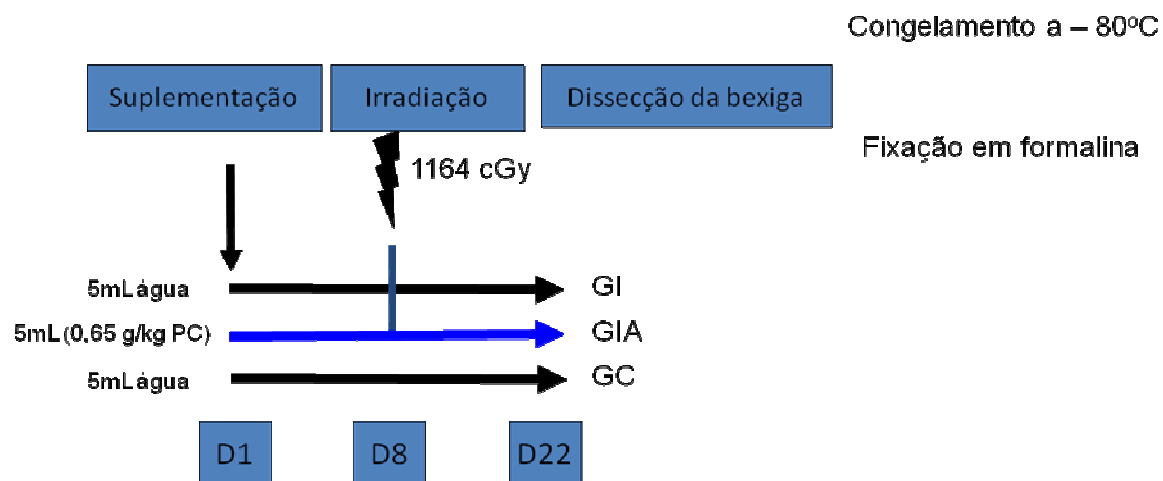


Figura 5: Cronograma dos procedimentos realizados do primeiro (D1-início da suplementação) ao último dia do experimento (D22-morte dos animais), sendo D8 o dia da radiação dos animais. GI-grupo irradiado, GIA – grupo irradiado suplementado com L-arginina, GC- grupo controle.

## Dissecção

No 22º dia de experimento, os animais foram anestesiados com uma injeção intraperitoneal de tiopental sódico (Thiopentax® - Cristália) (50mg/kg). Em seguida, os animais foram tricotomizados e foi realizada laparotomia para dissecção da bexiga. Ao final do procedimento, os animais foram mortos por sobredose anestésica (Figura 6).

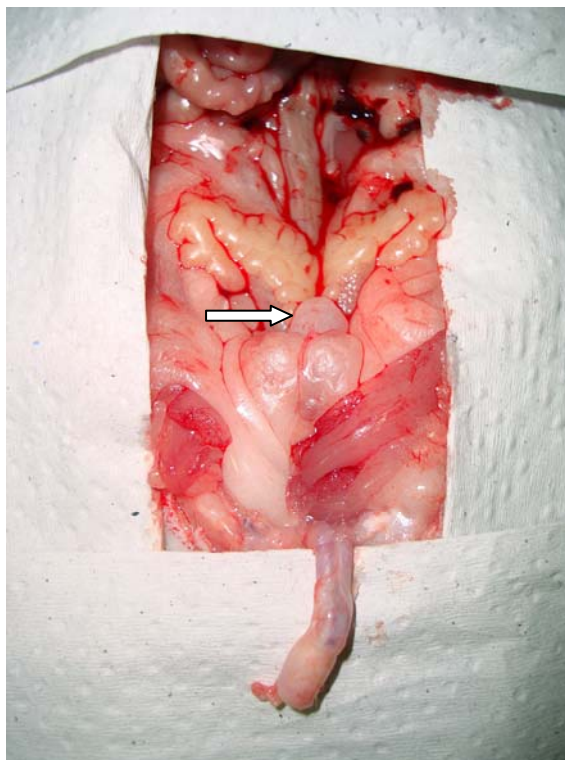


Figura 6: Dissecção da bexiga para posterior secção e preparação das partes para as respectivas análises. A seta indica a localização anatômica da bexiga.

### **Preparação da amostra**

A bexiga foi seccionada, sendo a cúpula congelada em nitrogênio a -80°C para realização da técnica de RT-PCR semi-quantitativo e o corpo lavado brevemente em solução fisiológica, fixado em formalina tamponada 10% (pH 7.2) e submetido ao processamento histológico de rotina para inclusão em paraplast (Figura.7).

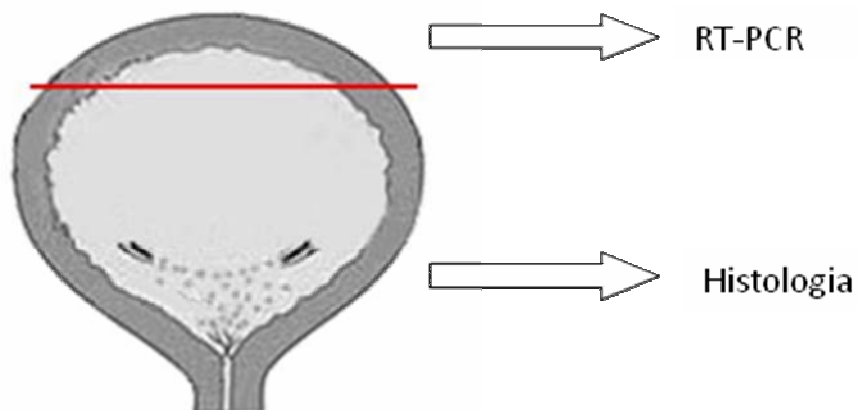


Figura 7: Esquema das regiões utilizadas para as diferentes análises.

### **Análise morfológica**

De cada fragmento de bexiga incluído em paraplast foram selecionados 5 cortes de 5  $\mu\text{m}$  de espessura com intervalo de 50 $\mu\text{m}$ . De cada corte foram analisados 5 campos aleatórios perfazendo um total de 25 campos analisados por bexiga. As lâminas foram coradas com hematoxilina e eosina e resorcina fucsina de Weigert com prévia oxidação [31] e observadas em um microscópio de luz Olympus acoplado a uma câmara de vídeo marca Olympus, sendo a imagem dos campos microscópicos transmitida para um monitor de um microcomputador acoplado. As imagens foram digitalizadas em aumentos de 200 e 1000x utilizando o software Image Pro express e analisadas através do software ImageJ (versão 1.34s; National Institute of Health, Bethesda, MD).

Para todas as análises, foi utilizada apenas a lâmina própria por conter maior quantidade de vasos sanguíneos [4] sendo considerada como lâmina própria a área de tecido conjuntivo compreendida entre a membrana basal do urotélio e a camada mais externa do músculo detrusor.

O estudo foi duplo-cego, para tanto no momento da digitalização, as

imagens foram identificadas de acordo com uma tabela de números aleatórios. Após a realização de todas as análises, os grupos foram identificados para as análises estatísticas.

### ***Densidade vascular e área vascular relativa***

Para a avaliação da integridade tecidual, quantificações da densidade vascular e da área vascular relativa foram usados cortes corados com Hematoxilina e Eosina. Os cortes foram analisados com um aumento de 200x sendo utilizada apenas a área da lâmina própria, isto é, a área compreendida entre o epitélio e o músculo detrusor. A densidade vascular foi obtida através da contagem do número total de vasos em uma determinada área da lâmina própria, selecionada e previamente medida com o auxílio de uma ferramenta do programa ImageJ. O número obtido foi dividido pela área selecionada resultando no número de vasos por  $\mu\text{m}^2$ . Para a avaliação da área vascular relativa, a lâmina própria foi selecionada e medida, sobre este segmento destacado, foi colocado um sistema teste de cem pontos. Considerando-se, para quantificação, apenas quando o quadrante superior direito das cruzes do sistema teste se sobrepunha a um vaso sanguíneo [32] (Figuras 8, 9 e 10). Não foram diferenciadas artérias e veias. As áreas analisadas de cada corte eram similares.

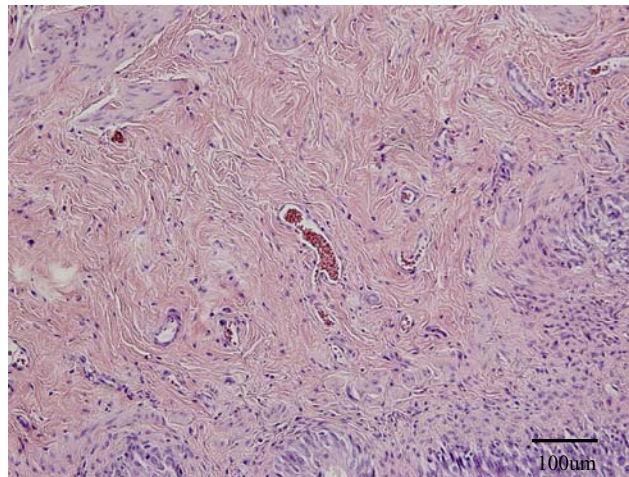


Figura 8: Fotomicrografia de bexiga mostrando a parede do órgão. Coloração H&E. 200x.

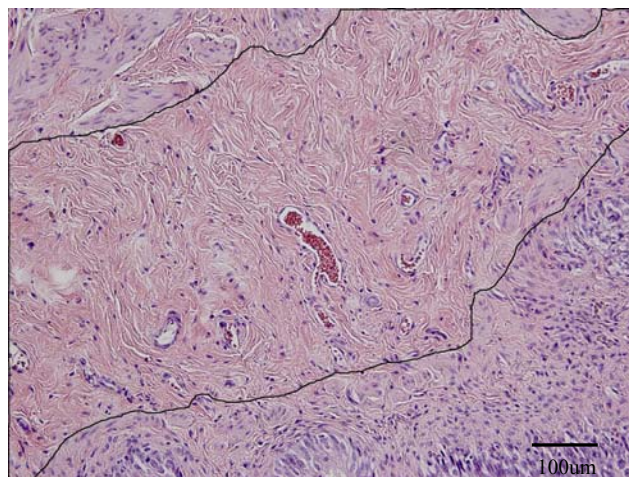


Figura 9: Fotomicrografia de bexiga mostrando a área selecionada para quantificação pelo programa Image J. Coloração H&E. 200x.

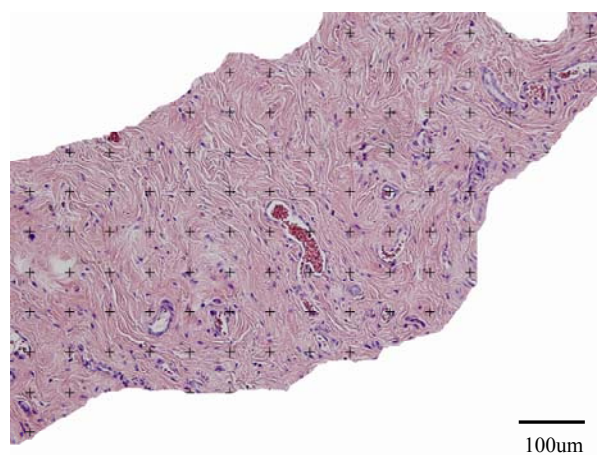


Figura 10: Mesmo campo da figura 9 com a sobreposição da grade de cem pontos na área selecionada. Coloração H&E. 200x.

### ***Espessura da parede arterial***

Para a medida da espessura da parede arterial foram consideradas apenas as artérias localizadas na lâmina própria, sendo analisados 5 campos de 5 cortes de cada bexiga com aumento de 1000x corados com Resorcina Fucsina de Weigert com prévia oxidação. A espessura arterial foi caracterizada pela medida da distância entre a limitante elástica interna e a limitante elástica externa, para cada artéria foram feitas dez medidas ao longo da parede e obtida uma média. Para cada animal foram medidas aproximadamente 30 artérias seccionadas de forma transversal ao seu maior eixo (Figura 11).

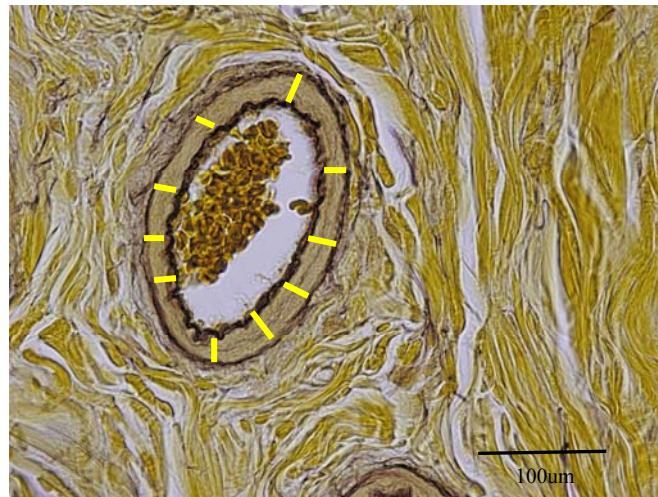


Figura 11: Fotomicrografia de bexiga exemplificando uma das artérias avaliadas em relação à sua espessura. Coloração Resorcina Fucsina de Weigert. 1000x.



## RT-PCR semi-quantitativo

Extração do RNA: o RNA total das amostras de bexiga foi extraído usando o reagente TRIZOL (Invitrogen<sup>®</sup>, California, USA) conforme indicação do fabricante. As bexigas foram homogeneizadas em 1 ml do reagente TRIZOL por 50-100mg de tecido. Após, o RNA foi extraído por uma solução de phenol-cloroformio e precipitado pelo álcool isopropílico[33]. Após lavagem com etanol 75%, o RNA foi seco e diluído em água tratada com dietil pyrocarbonato. A qualidade do RNA foi verificada pela razão 260 nm/280 nm e por eletroforese em gel de agarose, sendo então as amostras armazenadas a -80°C até utilização.

Todas as amostras de RNA foram protegidas da presença da DNA contaminante pela utilização de reagentes DNA-free (Invitrogen<sup>®</sup>) conforme protocolo do fabricante. Um micrograma de RNA total foi transcrito reversamente utilizando-se OligodT e Superscript III c-DNA synthesis system (Invitrogen<sup>®</sup>) conforme indicação do fabricante. Posteriormente o cDNA foi amplificado por PCR utilizando-se primers específicos. As reações foram realizadas num volume final de 50 µl a partir de 2 µl of cDNA com 2 IU Taq polymerase, 10 mM dNTP, 50 mM MgCl<sub>2</sub> and 30 pmoles de primers sense e antisense. Para quantificar Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (Gapdh), VEGF e FGF foram determinados o número ótimo de ciclos de amplificação para cada gene (Tabela 1). Os primers e as condições dos ciclos utilizados estão descritos na tabela 1. O Gapdh foi utilizado para corrigir as diferenças na quantidade de RNA total usado para transcrição reversa. Todos os fragmentos de cDNA amplificados foram analisados em gel de agarose a 1,5% corado com brometo de etídeo, visualizados com UV e analisados com o software Image J.

Tabela 1: Sequência de bases dos primers sense e anti-sense utilizados e condições da reação de amplificação. GAPDH - Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, bFGF – Basic Fibroblast Growth Factor, VEGF - Vascular Endotelial Growth Factor.

Gene	Sequência	Condições	Número de ciclos
<b>GAPDH</b>	5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3' 5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3'	94°C/3min, 94°C/30seg 58°C/2min, 72°C/2min	30
<b>bFGF</b>	5'-GAACCGGTACCTGGCTATGA-3' 5'-CCGTTTTGGATCCGAGTTTA-3'	94°C/2min, 94°C/1min 55°C/1min, 72°C/1min, 72°C/15min	33
<b>VEGF</b>	5'-GCCCATGAAGTGGTGAAGTT-3' 5'-ACTCCAGGGCTTCATCATT-3'	94°C/2min, 94°C/1min 60°C/1min, 72°C/1min, 72°C/15min	34

### Análise estatística

Para cada variável estudada, os resultados dos três grupos foram primeiramente analisados utilizando análise de variância (ANOVA). Quando a significância era detectada, o método de Bonferroni para comparações pareadas entre as médias foi usado para determinar se a irradiação alterou a variável, e se esse efeito poderia ser prevenido pela suplementação com L- arginina. Todos os resultados são expressos como média  $\pm$  desvio padrão, e a significância estatística foi considerada quando  $p < 0.05$

## **4 – RESULTADOS**

## RESULTADOS

Todos os animais ganharam peso ao final do experimento, porém no sétimo dia após a irradiação os grupos GI e GIA tiveram perda de peso, sendo significativa no grupo irradiado ( $p=0.05$ ) (Figura 12). Nesse grupo cinco animais apresentaram diarreia persistente após a radiação.

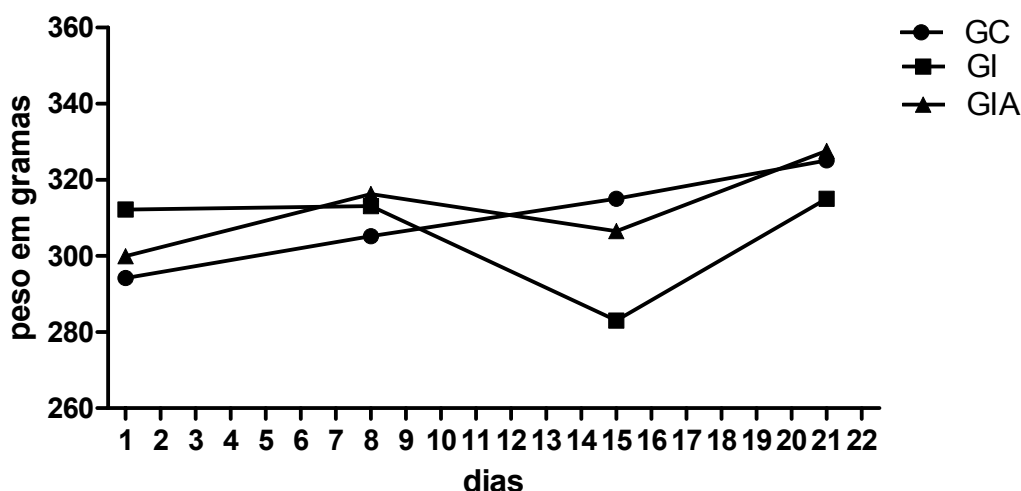


Figura 12: Ganho de peso do grupo controle (C), grupo irradiado (GI) e grupo irradiado suplementado com L-arginina (GIA). Os dados são representados como média ressaltando-se os dias 1 (início do experimento), 8 (dia em que os animais foram submetidos a irradiação), 15 (uma semana após irradiação) e 21 (último dia do experimento). Os resultados foram analisados estatisticamente utilizando ANOVA seguido do pós-teste de Bonferroni. Foram considerados significativos os resultados com valor de  $p \leq 0.05$ . ( $p=0.78$ ).

### Densidade vascular

O grupo irradiado sem suplementação apresentou uma diminuição significativa quando comparado aos demais grupos ( $p < 0.005$ ) (Figura 13). Foi observado um decréscimo de 32% na sua densidade vascular quando comparado ao controle ( $7.35 \pm 1.12$  vasos/ $\mu\text{m}^2$  x  $10.87 \pm 2.42$  vasos/ $\mu\text{m}^2$ , respectivamente;  $p < 0.01$ ). Os resultados obtidos no grupo irradiado suplementado com L-arginina mostram que esse aminoácido evitou os efeitos adversos da irradiação ( $11.04 \pm 2.37$  vasos/ $\mu\text{m}^2$ ) não diferindo

significativamente do grupo controle (Figura 14)

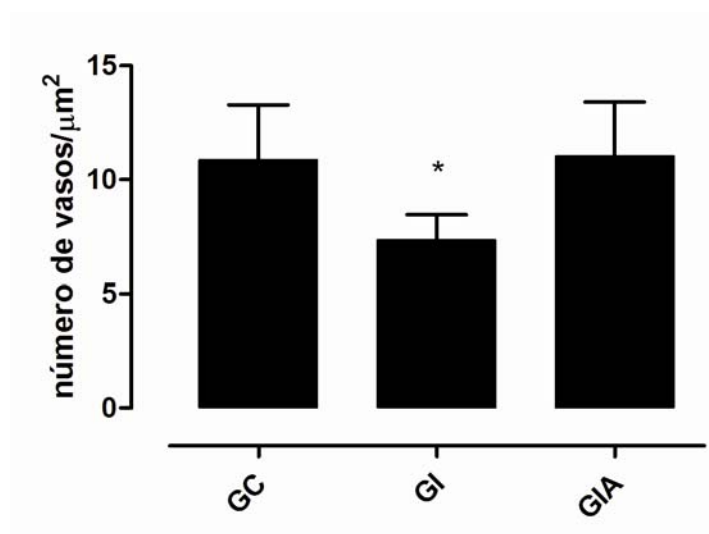


Figura 13: Densidade vascular da lâmina própria da bexiga do grupo controle (C), grupo irradiado (GI) e grupo irradiado suplementado com L-arginina (GIA). Os dados são representados como média  $\pm$  desvio padrão. Os resultados foram analisados estatisticamente utilizando ANOVA seguido do pós-teste de Bonferroni. Foram considerados significativos os resultados com valor de  $p \leq 0.05$ . O asterisco representa diferença estatística. ( $p < 0.005$ ).

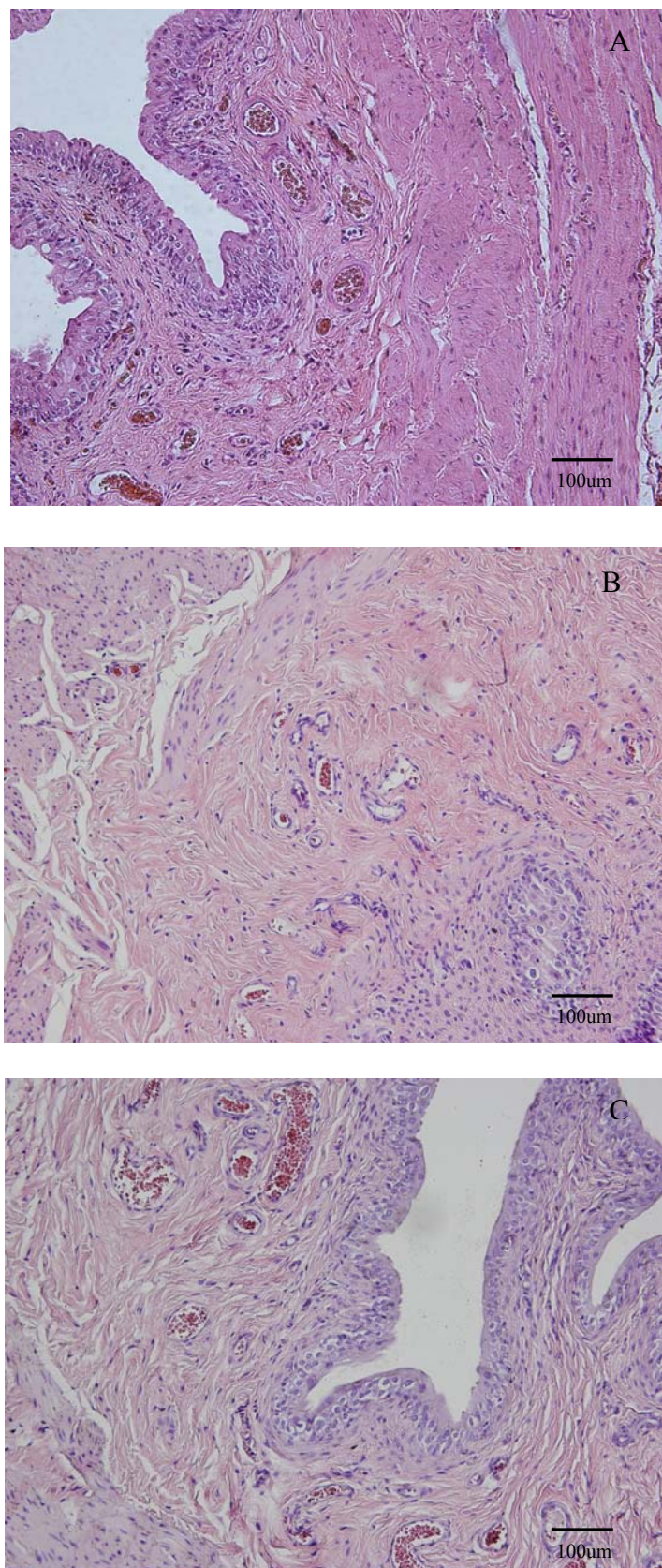


Figura 14: Fotomicrografia da parede da bexiga de rato mostrando a área avaliada para densidade vascular. A – Grupo controle B – Grupo irradiado C – Grupo irradiado suplementado com L-arginina. Coloração H&E. Aumento 200x.

## Área vascular relativa

A área vascular relativa apresenta-se diminuída no grupo irradiado em 25% em relação ao grupo controle ( $11.97 \pm 2.06\%$  x  $16.02 \pm 4.10\%$ , respectivamente;  $p < 0.05$ ) (Figura 15). O grupo irradiado suplementado com L-arginina não apresentou diferença significativa em relação ao grupo controle ( $17.79 \pm 4.76\%$ ). Avaliando-se esse resultado em conjunto com o resultado da densidade vascular pode-se deduzir que a diminuição do número de vasos não foi acompanhada por uma alteração no lúmen vascular.

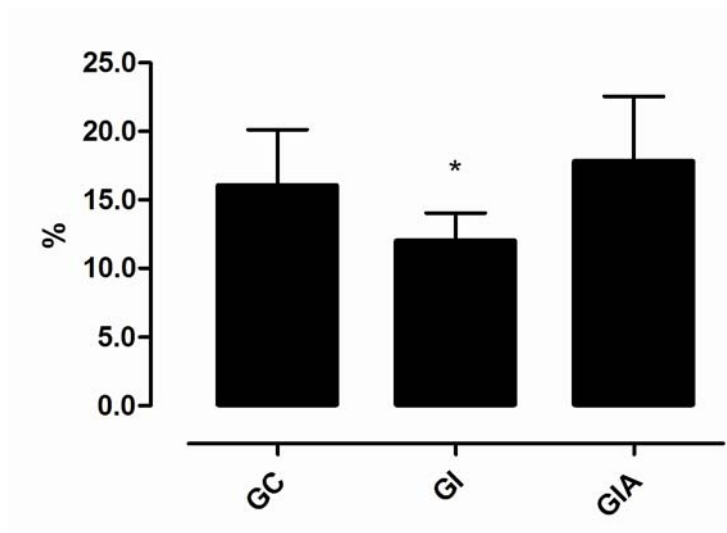


Figura 15: Área vascular relativa da lâmina própria da bexiga do grupo controle (C), grupo irradiado (GI) e grupo irradiado suplementado com L-arginina (GIA). Os dados são representados como média  $\pm$  desvio padrão. Os resultados foram analisados estatisticamente utilizando ANOVA seguido do pós-teste de Bonferroni. Foram considerados significativos os resultados com valor de  $p \leq 0.05$ . O asterisco representa diferença estatística. ( $p < 0.025$ ).

A espessura da parede arterial mostrou diferença entre os tratamentos (one-way ANOVA,  $p < 0.001$ ) (Figura 16). Nos animais irradiados sem suplementação (GI) houve uma diminuição de 42% em relação ao grupo controle ( $6.06 \pm 2.55 \mu\text{m}$  x  $10.42 \pm 1.71 \mu\text{m}$ , respectivamente;  $p < 0.004$ ),

nos animais irradiados suplementados com L-arginina não houve diferença em relação ao grupo controle ( $10.10 \pm 1.77 \mu\text{m}$ ) (Figura 17).

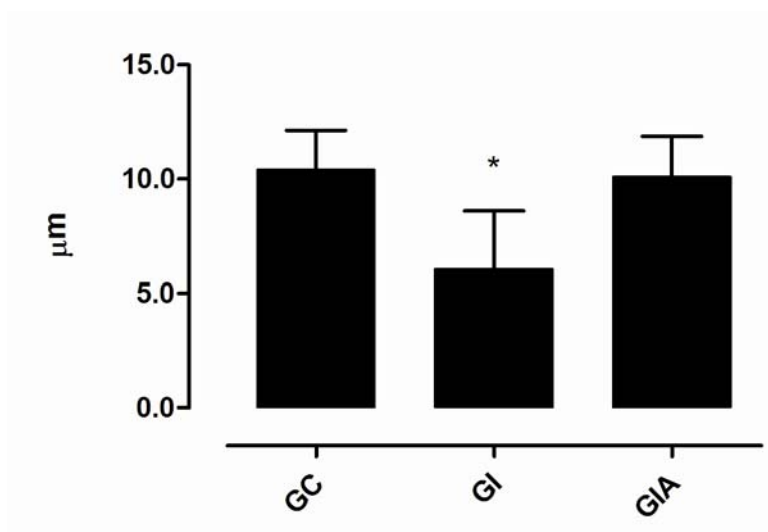


Figura 16: Espessura da parede das artérias da lâmina própria da bexiga do grupo controle (C), grupo irradiado (GI) e grupo irradiado suplementado com L-arginina (GIA). Os dados são representados como média  $\pm$  desvio padrão. Os resultados foram analisados estatisticamente utilizando ANOVA seguido do pós-teste de Bonferroni. Foram considerados significativos os resultados com valor de  $p \leq 0.05$ . O asterisco representa diferença estatística. ( $p < 0.001$ ).



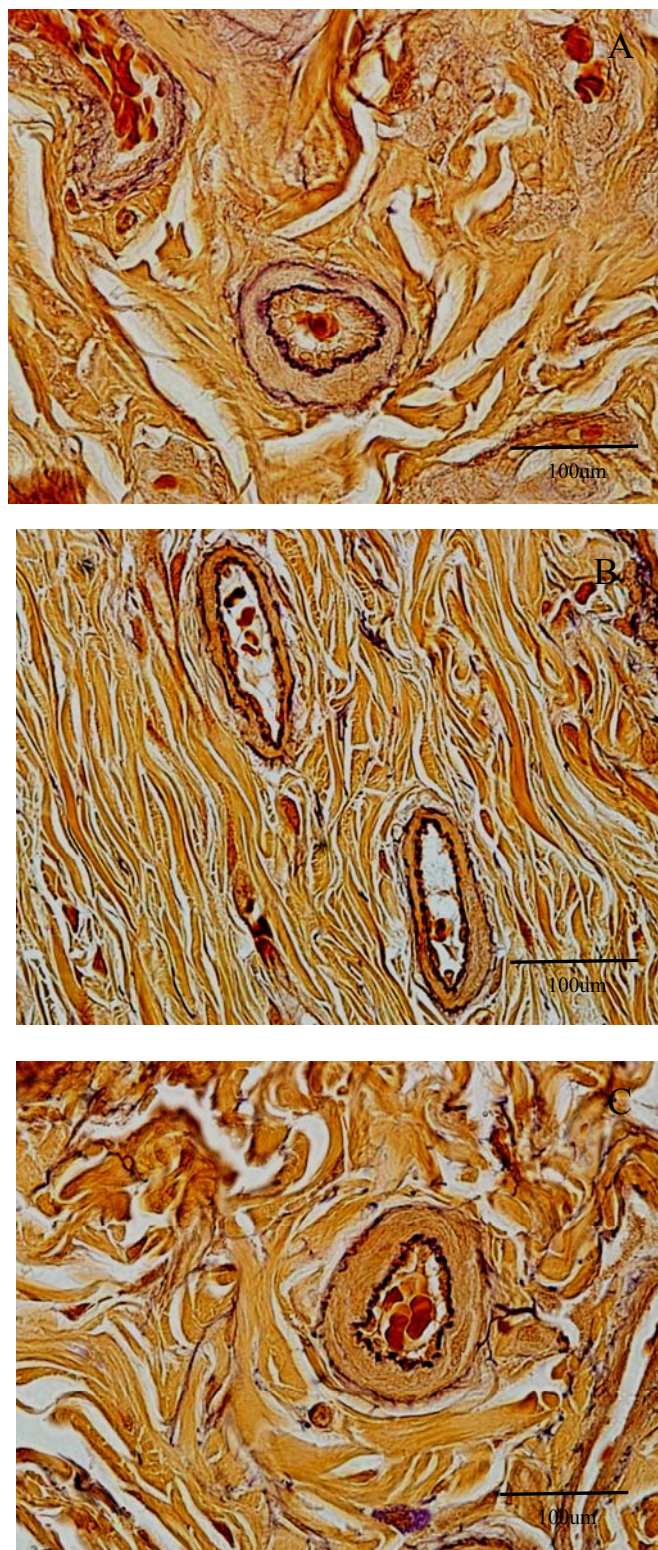


Figura 17: Fotomicrografia da lâmina própria da bexiga mostrando artérias nas quais foram realizadas as medidas de espessura da parede. A – Grupo controle, B – Grupo irradiado, C – Grupo irradiado suplementado com L-arginina. Coloração Resorcina fucsina de Weigert com prévia oxidação. Aumento 1000x.

## RT-PCR

Pela técnica de RT-PCR, houve diferença entre os grupos tanto na expressão do m-RNA do VEGF ( $p < 0.005$ ) (Figura 18) quanto do FGF ( $p < 0.025$ ) (Figura 19). Observou-se: uma redução de 67% ( $p < 0.002$ ) na expressão do m-RNA do VEGF ( $0.177 \pm 0.092$ ) e de 56% ( $p < 0.04$ ) na expressão do FGF ( $0.557 \pm 0.227$ ) no grupo irradiado sem suplementação quando comparado ao grupo controle ( $0.543 \pm 0.175$  e  $1.253 \pm 0.562$ ). Entretanto, no grupo irradiado suplementado com L-arginina, os níveis de m-RNA do VEGF ( $0.565 \pm 0.243$ ) e do FGF ( $0.874 \pm 0.302$ ) não foram estatisticamente diferentes dos encontrados no grupo controle.

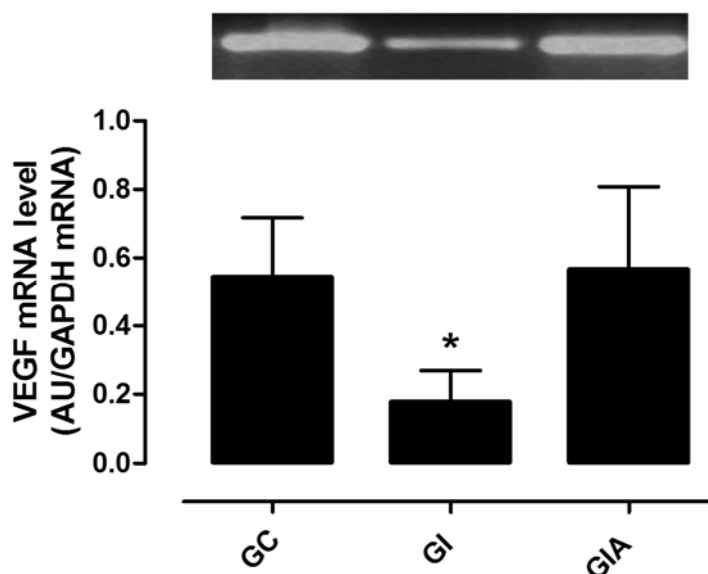


Figura 18: Expressão do gene VEGF na bexiga do grupo controle (C), grupo irradiado (GI) grupo irradiado suplementado com L- arginina (GIA). A relação entre as intensidades de sinal de VEGF (unidades arbitrárias) são representadas como médias  $\pm$  desvio padrão. O asterisco representa diferença estatística. ( $p < 0.005$ ).

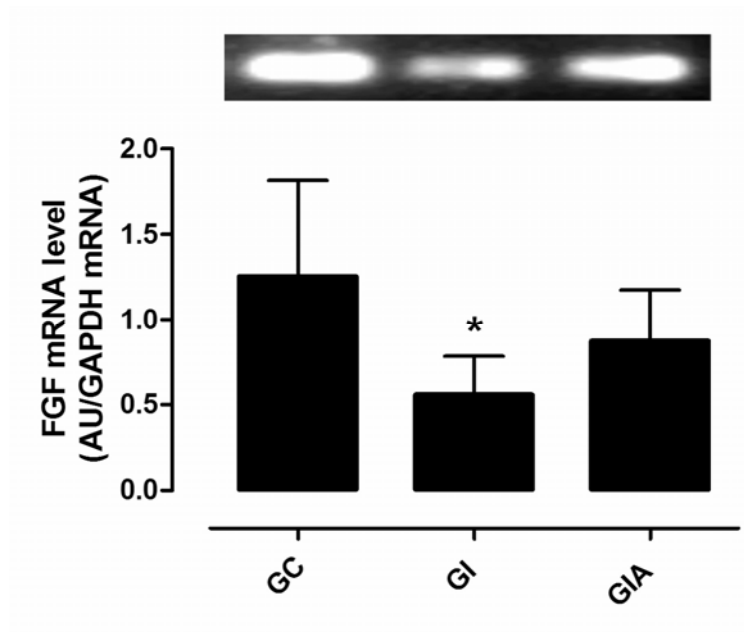


Figura 19: Expressão do gene FGF na bexiga do grupo controle (C), grupo irradiado (GI) grupo irradiado suplementado com L- arginina (GIA). A relação entre as intensidades de sinal de FGF (unidades arbitrárias) são representadas como médias  $\pm$  desvio padrão. O asterisco representa diferença estatística. ( $p < 0.025$ )

## **5 – DISCUSSÃO**

## DISCUSSÃO

O binômio dano x benefício torna a radioterapia uma alternativa eficaz no controle do câncer, porém de segurança limitada. A tolerância dos tecidos normais determina a dose a ser prescrita no tratamento da maioria das doenças malignas [34]. Na bexiga, observamos após radiação pélvica um quadro agudo que pode evoluir para eventos como hematúria maciça de difícil controle [2].

A injúria vascular é um dos efeitos mais precoces observado nos tecidos irradiados. O dano aos vasos sanguíneos, e, subsequente hipóxia e isquemia contribuem para severas alterações teciduais como fibrose e/ou necrose [35,36]. A resposta endotelial ao dano pode ser dividida numa resposta rápida inicial e uma resposta fenotípica lenta [6]. Morfologicamente a radiação resulta em fibrose pronunciada vista principalmente no espaço perivascular, portanto, indiretamente indicando a contribuição da vascularização. *Jaal et al* [11] determinaram o papel da barreira vascular impedindo o extravasamento de albumina no espaço perivascular que traz como consequência uma fibrose neste local durante a fase de resposta tardia [11]. Observamos em nossos resultados uma redução na densidade vascular e da área dos vasos do grupo irradiado quando comparado ao grupo controle. Essa redução parece ocorrer em todos os vasos independentemente do diâmetro de cada um deles. Esses resultados, associados aos dados de literatura, indicam que a radiação leva a uma redução da angiogênese, seja por aumento de apoptose de células endoteliais ou por redução de fatores pró-angiogênicos [13,15]. No grupo suplementado com o aminoácido L-arginina não houve diferença significativa entre este e o grupo controle, evidenciando que nesse grupo os vasos sanguíneos sofreram uma recuperação.

Citocinas fibrogênicas e fatores de crescimento estão envolvidos nos mecanismos de fibrose vascular, na migração e proliferação das células musculares lisas, no aumento da expressão do colágeno e na alteração do remodelamento da matriz extracelular [36]. O VEGF é um dos mais potentes fatores angiogênicos. Interage com os receptores VEGF 1 (Flt- 1) e VEGF 2 (KDR) para promover a proliferação e migração de células endoteliais e a permeabilidade vascular [37]. O ON é um mediador do processo pro-angiogênico induzido por diferentes fatores de crescimento, incluindo, notadamente, o VEGF. Observou-se que, *in vitro*, a viabilidade das células endoteliais não foi afetada por doses menores 10Gy e o VEGF seria radioprotetor em células endoteliais, como observado em nossos resultados [7]. Nossos resultados mostraram uma redução da expressão do VEGF na bexiga dos animais irradiados e o mesmo não foi encontrado nos animais suplementados com L-arginina. Os resultados obtidos através da densidade vascular e da expressão de VEGF mostram coerentemente os efeitos da irradiação sobre os vasos. Ambos diminuíram no grupo irradiado e se mantiveram semelhantes ao grupo controle no grupo suplementado.

A partir de dados da literatura e dos dados apresentados, podemos concluir que a irradiação leva a uma redução da angiogênese, seja por aumento de apoptose das células endoteliais, seja pela redução dos fatores pró-angiogênicos.

A sinalização contínua do FGF parece ter um papel crítico na manutenção da integridade vascular e regulação da permeabilidade basal [28]. O FGF2 exógeno estimula a migração e proliferação endotelial *in vivo*, tem atividade anti-apoptótica e induz mitose das células musculares lisas e fibroblastos, que induzem o desenvolvimento de grandes vasos colaterais com adventícia [29]. Vários membros da família do FGF têm a capacidade de proteger os tecidos dos efeitos adversos da irradiação [38]

Em nossos resultados, houve redução do FGF no grupo irradiado e no grupo suplementado com L-arginina comparado com o controle. Porém, não houve diferença significativa entre o grupo suplementado e os grupos controle e irradiado.

Tanto o VEGF quanto o FGF são potentes fatores de crescimento e angiogênese. Entretanto, há algumas diferenças funcionais entre os vasos gerados por esses fatores. Morfológicamente, os capilares induzidos pelo VEGF são fenestrados, enquanto os induzidos pelo FGF são contínuos [28].

O aumento da oferta de óxido nítrico fornecido pela suplementação de L-arginina reduziu os efeitos da radiação sobre a produção de VEGF, mantendo provavelmente imutável essa via de angiogênese mesmo sob irradiação. Entretanto, apesar da sinalização do FGF envolver o ON, seus efeitos angiogênicos estão menos claramente ligados ao ON quando comparados ao VEGF [39].

A L-arginina é conhecida por ser um potente vasodilatador, relaxando a musculatura lisa principalmente de artérias de médio calibre pela ação do ON [27, 40,41]. Houve uma redução da espessura da parede arterial no grupo irradiado após quinze dias quando comparado aos demais grupos. Podemos supor que essa diminuição se dê pela contração das células musculares lisas da parede arterial no grupo.

## **6 – CONCLUSÃO**



## **CONCLUSÃO**

A radiação, no período estudado diminui significativamente a densidade vascular, a área vascular relativa, a espessura da parede arterial e a expressão de fatores pró-angiogênicos. A suplementação com L-arginina em animais irradiados parece manter os padrões histomorfométricos vasculares semelhantes aos do grupo controle. O mesmo ocorre com os padrões de expressão do VEGF e do FGF. Esses dados favorecem a L-arginina como um possível radioprotetor vesical em radioterapia pélvica.

## **7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- Chancellor MB, Yashimura N: Physiology and pharmacology of the bladder and urethra. Walsh PC, Retik AB, Vaughan ED. Campbell's Urology. Philadelphia, WB Saunders. 2002; vol. 2, pp.831-886.
- 2- Jaal J, Dörr W: Radiation – Induced Damage to Mouse Urothelial Barrier. *Radiother Oncol.* 2006; 80: 250-256.
- 3- Junqueira LC, Carneiro J: *Histologia Básica.* Rio de Janeiro, Guanabara Koogan. 2008; p. 387-389.
- 4- Hossler FE, Monson FC: Microvasculature of the rabbit urinary bladder. *Anat Rec.* 1995; 243: 438-448.
- 5- Ross MH, Pawlina W: *Histologia texto e atlas. Em correlação com a biologia celular e molecular.* Rio de Janeiro, Guanabara Koogan. 2008; p. 651-687.
- 6- Abraham D, Distler O: How does endothelial cell injury start? The role of endothelin in systemic sclerosis. *Arthritis Res Ther.* 2007; 9 Suppl 2:S2.
- 7- Milliat F, François A, Tamarat R, Benderitter M: Role of endothelium in radiation-induced normal tissue damages. *Ann Cardiol Angeiol.* 2008; 57: 139–148.
- 8- McGough C, Peacock N, Hackett C, Baldwin C, Norman A, Frost G, Blake P, Tait D, Khoo V, Harrington K, Whelan K, Andreyev HJ: Taste preferences for oral nutrition supplements in patients before and after pelvic radiotherapy: a double-blind controlled study. *Clin Nutr.* 2006; 25: 906-12.

- 9- McGough C, Baldwin C, Norman A, Frost G, Blake P, Tait D, Khoo V, Harrington K, Andreyev HJ: Is Supplementation with Elemental Diet Feasible in Patients Undergoing Pelvic Radiotherapy? *Clin Nutr.*2006; 25: 109-116.
- 10- Turina M, Mulhall AM, Mahid SS, Yashar C, Galandiuk S: Frequency and surgical management of chronic complications related to pelvic radiation. *Arch Surg.* 2008; 143: 46-52.
- 11- Jaal J, Dörr W: Radiation – Induced Late Damage to the Barrier Function of Small Blood Vessels in Mouse Bladder. *J Urol.* 2006; 176: 2696-2700.
- 12- Jaal J, Dörr W: Radiation – Induced Inflammatory Changes in the Mouse Bladder: The Role of cyclooxygenase – 2. *J Urol.* 2006; 175: 1529-1533.
- 13- Rodemann HP, Blaese MA: Responses of Normal Cells to Ionizing Radiation. *Semin Radiat Oncol.* 2007; 17: 81-88.
- 14- Marks LB, Carroll PR, Dugan TC, Anscher MS: The Response of the urinary bladder, urethra and ureter to radiation and chemotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.*1995; 31: 1257-1280.
- 15- Kruse JJ, te Poele JA, Russell NS, Boersma LJ, Stewart FA: Microarray Analysis to Identify Molecular Mechanisms of Radiation – Induced Microvascular Damage in Normal Tissues. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2004; 58: 420-426.
- 16- Ersin S, Tuncyurek P, Esassolak M, et al: The prophylactic and therapeutic effects of glutamine- and arginine-enriched diets on radiation-induced enteritis in rats. *J Surg Res* 2000; 89: 121.
- 17- Benest AV, Stone OA, Miller WH, Glover CP, Uney JB, Baker AH, Harper SJ, Bates DO: Arteriolar Genesis and

- Angiogenesis Induced by Endothelial Nitric Oxide Synthase Overexpression Results in a Mature Vasculature. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2008; 28: 1462–1468
- 18- Zhan Z, Ou D, Piao X, Kim SW, Liu Y, Wang J: Dietary Arginine Supplementation Affects Microvascular Development in the Small Intestine of Early-Weaned Pigs. *J Nutr.* 2008; 138: 1304-1309.
- 19- Roth E: Immune and Cell Modulation by Amino Acid. *Clin Nutr.* 2007; 26: 535-544.
- 20- Ozgür A, Onol FF, Ercan F, Tarcan T: Prophylactic role of oral L-arginine on histological and contractile changes in a rat chronic bladder injury model. *Urol Int.* 2008; 81: 347-52.
- 21- Mackenzie IS, Rutherford D, MacDonald TM: Nitric oxide and cardiovascular effects: new insights in the role of nitric oxide for the management of osteoarthritis. *Arthritis Res Ther.* 2008; 10 Suppl 2:S3.
- 22- Bode-Böger SM, Böger RH, Galland A, Tsikas D, Frölich JC: L-Arginine induced vasodilation in healthy humans: pharmacokinetic-pharmacodynamic relationship. *Br J Clin Pharmacol.* 1998; 46: 489-497.
- 23- Böger RH: The Pharmacodynamics of L-Arginine. *J Nutr.* 2007; 137: 1650S-1655S.
- 24- Böger RH, Bode-Böger SM: The clinical pharmacology of L-arginine. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2001; 41: 79-99.
- 25- Schierling W, Troidl K, Troidl C, Schmitz-Rixen T, Schaper W, Eitenmüller IK: The role of angiogenic growth factors in arteriogenesis. *J Vasc Res.* 2009; 46: 365-374.

- 26- Youssif M, Shiina H, Urakami S, Gleason C, Nunes L, Igawa M, Enokida H, Tanagho EA, Dahiya R: Effect of Vascular Endothelial Growth Factor on Regeneration of Bladder Acellular Matrix Graft: Histologic and Functional Evaluation. *Urology*. 2005; 66: 201-207.
- 27- Tattini C, Manchio J, Zaporozhan V, Carderelli G, Bonassar L, Spangenberg A, Weinzweig J: Role of TGF- $\beta$  and FGF in the Treatment of Radiation-Impaired Wounds Using a Novel Drug Delivery System. *Plast Reconstr Surg*. 2008; 122: 1036-45.
- 28- Murakami M, Nguyen LT, Zhang ZW, Moodie KL, Carmeliet P, Stan RV, Simons M: The FGF system has a key role in regulating vascular integrity. *J Clin Invest*. 2008; 118: 3355-3366.
- 29- Beenken A, Mohammadi M: The FGF family: biology, pathophysiology and therapy. *Nat Rev Drug Discov*. 2009; 8: 235-253.
- 30- Diestel CF, Marques RG, Lopes-Paulo et al: Role of L-glutamine and glycine supplementation on irradiated colonic wall. *Int. J. Colorectal Dis* 2007; 22: 1523.
- 31- Montes, GS. Structural biology of the fibres of the collagenous and elastic systems. *Cell Biol Int* 1996; 20: 15.
- 32- Gundersen HJG, Bendtsen TF, Korbo L et al: Some new, simple and efficient stereological methods and their use in pathological research and diagnosis. *APMIS* 1988; 96: 379.
- 33- Chomczynski P, Sacchi N: Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*. 1987; 162: 156-159.
- 34- Stone HB, Coleman CN, Anscher MS, McBride WH: Effects of radiation on normal tissue: consequences and mechanisms. *Lancet Oncol*. 2003; 4: 529-536.

- 35- Liu Y, Kudo K, Abe Y, Aoki M, Hu DL, Kijima H, Nakane A: Hypoxia expression in radiation-induced late rectal injury. *J Radiat Res (Tokyo)*. 2008; 49: 261-268.
- 36- Milliat F, François A, Isoir M, Deutsch E, Tamarat R, Tarlet G, Atfi A, Validire P, Bourhis J, Sabourin JC, Benderitter M: Influence of Endothelial Cells on Vascular Smooth Muscle Cells Phenotype after Irradiation. *Am J Pathol*. 2006; 169: 1484-1495.
- 37- Tešan T, Gustavsson H, Welén K, Damber JE: Differential expression of angiopoietin-2 and vascular endothelial growth factor in androgen-independent prostate cancer models. *BJU Int*. 2008; 102: 1034-1039.
- 38- Hagiwara A, Nakayama F, Motomura K, Asada M, Suzuki M, Imamura T, Akashi M: Comparison of expression profiles of several fibroblast growth factor receptors in the mouse jejunum: suggestive evidence for a differential radioprotective effect among major FGF family members and the potency of FGF1. *Radiat Res*. 2009; 172: 58-65.
- 39- Boodhwani M, Voisine P, Ruel M, Sodha NR, Feng J, Xu SH, Bianchi C, Sellke FW: Comparison of vascular endothelial growth factor and fibroblast growth factor-2 in a swine model of endothelial dysfunction. *Eur J Cardiothorac Surg*. 2008; 33: 645-650.
- 40- Moncada S: Adventures in vascular biology: a tale of two mediators. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2006; 361: 735-759.
- 41- Wu G, Bazer FW, Davis TA, Kim SW, Li P, Rhoads JM, Satterfield MC, Smith SB, Spencer TE, Yin Y: Arginine metabolism and nutrition in growth, health and disease. *Amino Acids*. 2009; 37: 153-168.

## **8 – ANEXOS**





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/224/2008** sobre "**Análise estrutural e ultra-estrutural do sistema urogenital de ratos irradiados suplementados ou não com L-arginina e L-L-glutamina**", sob a responsabilidade de **Waldemar Silva Costa**, 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 **25/03/2008**. Este certificado expira em **25/03/2010**.

Rio de Janeiro, 25 de março de 2008.

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Antonio Carlos da Silva', is written over a horizontal line.

Prof. Antonio Carlos da Silva  
Coordenador – CEA/IBRAG/UERJ

Editorial Manager™ - Microsoft Internet Explorer

Arquivo Editor Livre Favoritos Ferramentas Ajuda

Endereço http://www.editorialmanager.com/uro/default.asp

**THE JOURNAL of UROLOGY**  
Official Journal of the American Urological Association  
www.urology.com

Editorial Manager

HOME • LOG OUT • HELP • REGISTER • UPDATE MY INFORMATION • JOURNAL OVERVIEW  
MAIN MENU • CONTACT US • SUBMIT A MANUSCRIPT • INSTRUCTIONS FOR AUTHORS

Role: Author Username: sampsa7023

**Submissions Being Processed for Author Francisco I.B. Sampaio, MD, PhD**

Page: 1 of 1 (1 total submissions) Display 10 results per page.

Action	Manuscript Number	Title	Initial Date Submitted	Status Date	Current Status
<a href="#">Action Links</a>		NUTRITIONAL SUPPLEMENTATION WITH L-ARGININE PREVENTS PELVIC RADIATION-INDUCED CHANGES IN THE MORPHOLOGY, DENSITY, AND REGULATING FACTORS OF BLOOD VESSELS IN THE WALL OF THE RAT BLADDER	Jan 19, 2010	Jan 19, 2010	Submitted to Journal

Page: 1 of 1 (1 total submissions) Display 10 results per page.

<< Author Main Menu

Concluido

Iniciar

63 novos mensagens ...

UOL Mail - Entrada (2...)

Editorial Manager™ - ...

Microsoft Word

ARTICO Bladder 3...

19:36

NUTRITIONAL SUPPLEMENTATION WITH L-ARGININE PREVENTS PELVIC  
RADIATION-INDUCED CHANGES IN THE MORPHOLOGY, DENSITY, AND  
REGULATING FACTORS OF BLOOD VESSELS IN THE WALL OF THE RAT  
BLADDER

Mônica N. Ribeiro, Luiz E.M. Cardoso, Waldemar S. Costa, Maria C. Dornas, Cristiane  
F. Ramos, Francisco J.B. Sampaio

*Urogenital Research Unit, State University of Rio de Janeiro,  
Rio de Janeiro, RJ, Brazil*

Runninghead: L-arginine protects the bladder against radiation

Key words: bladder, radiation, blood vessels, L-arginine

## ABSTRACT

### PURPOSE

To determine whether L-arginine has protective effects against radiation-induced alterations in the morphology and regulatory factors of vesical blood vessels using a rat model of pelvic radiation.

### MATERIALS AND METHODS

Male rats aged 3-4 months were divided into the following groups of ten animals each: (a) controls, which consisted of intact animals; (b) radiated-only rats; and (c) radiated rats receiving L-arginine supplementation. Radiation was in one session of 10 Gy and was aimed at the pelvico-abdominal region. L-arginine was administered once a day (0.65 g/kg body weight), starting seven days before radiation and continuing until sacrifice on the 16th day after radiation. The density, relative area, and wall thickness of blood vessels were measured in the vesical lamina propria using histological methods, and the expression of VEGF and FGF in the bladder wall was assessed by RT-PCR.

### RESULTS

Compared with controls, radiation alone decreased the density and relative area of blood vessels by 32% ( $p < 0.01$ ) and 25% ( $p < 0.05$ ), respectively, and reduced arterial wall thickness by 42% ( $p < 0.004$ ). VEGF and FGF mRNA levels after radiation were diminished by 67% ( $p < 0.002$ ) and 56% ( $p < 0.04$ ), respectively, when compared with

controls. All these changes were significantly absent in radiated animals supplemented with L-arginine.

## CONCLUSIONS

Pelvic radiation leads to significant vesical modifications, as in the morphology of blood vessels and in VEGF and FGF expression. All these changes, however, were prevented by L-arginine treatment. These results emphasize, therefore, the potential use of this aminoacid as a radioprotective drug.

## INTRODUCTION

More than 50% of all types of cancer are treated with radiotherapy, either alone or in combination with surgery and/or chemotherapy<sup>1</sup>. Additionally, 20% of patients that are diagnosed with pelvic cancer are treated with pelvic radiotherapy<sup>2</sup>. If these epidemiological data are applied to the European and American populations, for example, this means that more than 100,000 patients are submitted annually to pelvic radiation<sup>2</sup>. Radiotherapy plays an important role in the treatment of pelvic malignancies and significantly improves patient prognosis<sup>3</sup>. However, radiation-induced early or late injuries in normal tissues are still a limiting factor of the treatment, so much so that radiation dose does have to be restricted. Moreover, such injuries usually have a negative impact on quality of life<sup>1</sup>.

In spite of recent advances that improve range and direction of radiation, external beam radiotherapy targeted at malignant tumors such as of the rectum, prostate, and uterus/cervix may still reach other structures in the pelvic region. Indeed, the urinary bladder is often and undesirably affected<sup>4</sup> during radiotherapy sessions aimed at the pelvic region. Symptoms of radiation-induced bladder damage include dysuria, nocturia, urgency, and increased micturition frequency<sup>5</sup>. Progression of radiation-induced bladder injury in humans, as well as in experimental models using mice, is commonly described as having three phases. Initial damage is observed while the patient is still under treatment, but it gradually disappears once radiation sessions are interrupted. There is then a clinically quiescent period that may last up to many years, after which conditions may worsen and ultimately lead to irreversible lesions<sup>6</sup>.

Fibrosis is a common morphological alteration after radiation, especially around blood

vessels<sup>6</sup>. In large vessels, radiation-induced damage consist mainly of atherosclerosis, which result in thromboembolic events and stenosis. In smaller vessels, injury is marked by telangiectasia and excessive bleeding which, when occurring in the rectum or bladder, require surgical intervention<sup>7</sup>. Additionally, a number of modifications have been observed in capillaries, such as pyknosis, loss of endothelium, thrombosis, and even disappearance of vessels, which are responsible for ischemia and neovascuogenesis<sup>8</sup>

Preliminary experimental data from humans and animals have shown that these deleterious effects of radiation can be minimized by dietary supplements such as L-arginine, which are taken before and during radiotherapy sessions<sup>9,10</sup>. L-arginine is an essential aminoacid that is the substrate for the production of nitric oxide (NO)<sup>11</sup>, which in turn acts as in intracellular signaling and as a toxin in various pathologic processes<sup>12</sup>. L-arginine stimulates the production of anabolic hormones, can have immunomodulatory effects, and promotes wound healing, while NO causes vasodilation and stimulates microcirculation<sup>13</sup> NO in addition modulates the secretion of vascular endothelial growth factor (VEGF) and fibroblast growth factor (FGF), which themselves also stimulate angiogenesis<sup>11</sup>. Studies in humans have shown that the bioavailability of L-arginine is about 70%, and that when administered orally, it is relatively free from side effects<sup>14</sup>. Thus, L-arginine has the potential of being used as a radioprotective drug, especially against injuries due to vascular modifications. In spite of this, little is known about the effects of L-arginine on VEGF and FGF in the bladder wall.

The aim of the present investigation was therefore to determine whether L-arginine has protective effects against radiation-induced vascular alterations in the bladder wall. We



used a rat model of pelvic radiation and analyzed the morphology of blood vessels in the lamina propria and the expression of VEGF and FGF in the bladder wall. We focused the analyzes on the lamina propria because it has a high concentration of blood vessels, compared to the other layers of the vesical wall<sup>15</sup> and because it is the region that is more severely affected by radiation in experimental animal models<sup>4</sup>.

## MATERIAL AND METHODS

The Ethical Committee for the Care and Use of Laboratory Animals of the State University of Rio de Janeiro reviewed and approved this study.

### *Animals and treatments*

Thirty male Wistar rats aged from three to four months and weighing from 270 to 310 g were randomly assigned to one of the following groups of ten animals each: (a) controls, which consisted of non-irradiated, non-treated animals; (b) irradiated-only rats; and (c) irradiated rats receiving L-arginine supplementation. Animal housing and maintenance conditions were as described elsewhere<sup>16</sup>

Previous investigations have characterized a rat model of single-dose, pelvico-abdominal radiation that causes extensive short-term morphological and functional damage to the intestinal tissue<sup>9 16</sup>. These established experimental protocols of radiation and treatment were thus used herein to ascertain whether the bladder is also affected. Briefly, immobilized animals were exposed in one session to a total dose of 10 Gy using a 10 MeV photon beam generated by a linear accelerator (Clinac 2100C, Varian, Palo Alto, USA). The dose was delivered at a source-to-skin distance of 100 cm, at a rate of 2.4 Gy/minute for 4.16 minutes, and was aimed at the pelvico-abdominal region, whereas other fields were shielded off. L-arginine (Sigma-Aldrich, A5006, Saint Louis, MO, USA) was prepared as a 4% aqueous solution and was administered once a day by gavage at a dose of 0.65 g per kg of body weight, starting seven days before radiation and continuing until sacrifice. A dose similar to this one has been shown to have protective effects against changes in the colon using the same rat radiation model<sup>16</sup>.

The groups that were not under L-arginine supplementation received, also by gavage, a corresponding volume of water for the same period. All animals were sacrificed on the 16th day after radiation by an overdose of thiopental.

#### *Tissue preparation*

Shortly after sacrifice, the bladder was removed and transversely sectioned. The upper half was frozen at -80°C and later used for RT-PCR, while the lower half was fixed in 10% formalin prepared in PBS, and then routinely processed for paraffin embedding. Tissue sections were 5- $\mu$ m thick and were stained with hematoxylin-eosin (HE) for the identification of blood vessels in general, and with the Weigert's resorcin-fuchsin technique with previous oxidation by peracetic acid to label all fibers of the elastic fiber system<sup>17</sup>.

#### *Density and relative area of blood vessels*

The density and relative area of blood vessels were assessed only in the lamina propria of the vesical wall, which was defined as the loose connective tissue between the urothelial basement membrane and the inner edge of the detrusor layer. Using the ImageJ software version 1.42 (NIH, Bethesda, Maryland, USA) and HE-stained sections captured at a final magnification of X200, a continuous segment of lamina propria was outlined and its surface area was measured. To evaluate the relative area of blood vessels, the "Grid\_class" plugin of ImageJ was used to create a grid whose density would ensure that the outlined segment would contain 100 points (Fig. 1A). The relative area occupied by blood vessels, including their luminal spaces, was then

estimated by point counting and expressed as percent of the reference space<sup>18</sup>, i.e., the outlined segment of lamina propria.

Vascular density was estimated using the "Cell Counter" plugin of ImageJ. Thus, the number of blood vessels in the outlined segment of lamina propria was counted and divided the previously measured area of this segment. For each animal, a total of 25 evenly spaced segments of lamina propria were used for these quantifications. Results were expressed as number of blood vessels per  $\mu\text{m}^2$ .

#### *Thickness of the arterial wall*

These measurements were carried out only in arteries located in the lamina propria, as defined above, and which had been sectioned at approximately right angles in relation to the long axis of the vessel. After staining tissue sections of the bladder wall with Weigert's resorcin fuchsin, images were captured at a final magnification of X1000 and the linear distance ( $\mu\text{m}$ ) between the internal and external elastic membranes was then measured using the ImageJ software (Fig. 1B). This region of the arterial wall roughly corresponds to the tunica media. Ten measurements were obtained from each artery, and from these values a mean thickness was calculated. A total of about 30 arteries were measured per animal.

#### *RT-PCR*

RNA extractions: Total RNA from bladder tissue was extracted using TRIZOL reagent (Invitrogen, California, USA) according to the manufacturer's protocol. Briefly,

bladders were homogenized in 1 ml of TRIZOL reagent per 50–100 mg of tissue. Then, RNA was extracted by a phenol/chloroform solution and precipitated by isopropyl alcohol. After washing with 75% ethanol, the RNA was dried and diluted with diethyl pyrocarbonate treated water. The quality of RNA samples was verified by the determination of the ratio 260/280 nm and by electrophoresis on a 1% agarose gel. The samples were stored at -80 °C until utilization.

Semi-quantitative RT-PCR: All RNA samples were rid of contaminating DNA by using DNA-free reagents (Invitrogen) according to the manufacturer's protocol. Then, 1 mg of RNA sample was used in a 20 µl cDNA reaction using Oligo dT and the Superscript cDNA synthesis system (Invitrogen) according to the manufacturer's protocol. PCRs were prepared using the equivalent of 2 µl cDNA per 50 µl reaction (triplicate) for each respective primer set using PCR reagents and Platinum Taq polymerase (Invitrogen). In order to quantify glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (Gapdh), VEGF, and basic FGF transcripts, we determined the optimal number of amplification cycles for each gene. The applied PCR primers and the cycle profiles used are described in Table 1. All amplified cDNA fragments were run on a 1.5% agarose gel stained with ethidium bromide, visualized under u.v. transillumination, and analyzed with the ImageJ software.

### *Statistical analysis*

For each variable under study, results from the three groups were first analyzed by one-way ANOVA. When significance was detected, the Bonferroni method of planned pairwise comparisons among means was used to determine whether radiation altered the

variable, and if this effect could be prevented by L-arginine supplementation. All numerical results are given as mean  $\pm$  standard deviation, and statistical significance was considered when  $p < 0.05$ .

## RESULTS

Quantitative assessment of blood vessels in the lamina propria of the rat bladder showed that, 15 days after radiation, the different combinations of treatments significantly affected their density (one-way ANOVA,  $p < 0.005$ ; Fig. 2) and relative area (one-way ANOVA,  $p < 0.025$ ; Fig. 3). Radiation alone decreased the density of blood vessels by 32% compared with non-radiated animals ( $7.35 \pm 1.12$  vessels/ $\mu\text{m}^2$  vs  $10.87 \pm 2.42$  vessels/ $\mu\text{m}^2$ , respectively;  $p < 0.01$ ). Because radioactivity reduced the relative vascular area by the similar amount of 25% in relation to non-radiated controls ( $11.97 \pm 2.06\%$  vs  $16.02 \pm 4.10\%$ , respectively;  $p < 0.05$ ), it can be inferred that the decrease in blood vessel density was not accompanied by appreciable changes in vascular lumen.

Results from the group that received L-arginine nutritional supplementation showed that this aminoacid prevented the aforementioned adverse effects of radiation. Accordingly, both the density ( $11.04 \pm 2.37$  vessels/ $\mu\text{m}^2$ ; Fig. 2) and relative area ( $17.79 \pm 4.76\%$ ; Fig. 3) of blood vessels in supplemented animals were not significantly different from those of non-radiated controls.

As an additional parameter for evaluating vascular morphology, we also measured the thickness of the wall of arteries in the lamina propria (Fig. 4). As with the density and relative area of blood vessels, arterial wall thickness was significantly affected by the treatments (one-way ANOVA,  $p < 0.001$ ). Radiation alone reduced arterial wall thickness by 42% compared with non-radiated controls ( $6.06 \pm 2.55$   $\mu\text{m}$  vs  $10.42 \pm 1.71$   $\mu\text{m}$ , respectively;  $p < 0.004$ ), but in radiated and supplemented animals ( $10.10 \pm 1.77$

$\mu\text{m}$ ), this parameter was not significantly different from that of non-radiated controls. Thus, radiation-induced decrease in arterial wall thickness was prevented by L-arginine supplementation.

Levels of mRNA for the soluble factors VEGF (Fig. 5) and FGF (Fig. 6) were similarly changed by the treatments (one-way ANOVA,  $p < 0.005$  and  $p < 0.025$ , respectively). Thus, mRNA levels of VEGF ( $0.177 \pm 0.092$ ) and FGF ( $0.557 \pm 0.227$ ) after radiation were significantly reduced by 67% ( $p < 0.002$ ) and 56% ( $p < 0.04$ ), respectively, when compared with the corresponding values of non-radiated control animals ( $0.543 \pm 0.175$  and  $1.253 \pm 0.562$ ). However, in radiated animals which also received L-arginine supplementation, mRNA levels of VEGF ( $0.565 \pm 0.243$ ) and FGF ( $0.874 \pm 0.302$ ) did not significantly differ from those of non-radiated controls. Therefore, L-arginine prevented the reductions in mRNA levels of VEGF and FGF caused by radiation.



## DISCUSSION

Experimental animal models have shown that the adverse effects of pelvic radiation on the bladder are time and dose dependent. With dose values of 10 Gy or greater, for example, these effects are quite apparent<sup>19</sup>. However, in view of its benefits, pelvic radiotherapy is widely used for the treatment of cancer, and dose is usually established based on tolerance of normal tissues. Although many studies on the side effects of radiotherapy have focused on collagen changes, vascular injury is one of the earliest alterations of tissues that are exposed to radiation. Damage to blood vessels, and the ensuing hypoxia and ischemia, contribute to the more severe alterations, such as fibrosis and/or necrosis<sup>1</sup>. In fact, pelvic radiation causes acute lesions in the bladder that can evolve to massive bleeding of difficult management<sup>7</sup>.

Fibrosis-inducing cytokines and growth factors are involved in the mechanisms of vascular lesions and fibrosis, in the migration and proliferation of smooth muscle cells, in enhanced collagen expression, and in the remodeling of the extracellular matrix<sup>1</sup>. VEGF is a cytokine that increases vascular permeability and is an endothelial mitogen. In addition to its angiogenic effects, VEGF also inhibits endothelial and smooth muscle cell apoptosis<sup>20</sup>. Additionally, it has been shown that VEGF protects endothelial cells in vitro against radiation<sup>1</sup>. These findings are consistent with our results, which showed that the decrease in the density and relative area of blood vessels in the lamina propria was accompanied by a decrease in the expression of VEGF. On the other hand, in L-arginine-treated animals, the greater availability of NO, which is a mediator of the angiogenic stimuli from different growth factors, including VEGF, explains the protective effects of this aminoacid against these changes. It is worth noting that

therapies that stimulate angiogenesis through the administration of growth factors have been used in different situations<sup>21</sup>), and experiments have shown that this effect reduces ischemia<sup>22</sup>.

The results obtained in the present study with regard to density and area of blood vessels, together with published data, indicate that radiation leads to a reduction in angiogenesis, either through an increase in the apoptosis of endothelial cells, or through a reduction of angiogenesis-stimulating factors<sup>7, 8</sup>. Several members of the FGF family have the capacity of protecting tissues against the harmful effects of radiation<sup>23</sup>. FGF enhances migration and replication of endothelial cells, epithelial cells, and fibroblasts<sup>24</sup>, and induces branching of small vessels, as occurs in vascular tissue recovering from lesions<sup>25</sup>. Thus, and much like VEGF, FGF also acts upon angiogenic pathways. Further, the continuous signaling of FGF is thought to play a critical role in maintaining vascular integrity and in regulating permeability of the underlying basement membrane<sup>26</sup>.

In the present study we showed that FGF expression was reduced in the radiated-only group, but in animals treated with radiation and L-arginine, this expression was similar to that of controls. It is likely that the increased availability of NO provided by the L-arginine supplementation reduced the effects of radiation on VEGF synthesis, so that expression of this angiogenic factor did not suffer significant alterations even after exposure to radiation. It should be noted that, while FGF signaling also involves NO, its angiogenic effects are less clearly tied to NO compared to VEGF<sup>27</sup>.

Our results also showed that radiation decreased the thickness of the arterial in the vesical lamina propria. Because the part of the arterial wall that was included in our

measurements was basically the tunica media, it can be inferred that this reduction in thickness was due mainly to atrophy or loss of smooth muscle cells, either as a direct effect of ionizing radiation, or through activation of apoptosis cascades<sup>7,8</sup> As L-arginine restored normal expression levels of VEGF and FGF in radiated animals, this protection against decrease in arterial wall thickness could also be attributed to the angiogenic effects of these growth factors, and to inhibition of smooth muscle cell apoptosis by VEGF, as discussed above.

## CONCLUSIONS

In conclusion, our results showed that pelvic radiation leads to significant changes in the morphology and density of blood vessels of the vesical lamina propria, and to marked reductions in the expression of VEGF and FGF in the bladder wall. These changes may compromise normal bladder function, but they could all be prevented by supplementing animals with L-arginine. These results emphasize, therefore, the potential use of this aminoacid as a radioprotective drug.

## References

1. Milliat F, François A, Tamarat R, Benderitter M: Role of endothelium in radiation-induced normal tissue damages. *Ann Cardiol Angiol* 2008; **57**: 139.
2. McGough C, Peacock N, Hackett C, et al: Taste preferences for oral nutrition supplements in patients before and after pelvic radiotherapy: a double-blind controlled study. *Clin Nutr* 2006; **25**: 906.
3. Turina M, Mulhall AM, Mahid SS, et al: Frequency and surgical management of chronic complications related to pelvic radiation. *Arch Surg* 2008; **143**: 46.
4. Jaal J, Dörr W: Radiation – Induced Damage to Mouse Urothelial Barrier. *Radiother Oncol* 2006; **80**: 250.
5. Jaal J, Dörr W: Radiation – Induced Inflammatory Changes in the Mouse Bladder: The Role of cyclooxygenase. *J Urol* 2006; **175**: 1529.
6. Jaal J, Dörr W: Radiation – Induced Late Damage to the Barrier Function of Small Blood Vessels in Mouse Bladder. *J Urol* 2006; **176**: 2696.
7. Kruse JJ, te Poele JA, Russell NS, et al: Microarray Analysis to Identify Molecular Mechanisms of Radiation – Induced Microvascular Damage in Normal Tissues. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2004; **58**: 420.
8. Rodemann HP, Blaese MA: Responses of Normal Cells to Ionizing Radiation. *Semin Radiat Oncol* 2007; **17**: 81.
9. Ersin S, Tuncyurek P, Esassolak M, et al: The prophylactic and therapeutic effects of glutamine- and arginine-enriched diets on radiation-induced enteritis in rats. *J Surg Res* 2000; **89**: 121.

10. McGough C, Baldwin C, Norman A, et al: Is Supplementation with Elemental Diet Feasible in Patients Undergoing Pelvic Radiotherapy? *Clin Nutr* 2006; **25**: 109.
11. Zhan Z, Ou D, Piao X et al: Dietary Arginine Supplementation Affects Microvascular Development in the Small Intestine of Early-Weaned Pigs. *J Nutr* 2008; **138**: 1304.
12. Mackenzie S, Rutherford D, MacDonald TM: Nitric oxide and cardiovascular effects: new insights in the role of nitric oxide for the management of osteoarthritis. *Arthritis Res Ther* 2008, **10** Suppl 2:S3.
13. Roth E: Immune and Cell Modulation by Amino Acid. *Clin Nutr* 2007; **26**: 535.
14. Bode-Böger SM, Böger RH, Galland A et al: L-Arginine induced vasodilation in healthy humans: pharmacokinetic-pharmacodynamic relationship. *Br J Clin Pharmacol* 1998; **46**: 489.
15. Hossler FE, Monson FC: Microvasculature of the rabbit urinary bladder. *Anat Rec* 1995; **243**: 438.
16. Diestel CF, Marques RG, Lopes-Paulo et al: Role of L-glutamine and glycine supplementation on irradiated colonic wall. *Int. J. Colorectal Dis* 2007; **22**: 1523.
17. Montes, GS. Structural biology of the fibres of the collagenous and elastic systems. *Cell Biol Int* 1996; **20**: 15.
18. Gundersen HJG, Bendtsen TF, Korbo L et al: Some new, simple and efficient stereological methods and their use in pathological research and diagnosis. *APMIS* 1988; **96**: 379.

19. Marks LB, Carroll PR, Dugan TC et al: The Response of the urinary bladder, urethra and ureter to radiation and chemotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1995; **31**: 1257.
20. Youssif M, Shiina H, Urakami S et al: Effect of Vascular Endothelial Growth Factor on Regeneration of Bladder Acellular Matrix Graft: Histologic and Functional Evaluation. *Urology* 2005; **66**: 201.
21. Benest AV, Stone OA, Miller WH et al: Arteriolar Genesis and Angiogenesis Induced by Endothelial Nitric Oxide Synthase Overexpression Results in a Mature Vasculature. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008; **28**: 1462.
22. Schierling W, Troidl K, Troidl C et al: The role of angiogenic growth factors in arteriogenesis. *J Vasc Res* 2009; **46**: 365.
23. Hagiwara F, Nakayama K, Motomura et al: Comparison of expression profiles of several fibroblast growth factor receptors in the mouse jejunum: suggestive evidence for a differential radioprotective effect among major FGF family members and the potency of FGF1. *Radiat Res* 2009; **172**: 58.
24. Tattini C, Manchio J, Zaporozhan V et al: Role of TGF- $\beta$  and FGF in the Treatment of Radiation-Impaired Wounds Using a Novel Drug Delivery System. *Plast Reconstr Surg* 2008; **122**: 1036.
25. Beenken A, Mohammadi M. The FGF family: biology, pathophysiology and therapy. *Nat Rev Drug Discov* 2009; **8**: 235.
26. Murakami M, Nguyen LT, Zhang ZW et al: The FGF system has a key role in regulating vascular integrity. *J Clin Invest* 2008; **118**: 3355.
27. Boodhwani M, Voisine P, Ruel M et al: Comparison of vascular endothelial growth factor and fibroblast growth factor-2 in a swine model of endothelial dysfunction. *Eur J Cardiothorac Surg* 2008; **33**: 645.

Table 1. Oligonucleotide sequences used for the amplification of RT-PCR and cycling conditions for the different sets of pairs

Gene	Sequence	Conditions	Cycle numbers
GAPDH	5'- ACCACAGTCCATGCCATC AC-3' 5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA- 3'	94°C/3 min, 94°C/30 sec 58°C/2 min, 72°C/2 min	30
bFGF	5'- GAACCGGTACCTGGCTAT GA-3' 5'-CCGTTTTGGATCCGAGTTTA- 3'	94°C/2 min, 94°C/1 min 55°C/1 min, 72°C/1 min, 72°C/15 min	33
VEGF	5'- GCCCATGAAGTGGTGAAG TT-3' 5'-ACTCCAGGGCTTCATCATT- 3'	94°C/2 min, 94°C/1 min 60°C/1 min, 72°C/1 min, 72°C/15 min	34



## FIGURE LEGENDS

Figure 1. HE-stained section of the lamina propria of the normal bladder wall with superimposed stereological grid and photographed at a final magnification of X200 (A). In this same tissue, sections were stained with Weigert's resorcin-fuchsin, which highlights the internal and external elastic membranes of the arterial wall in a photograph taken at X1000 (B).

Figure 2. Density of blood vessels in the lamina propria of the bladder wall from control (C), irradiated-only (I), and irradiated and L-arginine-treated (IA) rats. Results are given as number of vessels per  $\mu\text{m}^2$ , and bars represent the mean and standard deviation from ten animals in each group. The three means are significantly different (one-way ANOVA,  $p < 0.005$ ), and significant differences between a group and C are indicated by an asterisc (Bonferroni method,  $p < 0.01$ ).

Figure 3. Relative area of blood vessels in the lamina propria of the bladder wall from control (C), irradiated-only (I), and irradiated and L-arginine-treated (IA) rats. Results are given as percent of lamina propria area, and bars represent the mean and standard deviation from ten animals in each group. The three means are significantly different (one-way ANOVA,  $p < 0.025$ ), and significant differences between a group and C are indicated by an asterisc (Bonferroni method,  $p < 0.05$ ).

Figure 4. Wall thickness of arteries in the lamina propria of the bladder wall from control (C), irradiated-only (I), and irradiated and L-arginine-treated (IA) rats. Results are given in  $\mu\text{m}$ , and bars represent the mean and standard deviation from ten animals in

each group. The three means are significantly different (one-way ANOVA,  $p < 0.001$ ), and significant differences between a group and C are indicated by an asterisc (Bonferroni method,  $p < 0.004$ ).

Figure 5. VEGF mRNA expression in the bladder wall from control (C), irradiated-only (I), and irradiated and L-arginine-treated (IA) rats. Bars represent the mean and standard deviation from ten animals in each group. The three means are significantly different (one-way ANOVA,  $p < 0.005$ ), and significant differences between a group and C are indicated by an asterisc (Bonferroni method,  $p < 0.002$ ).

Figure 6. FGF mRNA expression in the bladder wall from control (C), irradiated-only (I), and irradiated and L-arginine-treated (IA) rats. Bars represent the mean and standard deviation from ten animals in each group. The three means are significantly different (one-way ANOVA,  $p < 0.005$ ), and significant differences between a group and C are indicated by an asterisc (Bonferroni method,  $p < 0.002$ ).

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)