



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

**EFEITO PROTETOR DA L-ARGININA E  
L-GLUTAMINA NO PÊNIS DE RATOS  
SUBMETIDOS À IRRADIAÇÃO PÉLVICA.**

**JORGE LUIZ MEDEIROS JÚNIOR**

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

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

**Co-orientador: Prof. Dr. Luiz Eduardo Macedo Cardoso**

**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-FISIOCIURURGIA

**EFEITO PROTETOR DA L-ARGININA E  
L-GLUTAMINA NO PÊNIS DE RATOS  
SUBMETIDOS À IRRADIAÇÃO PÉLVICA.**

**JORGE LUIZ MEDEIROS JÚNIOR**

**Rio de Janeiro  
2010**

## FICHA CATALOGRÁFICA

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

G172 Medeiros-Jr, Jorge Luiz .  
Efeito protetor da L-Arginina e L-Glutamina no pênis de ratos  
submetidos á irradiação pélvica I / Jorge Luiz Medeiros Júnior.- 2010.

xii f. : il.

Orientador : Waldemar Silva Costa.

Co-orientador : Luiz Eduardo Macedo Cardoso

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

Bibliografia: f. 61-67.

1. Testosterona - Uso terapêutico - Teses. 2. Terapia de reposição  
hormonal - Teses. 3. Bexiga - Histologia - Teses. 4. Androgenos - Teses. 5.  
Rato como animal de laboratório - Teses. I. Costa, Waldemar Silva. II.  
Cardoso, Luiz Eduardo Macedo. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro.  
Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

CDU

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

## **CONFLITO DE INTERESSES**

Não há conflito de interesses.

# ÍNDICE

	Página
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	
RESUMO	
ABSTRACT	
1 - INTRODUÇÃO	1
1.1 – Radiação	1
1.2 – L-arginina	2
1.3 – L-glutamina	2
1.4 – Pênis	3
1.4.1 – Anatomia macroscópica	3
1.4.2 – Anatomia microscópica	4
1.5 – Matriz Extracelular	6
1.5.1 – Elementos fibrosos da matriz extracelular	6
1.5.1.1 – Colágeno	6
1.5.1.2 – Fibras do sistema elástico	7
1.6 - Fibras musculares lisas	8
2- JUSTIFICATIVA E OBJETIVO	9
3 - MATERIAIS E MÉTODOS	10
3.1- Animais	10
3.2- Desenho Experimental	10
3.3- Método de Irradiação	12
3.4- Suplementação dos animais	13
3.4.1 - L-arginina	13
3.4.2 – L-glutamina	13
3.5- Morte dos Animais	14
3.6 - Análise Estrutural	14
3.6.1 –Procedimentos Histológicos	14

3.6.2 –Imunohistoquímica	15
3.6.3–Imunofluorescencia	15
3.7.- Análise de imagem e avaliação morfológica.	16
3.8- Morfometria	17
3.8.1 – Planimetria por contagem de pontos	17
3.8.1.1 - Corpo Caveroso	17
3.8.1.2 - Corpo Esponjoso	18
3.8.2 – Altura do Epitélio	18
3.8.3 – Densidade Celular	19
3.10 - Análise Estatística	20
4 – RESULTADOS	21
5 - DISCUSSÃO	30
6 - CONCLUSÕES	35
7 - REFERÊNCIAS	36
8 - ANEXO	43



## **LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

**C** – Grupo controle.

**RAD7** – Grupo Irradiado e morto após 7 dias de irradiação.

**RAD15** – Grupo Irradiado e morto após 15 dias de irradiação.

**RAD7+A** – Grupo Irradiado, suplementado com o aminoácido L-arginina e mortos após 7 dias de irradiação.

**RAD15+A** – Grupo Irradiado, suplementado com o aminoácido L-arginina e mortos após 15 dias de irradiação.

**RAD7+G** – Grupo Irradiado, suplementado com o aminoácido L-glutamina e mortos após 7 dias de irradiação

**RAD15+G** – Grupo Irradiado, suplementado com o aminoácido L- glutamina e morto após 15 dias de irradiação

**RAI** = radiação associada a impotência

**Gy** = gray

**MeV** = mega eletron volts

**BSA** = Albumina Sérica Bovina

**Av** = densidade de área

**DAB** - 3,3, diamino-benzidina tetrahydrocloridro

**TACE** = túnica albugínea do corpo esponjoso

## ABSTRACT

### PROTECTIVE EFFECTS OF L-ARGININE AND L-GLUTAMINE ON THE PENIS OF RATS SUBMITTED TO PELVIC RADIATION

**Introduction:** External beam radiation therapy is widely used for the management of pelvic malignant tumors. Although the anatomical area receiving the treatment is a major concern, and measures are taken to reduce side effects, tissues adjacent to the target tumor may nonetheless be affected. Preliminary experimental data from humans and animals have shown that deleterious effects of radiation can be minimized by dietary supplements such as L-arginine and L-glutamine which are taken before and during radiotherapy sessions. The aim of the present investigation was therefore to determine whether L-arginine (A) and L-glutamine (G) has protective effects against radiation-induced alterations in major components of the penis. **Materials and Methods:** Wistar rats aged 3 to 4 months were used. Controls consisted of non-treated animals, while animals belonging to the other groups were submitted to pelvic radiotherapy on the 8th day of the experiment. Animals were irradiated with a single dose of 1,164 cGy applied to the pelvic region, and then were killed 7 (groups RAD7, RAD7+A, RAD7+G) and 15 (groups RAD15, RAD15+A, RAD15+G) days after irradiation. The amino acids were administered once a day (0.65 g/kg body weight), starting 7 days before the irradiation until the last day of experiment. Control and irradiated-only animals received 5 mL of water once a day throughout the experiment. Histochemical techniques were performed for the stereological analysis of smooth muscle, collagen and elastic system fibers of corpus cavernosum. In the corpus spongiosum we analyzed only the elastic system fibers of the tunica albuginea. ImageJ software was used to quantify with 100 points grid. In the urethra we analyzed the thickness of urothelium and cell density. Confocal laser Immunohistochemistry was used for the qualitative analysis of collagen types I and III. Statistical analysis was performed by one way ANOVA and by Bonferroni post-test. **Results:** RAD15 group showed a significant increase in collagen amount ( $p < 0.004$ ). Smooth muscle increased in RAD7, RAD7+G, RAD7+A, RAD15+A and RAD15+G groups ( $p < 0.05$ ). Elastic system fibers of the corpus cavernosum increased in RAD15 and RAD15+G ( $p < 0.05$ ) when compared to control and RAD15+A groups. Elastic system fibers of the tunica albuginea of corpus spongiosum increased in RAD7 and RAD15, but protective effects of both amino acids were only observed after 15

days. Radiation-induced decrease in cell density and thickness of the urothelium were seen only after 15 days ( $p < 0.004$ ) when compared with controls, and L-arginine and L-glutamine partially prevented these changes. Qualitative analysis of collagen type I showed an increase in RAD15, but there were no noticeable changes in the quantity of collagen III. In the tunica albuginea of the corpus spongiosum the large amount of elastic fibers confirms the quantitative results. **Conclusions:** The adverse effects on penile structures tend to be more pronounced at 15 days after radiation, compared with 7 days. L-arginine and L-glutamine prevent these radiation-induced changes in penile structures, although L-arginine is slightly more effective.

Key words: Radiotherapy, L-arginine, L-glutamine, penis, extracellular matrix

## RESUMO

### EFEITO PROTETOR DA L-ARGININA E L-GLUTAMINA NO PENIS DE RATOS SUBMETIDOS À IRRADIAÇÃO PELVICA.

**Introdução:** A terapia por radiação externa é amplamente utilizada no tratamento de tumores pélvicos malignos. Entretanto a área anatômica recebendo o tratamento é a mais afetada e medidas foram tomadas para reduzir os efeitos colaterais tecidos adjacentes ao local do tumor podem ser afetados. Dados experimentais preliminares obtidos em humanos e animais mostraram que efeitos deletérios da radiação podem ser minimizados com uma dieta que contenha suplementos como L- arginina e L – glutamina as quais foram ingeridas antes e durante as sessões de radioterapia. O objetivo do presente trabalho foi determinar se a L-arginina e a L-glutamina apresentam efeitos protetores contra as alterações provocadas pela radiação nos principais componentes do penis. **Material e Método:** Foram utilizados Ratos Wistar com idade variando entre três a quatro meses. O grupo controle foi formado por animais não tratados, enquanto animais pertencentes aos outros grupos foram submetidos a radiação pélvica no oitavo dia do experimento. Os animais foram irradiados com uma dose única de 1.164 cGy aplicada a região pélvica e mortos sete dias após (grupos RAD7, RAD7+A, RAD7+G) e 15 dias após a irradiação (grupos RAD15, RAD15+A e RAD15+G). Os aminoácidos foram administrados uma vez por dia (0,65g/Kg por peso corporal), começando sete dias antes da irradiação e terminando no último dia do experimento. O grupo controle e os animais apenas irradiados receberam 5 mL de água uma vez por dia durante o experimento. Foram utilizadas técnicas histoquímicas para a análise estereológica das fibras musculares, colágeno e fibras do sistema elástico do corpo cavernoso. No corpo esponjoso foram analisadas as fibras do sistema elástico da túnica albugínea. O software Image J com uma grade de 100 pontos foi usado na quantificação dos diferentes elementos. Na uretra foram analisadas a altura do urotélio e a densidade celular. O microscópio confocal foi utilizado para caracterizar através de imunofluorescencia os colágenos I e III. A análise estatística foi feita utilizando-se o teste one way ANOVA e o pos-teste de Bonferroni. **Resultados:** O grupo RAD15 mostrou um aumento significativo na quantidade de colágeno ( $p < 0,004$ ). As fibras musculares lisas aumentaram nos grupos RAD7, RAD7+G, RAD7+A, RAD15+A e RAD15+G ( $p < 0,05$ ) quando comparados ao grupo controle. As fibras do sistema elástico dos corpos cavernosos aumentaram nos grupos RAD15 e RAD15+G ( $p < 0,05$ )

quando comparados ao grupo controle e ao grupo RAD15+A. As fibras do sistema elástico da túnica albugínea do corpo esponjoso aumentou nos grupos RAD7 e RAD15, mas os efeitos protetores de ambos os aminoácidos foram apenas observados após 15 dias. A radiação leva a uma diminuição na densidade celular e na altura o urotélio as quais foram observadas apenas após 15 dias ( $p < 0,004$ ) quando comparados ao controle e a L-arginina e L-glutamina parcialmente previnem estas modificações. A análise qualitativa do colágeno tipo I mostrou um aumento no grupo RAD15, mas não foram observadas modificações importantes na quantidade do colágeno tipo III. Na túnica albugínea do corpo esponjoso a grande quantidade de fibras do sistema elástico confirma os resultados quantitativos. **Conclusão:** Os efeitos adversos nas estruturas penianas tendem a ser mais pronunciadas após 15 dias da irradiação quando comparada com o efeito após 7 dias. A L-arginina e a L-glutamina previnem as mudanças em consequência da irradiação nas estruturas penianas. No entanto a L-arginina parece ser mais efetiva.

Palavras-chave: Radioterapia, L-arginina, L-glutamina, pênis, matriz extracelular.

## **1 - INTRODUÇÃO**

### **1.1 - RADIAÇÃO**

A Radiação ionizante permanece como uma das ferramentas mais eficazes no tratamento de câncer, tendo um papel importante no tratamento de muitas doenças malignas abdominais e pélvicas. Apesar dos recentes progressos nos procedimentos de radioterápicos é difícil restringir a ação da radioterapia a locais específicos [1]. Diversos estudos demonstraram alterações causadas pela radiação em tecidos próximos aos órgãos alvos, como nos tratamentos do câncer de próstata e bexiga afetando os tecidos eréteis do pênis, mucosas intestinais e urinárias entre outros [2-4]. Os efeitos indesejáveis da radiação podem advir conseqüências que afetam a qualidade de vida do paciente como morbidade urinária, disfunção erétil e sangramento retal [1, 4, 5].

A perda da função sexual em homens que sofreram irradiação pélvica é uma das seqüelas comuns decorrente do tratamento. A associação entre disfunção erétil e radioterapia foi mostrada em vários estudos[5-8]. A impotência associada à irradiação (RAI) varia de 22% a 84%. A RAI apresenta um começo variável, normalmente progressivo e irreversível [8]. As deficiências hemodinâmicas eréteis resultantes de tratamentos radioterápicos estão associadas a lesões neurovasculares (mecanismos venoclusivos e arteriais) e também afetam os tecidos eréteis do pênis compostos predominantemente de células endoteliais, músculo liso, colágeno e fibras do sistema elástico [7-9]. No corpo cavernoso sabe-se que as alterações morfológicas destes componentes, podem estar associadas a disfunção erétil após o tratamento radioterápico, porém ainda foram descritos resultados quantitativos em relação as essas modificações.

### **1.2 - L-ARGININA**

A L-arginina é um aminoácido dibásico, não-essencial, isto é, pode ser sintetizada por indivíduos adultos em condições fisiológicas de homeostase [10-12].

A arginina encontra-se envolvida na síntese protéica, na biossíntese de aminoácidos e seus derivados e no metabolismo da uréia. Sendo essencial na desintoxicação da amônia [13]. Além disso, é um dos substratos precursores do óxido nítrico, o qual desempenha importante função na regulação do tônus vascular, pressão arterial, controle de respostas imunológicas de diferentes órgãos, mecanismo de ereção, hipertensão, morte celular e na proteção contra danos oxidativos [13, 14].

A arginina exerce importantes ações metabólicas, principalmente no sistema imunológico, sendo classificado como condicionalmente essencial em situações de trauma e estresse [15]. Estudos demonstraram que a suplementação com L-arginina previnem ou auxiliam no reparo dos danos causados por doenças cardiovasculares, pulmonares, hepáticas, renais, gastrointestinais, bem como na cicatrização de feridas e manutenção da integridade do tecido, devido seu importante papel mediando processos de angiogênese, epitelização e formação de colágeno através da produção hidroxiprolina, molécula envolvida na síntese de colágeno [11, 16].

### **1.3 - L-GLUTAMINA**

A L-glutamina é um aminoácido neutro e não-essencial. No entanto, tem sido considerado como condicionalmente essencial pelo aumento de sua demanda em situações catabólicas. É o aminoácido mais abundante no plasma e músculo esquelético [12].

Diversas células e tecidos utilizam a L-glutamina como importante combustível para sua manutenção. Entre elas estão as células tumorais, fibroblastos, linfócitos, macrófagos e enterócitos [17]. A glutamina atua ainda como condutora de nitrogênio entre os órgãos, podendo ser

precursora de peptídeos e proteínas, bem como de açúcares aminoácidos, purinas, e pirimidinas, participando assim na síntese de nucleotídeos e ácidos nucléicos [18].

A L-glutamina possui função imunológica auxiliando na regulação de monócitos, linfócitos e de células *natural killer* em diversos órgãos como intestino e baço. Constitui-se ainda num substrato para produção da glutathione, que protege os tecidos normais contra o dano oxidativo nas células [19].

A L-arginina e L-glutamina possuem a capacidade de sintetizar citrulina. Esse fato pode explicar algumas respostas semelhantes desses dois aminoácidos. A síntese L-arginina ocorre nos rins e a síntese de L-glutamina no intestino [15].

Diversos estudos mostram que a administração dos aminoácidos L-arginina e L-glutamina, antes e depois da irradiação, desempenham efeito protetor nas alterações causadas pela irradiação como p.e no intestino [15, 20].

## **1.4 - PÊNIS**

### **1.4.1 – Anatomia macroscópica**

O pênis do rato é composto por corpos cilíndricos de estrutura erétil: um par de corpos cavernosos, unidos entre si e situados dorsalmente ao corpo esponjoso, situado ventralmente, além de fâscias, nervos e vasos, todos recobertos pela pele. A maior parte do pênis é formada pelos corpos cavernosos, os quais se originam na sínfise púbica correndo lado a lado. Ventralmente aos corpos cavernosos localiza-se o corpo esponjoso, que abriga no seu interior a uretra e possui duas dilatações: uma proximal, o bulbo esponjoso e outra distal, a glândula do pênis. Estas estruturas são envolvidas por uma camada de tecido fibroso, a túnica albugínea, que varia



em espessura tornando-se mais delgada ao envolver o corpo esponjoso (Figura 1)

Próximo ao seu terço distal, a haste peniana apresenta uma flexura em ângulo reto. Apresenta pouco tecido erétil e um processo ósseo localizado mais distalmente [21]. (Figura 2)

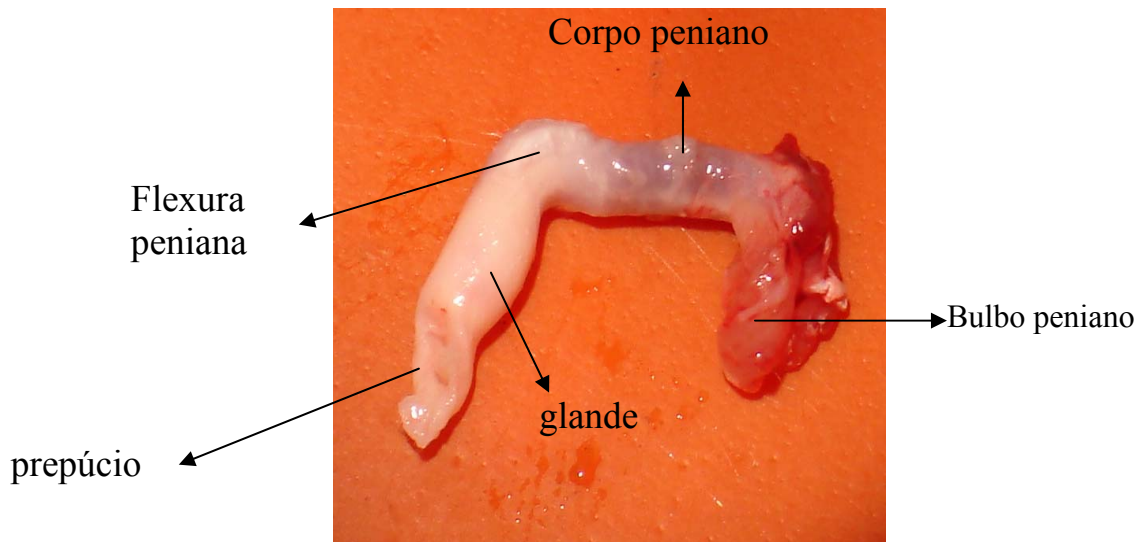


Figura 1 – Pênis de Rato, vista lateral.

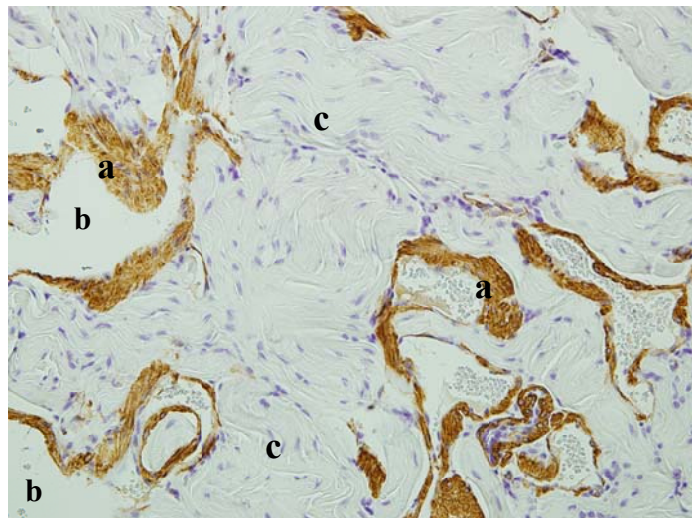
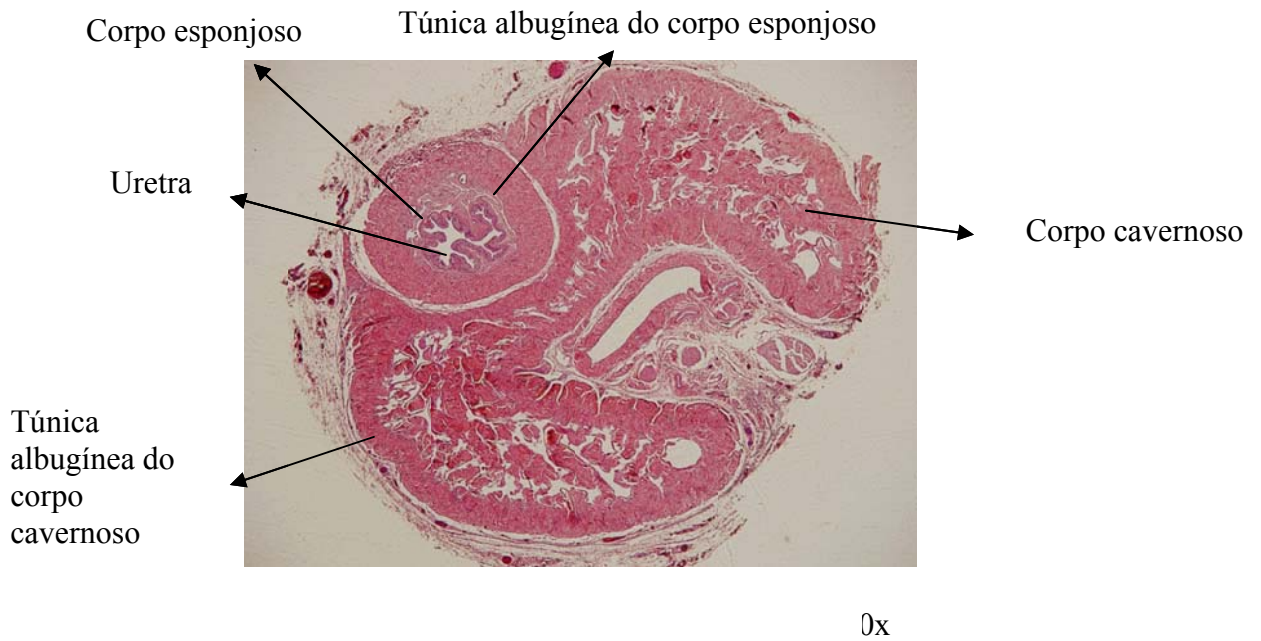
#### 1.4.2 – Anatomia microscópica

Os corpos cavernosos são formados por uma discreta camada de células musculares lisas localizadas na região subendotelial que circunda os espaços vasculares os sinusóides, situados entre as trabéculas (Figura 3). São encontrados feixes longitudinais e transversais. As fibras musculares lisas dos corpos cavernosos são os elementos que se encontram em menor número entre os componentes do corpo cavernoso do pênis [22].

As fibras colágenas são constituintes mais numerosos das trabéculas dos corpos cavernosos. Estão dispostas compactamente e entremeadas com prolongamentos citoplasmáticos de fibroblastos.

As fibras do sistema elástico encontram-se presentes nos corpos cavernosos como uma malha frouxa e ramificada. Na periferia do corpo

cavernoso as fibras são mais espessas formando um eixo paralelo ao longo do pênis [22].



(b)  
de

## 1.5 - MATRIZ

A matriz extracelular (MEC) corresponde a uma rede estrutural complexa formada por macromoléculas que circundam e sustentam as células dentro do tecido conjuntivo. A MEC é formada por diferentes moléculas que são produzidas e exportadas pelas células modulando a

estrutura, fisiologia e biomecânica dos tecidos. A MEC é dividida em dois componentes principais:

- Componentes fibrilares - colágeno e fibras do sistema elástico;
- Componentes não fibrilares – proteoglicanos e glicoproteínas não colagênicas [23, 24].

### **1.5.1 - Elementos fibrosos da matriz extracelular (componentes fibrilares)**

#### **1.5.1.1 - Colágeno**

As fibras colágenas são as proteínas fibrosas mais abundantes no reino animal, representando cerca de 1/3 do total das proteínas encontradas nos tecidos e resistentes a tensão [25, 26]. As fibras colágenas são constituídas por três cadeias protéicas longas organizadas em  $\alpha$ -hélice. Uma característica do colágeno é que 30% dos aminoácidos correspondem à glicina. A estrutura primária das cadeias é formada por uma sequência de três aminoácidos: Gly-X-Y (domínios colagênicos), que se repetem por grandes extensões. Os aminoácidos colocados nas posições x e y são frequentemente prolina e hidroxiprolina, respectivamente. Cada cadeia de colágeno tem suas próprias características quanto à composição de aminoácidos, que são utilizados para identificar o tipo de colágeno [27].

O tamanho e a forma das fibras de colágeno variam dependendo do tecido e do órgão, mesmo dentro da mesma espécie. Seu diâmetro pode variar de 1 a 20  $\mu\text{m}$  e apresentam um curso ondulado, mesmo se elas formam fibras densas de tecido conjuntivo como, por exemplo, nos tendões. A organização de forma ondulada dessas fibras provavelmente promove maior resistência dessas fibras, a fim de resistir às tensões diretas sobre as fibras de colágeno [25].

### **1.5.1.2 - Fibras do sistema elástico**

No tecido conjuntivo, as fibras do sistema elástico distinguem-se facilmente das colágenas por serem mais delgadas e não apresentarem estriação transversal. Essas fibras cedem facilmente mesmo a trações mínimas, retomam sua forma inicial após o término das forças deformantes [28, 29].

As fibras do sistema elástico apresentam uma cor amarelada quando observadas a fresco e são caracterizadas pelo alto grau de extensibilidade que apresentam. São encontradas em tecidos que são constantemente submetidos a grandes forças de estiramento [30].

A fibra elástica é uma estrutura complexa formada por elastina, proteína microfibrilar, lisil-oxidase, e proteoglicanos [29].

Sabe-se que, durante o processo de formação de uma fibra elástica, o componente microfibrilar é o primeiro que aparece. Em seguida a elastina é depositada provavelmente devido a interação iônica entre a elastina e a superfície microfibrilar como consequência de suas cargas opostas [29, 31].

De acordo com o grau de associação entre esses componentes as fibras do sistema elástico são divididas em três tipos:

- 1- Fibras elásticas: constituídas em sua maior parte de elastina, em posição central, número reduzido de microfibrilas em posição periférica;
- 2- Fibras elaunínicas: com pouca elastina e grande número de microfibrilas organizadas em feixes;
- 3- Fibras oxitalânicas: compostas somente por microfibrilas [30].

## **1.6 - FIBRAS MUSCULARES LISAS**

A musculatura lisa dos corpos cavernosos do pênis apresenta-se geralmente como feixes ou folhetos de células fusiformes alongadas, com

extremidades finas e gradativamente afiladas. As células variam quanto ao comprimento: de 20µm nas paredes de pequenos vasos sanguíneos a cerca de 200 µm. Os núcleos das células musculares lisas estão localizados no centro da célula e têm com frequência aparência de saca rolhas nos cortes longitudinais. Essa característica é o resultado da contração celular durante a fixação, frequentemente útil para se distinguir células musculares lisas dos miofibroblastos nos cortes histológicos de rotina. Na célula não contraída, o núcleo aparece como uma estrutura alongada com extremidades afiladas gradativamente, situada no eixo central da célula. Quando é submetido a um corte transversal, o núcleo de uma fibra muscular lisa aparece como um perfil arredondado ou circular, se a célula estiver contraída ou relaxada [23, 24].

## **2. – JUSTIFICATIVA E OBJETIVO**

A justificativa do presente trabalho é que, após tratamento radioterápico em órgãos vizinhos ao pênis, os tecidos eréteis possam ser afetados acarretando como consequência a disfunção erétil. Portanto o objetivo do presente trabalho é testar em animais submetidos à irradiação a hipótese que a L-arginina e L-glutamina desempenham um efeito protetor, em curto e médio prazo, minimizando os efeitos colaterais da radioterapia.

### **3. MATERIAL E MÉTODO**

#### **3.1 - Animais**

Foram utilizados 70 ratos Wistar machos com idade entre 3 a 4 meses, provenientes do biotério do Laboratório de Cirurgia Experimental da Faculdade de Ciências Médicas (UERJ). O experimento foi realizado no Laboratório de Pesquisa Urogenital, (UERJ). Os animais foram mantidos em condições ambientais controladas de temperatura ( $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ) e ciclo claro-escuro constante (12 horas cada) recebendo ração comercial apropriada para a espécie e água *ad libitum* durante todo experimento.

Este estudo foi submetido e aprovado no comitê de ética em pesquisa da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ).

### 3.2 - Desenho Experimental

Os animais foram divididos aleatoriamente em 7 grupos de 10 animais conforme descrito a seguir:

- – **Grupo controle (C)**. Animais não irradiados e gavados com água filtrada durante 14 dias do experimento com início no dia 0 e mortos no 15º dia após o início do experimento
- – **Grupo irradiado 7 dias (RAD7)**, - Os animais foram irradiados no 7º dia após início do experimento e gavados com água filtrada durante 14 dias, sendo este procedimento, iniciado 7 dias antes da irradiação e contínuo até o final do experimento. Os animais foram mortos no 8º dia após a irradiação.
- – **Grupo suplementado com L-arginina e irradiado 7 dias (RAD7+A)** - Os animais foram irradiados em dose única no 7º dia após início do experimento e suplementados com o aminoácido L-arginina durante 14 dias, sendo este procedimento, iniciado 7 dias antes da irradiação e contínuo até o final do experimento. Os animais foram mortos no 8º dia após a irradiação.
- - **Grupo suplementado com L-glutamina e irradiado 7 dias (RAD7+G)** - Os animais foram irradiados em dose única no 7º dia após início do experimento e suplementados com o aminoácido L-glutamina, durante 14 dias, sendo este procedimento, iniciado 7 dias antes da irradiação e contínuo até o final do experimento. Os animais foram mortos no 8º dia após a irradiação
- - **Grupo irradiado 15 dias (RAD15)** – Os animais foram irradiados no 7º dia após início do experimento e gavados com água filtrada durante 21 dias, sendo este procedimento iniciado 7 dias antes da

irradiação e contínuo até o final do experimento. Os animais foram mortos no 15º dia após a irradiação

- - ***Grupo suplementado com L-arginina e irradiado 15 dias (RAD15+A)*** Os animais foram irradiados no 7º dia após início do experimento e suplementados com L-arginina durante 21 dias, sendo este procedimento, iniciado 7 dias antes da irradiação e contínuo até o final do experimento. Os animais foram mortos no 15º dia após a irradiação.
- - ***Grupo suplementado com L-glutamina e irradiado 15 dias (RAD15+G)***. Os animais foram irradiados no 7º dia após início do experimento e suplementados com L-glutamina durante 21 dias sendo este procedimento, iniciado 7 dias antes da irradiação e contínuo até o final do experimento. Os animais foram mortos no 15º dia após a irradiação.

### **3.3 - Método de Irradiação**

Os animais dos grupos, RAD7, RAD15, RAD7+A, RAD15+A, RAD7+G e RAD15+G, foram imobilizados em recipientes plásticos cilíndricos e submetidos à dose única de irradiação de 10 Gy utilizando um feixe de 10 MeV de fótons gerados por um acelerador linear (Clinac 2100C, Varian, Palo Alto, E.U.A.). A dose foi liberada a uma distância fonte pele de 100 cm, a uma taxa de 2,4 Gy / minuto para 4,16 minutos, e visava à região pélvico-abdominal, enquanto que outros campos estavam protegidos. (Figura 4 e 5) Todos os procedimentos referentes à irradiação foram realizados no Centro Universitário de Controle do Câncer (CUCC) parte integrante do Hospital Universitário Pedro Ernesto (UERJ)





Figura 4 - posicionamento dos animais



Figura 5 – Seleção dos campos a serem irradiados

### **3.4 - Suplementação dos animais**

#### **3.4.1 - *L-arginina***

Nos animais dos grupos, RAD7+A e RAD15+A, foi administrada solução aquosa a 4% de L-arginina (Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA). Esta suplementação ocorreu uma vez ao dia, sempre no mesmo horário, em dose de 0,65 g / kg de peso, perfazendo volume final de cinco mililitros. As doses foram administradas por via orogastrica utilizando-se sonda metálica [32, 33].

#### **3.4.2 - *L-glutamina***

Os animais dos grupos RAD7+G e RAD15+G foram suplementados com solução aquosa a 4% de L-glutamina (Resource Glutamina, Novartis, Rio de Janeiro, Brasil). As doses foram administradas uma vez ao dia,

sempre no mesmo horário, em dose de 0,65 g / kg de peso, perfazendo volume final de 5 mililitros. As doses foram administradas por via orogastrica utilizando-se sonda metálica [15, 20].

Os grupos RAD7, RAD15 e C que não foram suplementados com nenhum dos aminoácidos receberam o mesmo volume de água no mesmo período.



Figura 6 – Suplementação utilizando sonda metálica orogastrica

### **3.5 - Morte dos Animais**

Os animais foram mortos no 8º e 16º dias após a radiação conforme descrito anteriormente. Os ratos foram mortos por sobredose de tiopental sódico (Cristália, São Paulo, Brasil).

### **3.6 - Análise Estrutural.**

#### **3.6.1 - Procedimentos Histológicos**

Para a análise histológica foi utilizado o terço médio do corpo do pênis (Figura 7). As amostras foram lavadas em solução salina (0,9% NaCl) e fixadas por imersão em formalina 10% em tampão fosfato salino (PBS) por período mínimo de 24 horas.

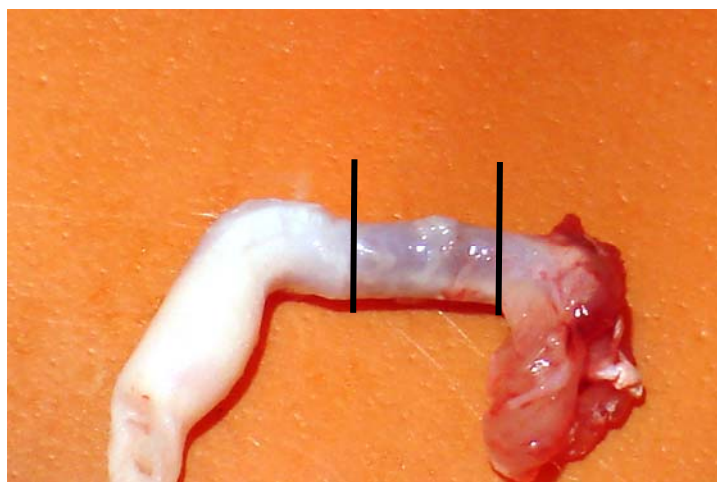


Figura 7 – Pênis de Rato, com o terço médio selecionado

O material foi submetido às técnicas histológicas de rotina: desidratado em álcool e clarificado em xilol para posterior inclusão em parafina. Foram feitos cortes histológicos com 5  $\mu$ m espessura e corados pela Hematoxilina & Eosina para verificar a integridade dos tecidos. Para evidenciar as fibras do sistema elástico foi utilizada a técnica da Resorcina Fucsina de Weigert com prévia oxidação. O Tricrômico de Masson foi utilizado para evidenciar o tecido conjuntivo, músculo liso e células epiteliais.

### **3.6.2 - *Imunohistoquímica***

Foi realizada a técnica de Avidina Biotina para a identificação das células musculares lisas, utilizando anticorpo monoclonal anti-mouse anti- $\alpha$  actina de músculo liso (Zymed Laboratórios, número do catálogo 08-0106 Carlsbad, CA, E.U.A.)

Foram realizados controles negativos substituindo o anticorpo primário por PBS e controles positivos usando fragmentos de tecido (pele) que apresentam os antígenos pesquisados. A revelação foi feita com solução de 3,3, diamino-benzidina tetrahidroclorido (DAB) (Zymed Laboratórios, numero do catálogo 002014 Carlsbad, CA, E.U.A.) a 0,1% em H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, lavados em água destilada, desidratado em uma serie crescente de etanol diafanizados em xilol e montados com Ethelan.

### 3.6.3 - *Imunofluorescência*

Foi realizada a técnica imunofluorescência indireta para identificação das fibras do sistema elástico e do colágeno tipos de I e III. Foram utilizados os seguintes anticorpos primários *Rabbit polyclonal to elastin* (Abcam, número do catálogo AB21610 Cambridge, MA, U.S.A) em concentração 1:50, *mouse monoclonal to collagen I* (Abcam, número do catálogo AB6308, Cambridge, MA, U.S.A) em concentração 1:50 e *mouse monoclonal to collagen III* com concentração 1:100 (Abcam, número do catálogo AB6310, Cambridge, MA, U.S.A). Foram utilizados bloqueios para grupamentos aldeídicos com soluções de Cloreto de amônio 50 mM e glicina à 2% por 30 min cada. Após sucessivas lavagens com PBS pH 8.0, foram realizados bloqueios para sítios inespecíficos com a utilização de PBS albumina sérica bovina (BSA) 3% e leite desnatado a 10% . O anticorpo primário foi incubado overnight a 4°C. Em seguida, os cortes foram lavados em banhos sucessivos de PBS pH 8.0. Posteriormente foi realizado o bloqueio com PBS BSA 3 % 15 minutos e retirado sem lavagem prévia e incubado com o anticorpo secundário fluorescente *Alexa Fluor 488 goat anti-mouse IgG* (Invitrogen, número de catálogo A-11001 Camarillo, CA, E.U.A) na concentração 1:100 por 1 hora em temperatura ambiente, logo após foram realizadas 3 banhos de 5 min em PBS pH 8.0, e para evidenciar o núcleos das células foi utilizado *4',6-diamidino-2-phenylindole, dihydrochloride* (DAPI) (Invitrogen, número do catálogo D1306, Camarillo, CA, E.U.A) por 15 min, novamente o material foi lavado com 3 banhos de 5 min de H2O destilada. Os cortes foram colocado em solução de azul de Evans por 10 min e montado utilizando o *Slowfade antifade kit* (Invitrogen, número de catálogo S2828, Camarillo, CA, E.U.A) e visualizados no microscópio confocal a laser Zeiss S510 .

### **3.7 - Análise das imagens e avaliação morfológica.**

Todos os cortes de tecido utilizados para microscopia de luz foram fotografados sob as mesmas condições e com uma resolução de 2040 X 1536 pixels, com uma câmera digital (Olympus DP70, Tóquio, Japão) diretamente acoplado ao microscópio (Olympus BX51, Tóquio, Japão).

### **3.8 – Morfometria**

#### **3.8.1 – Planimetria por contagem de pontos**

##### **3.8.1.1 - *Corpo Cavernoso***

As análises morfométricas de músculo liso e tecido conjuntivo do corpo cavernoso foram realizadas utilizando-se fotomicrografias obtidas com objetiva de 20 X. As fibras do sistema elástico do corpo cavernoso foram analisadas em imagens capturadas com objetiva de 100 X .

A versão software ImageJ 1,41 (NIH, Bethesda, E.U.A.), carregada com o seu próprio plugin grid.class (<http://rsb.info.nih.gov/ij/plugins/>), foi usada para gerar uma grade contendo 100 pontos. A grade foi sobreposta as fotomicrografias digitais dos tecidos eréteis do corpo cavernoso. A densidade de área ( $A_v$ ) do músculo liso, tecido conjuntivo, e fibras do sistema elástico foram determinadas pela contagem de pontos e expressa por percentagem do espaço de referência (Figura 8).

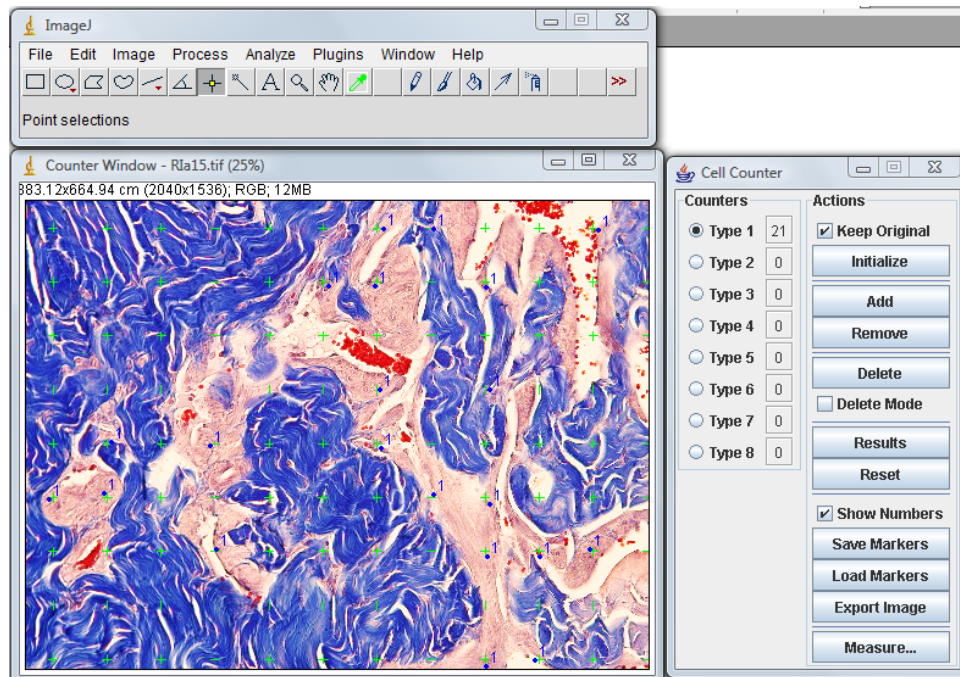


Figura 8- Quantificação de músculo liso utilizando a grade 100 pontos gerada a partir do software *Image J* e utilizando a ferramenta “*cell counter.*”

### 3.8.1.2 - *Corpo esponjoso*

No corpo esponjoso foram avaliadas as fibras do sistema elástico na túnica albugínea. As fotomicrografias foram feitas utilizando objetiva 40x e as análises foram realizadas através de método de morfométrico utilizando a grade de 100 pontos de maneira similar à quantificação dos corpos cavernosos.

### 3.8.2 - *Altura do epitélio da uretra*

A avaliação morfométrica da altura do epitélio da uretra foi realizada com um aumento final de 200 X, tendo como parâmetros o pólo basal das células da primeira camada e o pólo apical das células da camada superior. Foram realizadas 20 medidas lineares em cada corte (Figura 9 e 10).

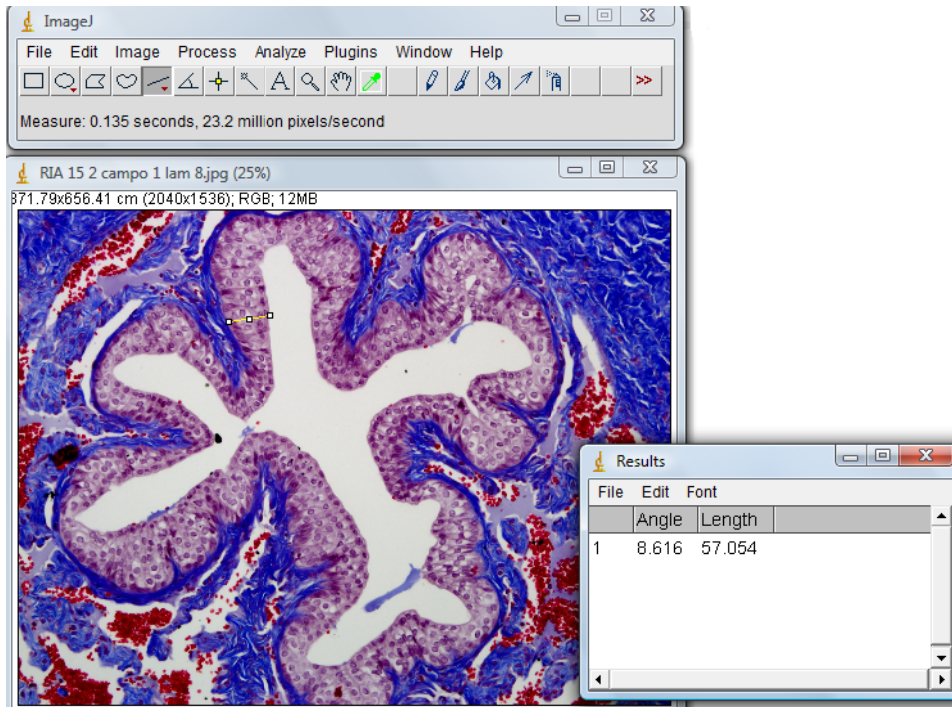


Figura 9 – Utilização do software *image J* para morfometria do epitélio da uretra, início da aferição da altura do epitélio utilizando a ferramenta “*straight line selection*” – Tricrômico de Masson – 200x.

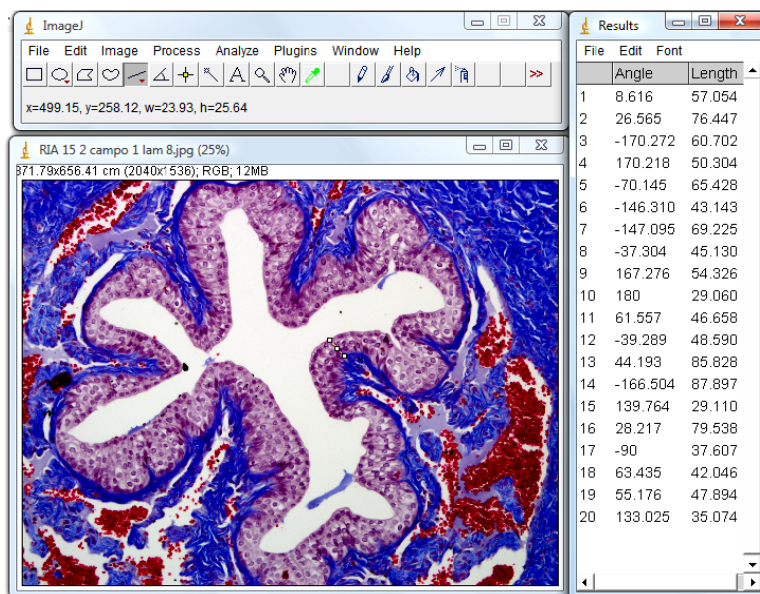


Figura 10 – Término da aferição após 20 medidas em torno da fotomicrografia da uretra – Tricrômico de Masson – 200x

### 3.8.3 - Densidade Celular do epitélio da uretra

A densidade celular foi feita através da proporção do número de núcleos de células epiteliais dividido pela área selecionada e expressa em núcleos por  $\text{mm}^2$ . Foi utilizado um aumento final de 400 X (Figura 11 e 12).

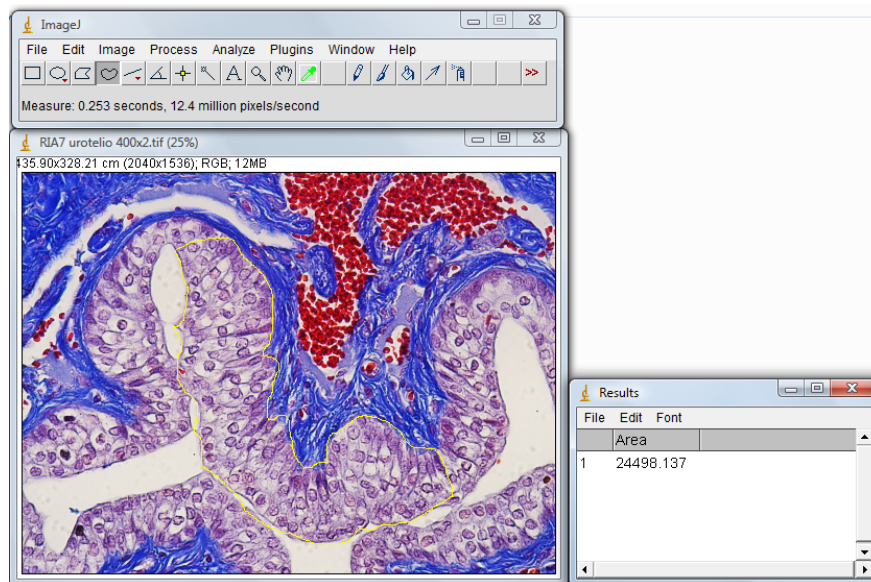


Figura 11 – Seleção da área epitélio e o valor da área a ser quantificada

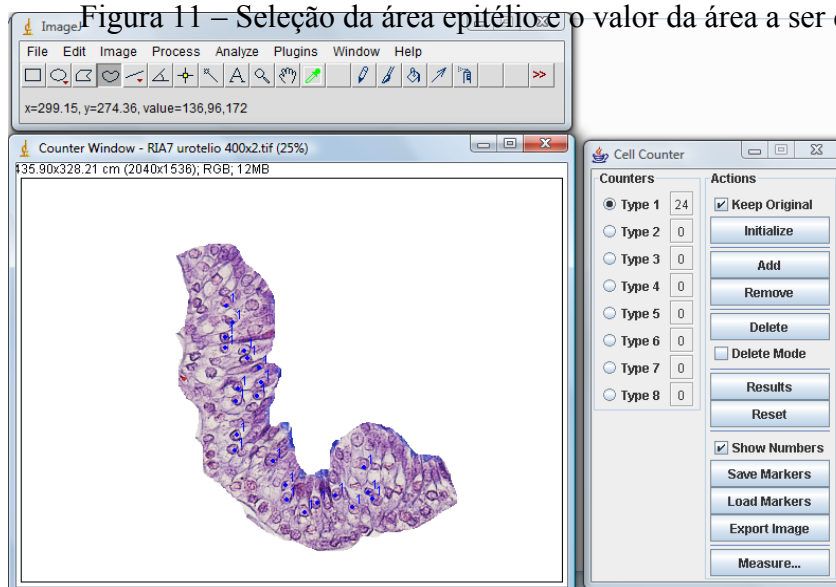


Figura 12 – Exclusão da área que não foi inclusa na seleção e quantificação dos núcleos uroteliais e utilizando a ferramenta "cell counter"

### 3.10 – Análise Estatística

Para cada variável morfométrica foram utilizados 25 campos por animal, os valores assim obtidos foram utilizados para determinar o valor



médio individual de cada animal, a partir dos quais foram calculadas as médias dos grupos.

A análise estatística foi feita através do software *Grafpad prism*, sendo realizado para comparação das médias, foi utilizado o teste estatístico one-way (ANOVA). Quando foram observadas diferenças significativas, foram feitas comparações pareadas e planejadas utilizando pós-teste de Bonferroni para múltiplas comparações. Sendo considerando o intervalo de confiança de 95% e a significância o  $P < 0,005$ .

#### **4. RESULTADOS**

##### **Corpo cavernoso.**

Os diferentes tratamentos afetaram significativamente o tecido conjuntivo. O aumento somente foi observado após 15 dias. Estes resultados foram apenas parcialmente atenuados pela arginina e glutamina.

Da mesma forma em relação às fibras do sistema elástico o aumento ocorreu também após 15 dias. Somente a arginina atenuou este aumento.

Em relação ao músculo liso o aumento ocorreu após 7 dias. Espontaneamente retornou aos valores normais 15 dias após a irradiação. Os efeitos tróficos desses aminoácidos fizeram ultrapassar os valores normais.

##### **Túnica albugínea do corpo esponjoso.**

A radiação promoveu um aumento das fibras do sistema elástico após 7 e 15 dias. Com 7 dias nem a arginina e nem a glutamina preveniram este efeito. Ambos os aminoácidos apresentaram efeitos protetores parciais com 15 dias.

##### **Densidade celular do epitélio.**

Como resultado da irradiação apenas após 15 dias ocorre aumento na densidade do epitélio. Arginina e glutamina parcialmente previnem esta diminuição.

**Altura do Epitélio.**

A radiação induz diminuição do epitélio somente após 15 dias.  
(Tabelas 1 e 2 e Figuras 13 a 18)

**Tabela 1** – Resultados numéricos das estruturas do pênis analisadas após 7 dias da irradiação

	<b>C</b>	<b>RAD7</b>	<b>RAD7 + A</b>	<b>RAD7 + G</b>
<b>Tecido conjuntivo - CC</b>	61,39 ± 6,01%	64,32 ± 3,62%	65,61 ± 2,85%	65,28 ± 9,85%
<b>Fibras do sistema elástico - CC</b>	18,31 ± 2,11%	19,31 ± 3,57%	18,61 ± 2,09%	19,65 ± 3,93%
<b>Músculo liso - CC</b>	10,56 ± 3,43%	13,37 ± 3,03%	15,47 ± 0,791%	15,27 ± 3,86%
<b>Fibras do sistema elástico - TACS</b>	29,281 ± 2,26%	44,43 ± 4,12%	42,91 ± 1,14%	41,16 ± 5,25%
<b>Densidade celular (Número de células /mm<sup>2</sup>)</b>	12714,63 ± 2455,74	11351,83 ± 565,30	12182,99 ± 2361,38	11241,60 ± 1031,11
<b>Altura do epitélio da uretra (µm)</b>	37,61 ± 3,42	33,79 ± 5,04	37,99 ± 12,64	39,44 ± 5,84

**Tabela 2** – Resultados numéricos das estruturas do pênis após 15 dias da irradiação

	<b>C</b>	<b>RAD15</b>	<b>RAD15 + A</b>	<b>RAD15 + G</b>
<b>Tecido conjuntivo - CC</b>	61,39 ± 6,01%	72,41 ± 3,38%	63,817 ± 2,06	67,40 ± 2,40%
<b>Fibras do sistema elástico - CC</b>	18,31 ± 2,11%	29,40 ± 2,36%	21,64 ± 2,34%	29,31 ± 2,94%
<b>Músculo liso - CC</b>	10,56 ± 3,43%	10,74 ± 3,56%	16,57 ± 1,96%	15,14 ± 1,40%
<b>Fibras do sistema elástico - TACS</b>	29,281 ± 2,26%	56,08 ± 4,74%	41,93 ± 10,22%	47,34 ± 1,39%
<b>Densidade celular (Número de células /mm<sup>2</sup>)</b>	12714,63 ± 2455,74	8916,08 ± 256,24	11113,08 ± 737,13	10553,58 ± 801,04
<b>Altura do epitélio da uretra (µm)</b>	37,61 ± 3,42	29,17 ± 3,78	48,14 ± 4,18	43,15 ± 3,80

Tecido conjuntivo - CC

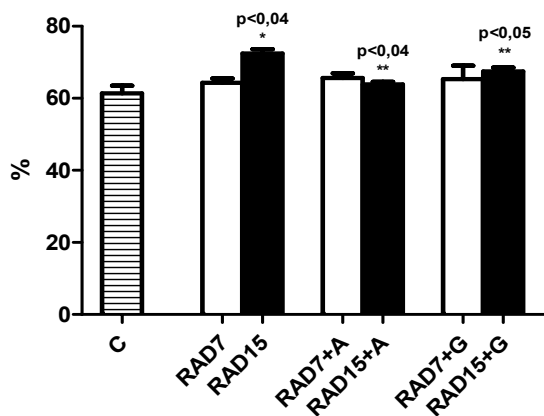


Figura 13 – Análise morfométrica do tecido conjuntivo no corpo cavernoso do pênis,  $P<0,05$  - barra tracejada – controle, barras brancas – resultado 7 dias após a irradiação, barras negras – resultado 15 dias após a irradiação, Os gráficos apresentam as médias e SD, Os dados foram analisados pelo método one-way ANOVA seguido pela comparação pareada através do pós-teste de Bonferroni, \* indicando diferença estatística ao grupo C, \*\* indicando diferença estatística aos animais somente irradiados,

Músculo liso - CC

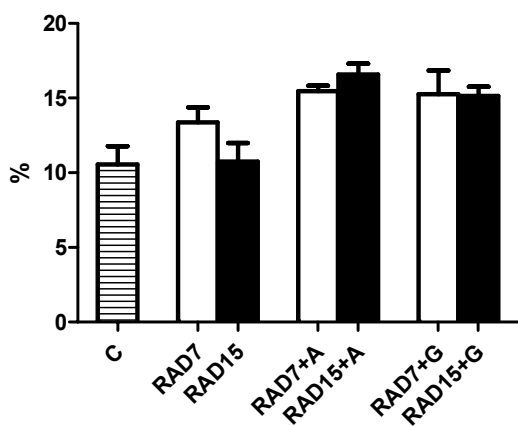


Figura 14 - Análise morfométrica do músculo liso no corpo cavernoso do pênis, - barra tracejada – controle, barras brancas – resultado 7 dias após a irradiação, barras negras – resultado 15 dias após a irradiação.

Fibras do sistema elástico - CC

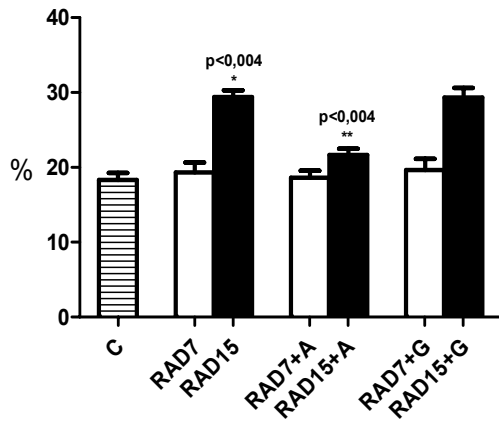


Figura 15 – Análise morfométrica das fibras do sistema elástico no corpo cavernoso do pênis,  $P<0,004$  - barra tracejada – controle, barras brancas - resultado 7 dias após a irradiação, barras negras – resultado 15 dias após a irradiação, Os gráficos apresentam as médias e SD, Os dados foram analisados pelo método one-way ANOVA seguido pela comparação pareada através do pós-teste de Bonferroni, \* indicando diferença estatística ao grupo C, \*\* indicando diferença estatística aos animais somente irradiados.

Fibras do sistema elástico - TACE

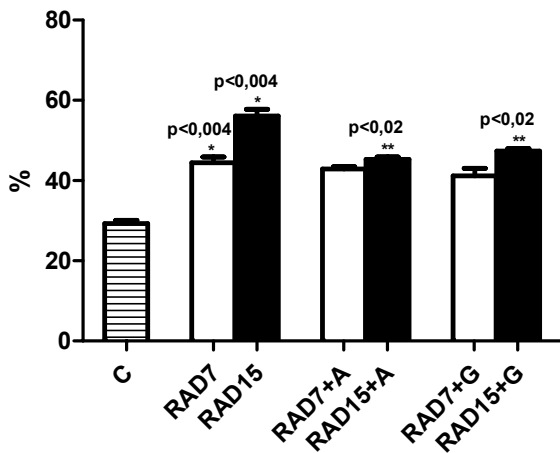


Figura 16 - Análise morfométrica das fibras do sistema elástico na túnica albugínea do corpo esponjoso,  $P<0,05$  - barra tracejada – controle, barras brancas – resultado 7 dias após a irradiação, barras negras – resultado 15 dias após a irradiação, Os gráficos apresentam as médias e SD, Os dados foram analisados pelo método one-way ANOVA seguido pela comparação pareada através do pós-teste de Bonferroni, \* indicando diferença estatística ao grupo C, \*\* indicando diferença estatística aos animais somente irradiados.

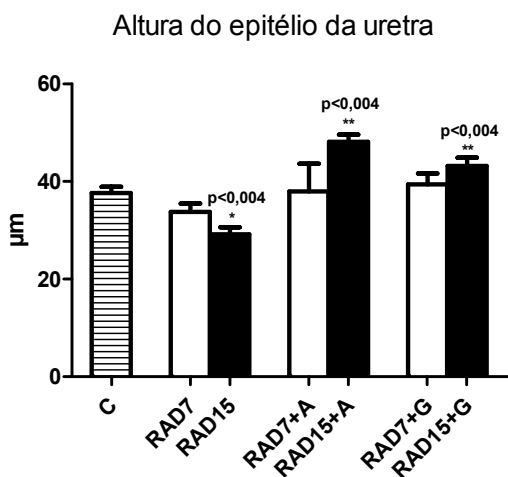


Figura 17 - Análise morfométrica da altura das células epiteliais da uretra. P<0,05 - barra tracejada – controle, barras brancas – resultado 7 dias após a irradiação, barras negras – resultado 15 dias após a irradiação, Os gráficos apresentam as médias e SD, Os dados foram analisados pelo método one-way ANOVA seguido pela comparação pareada através do pós-teste de Bonferroni, \* indicando diferença estatística ao grupo C, \*\* indicando diferença estatística aos animais somente irradiados.

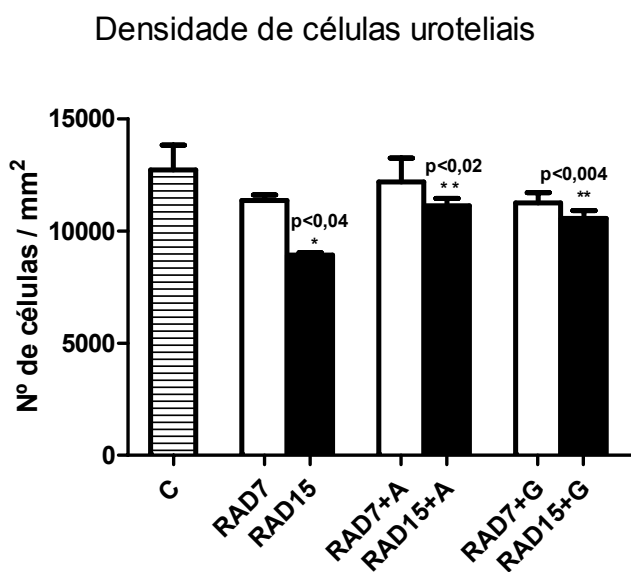


Figura 18 - Análise morfométrica da densidade de células uroteliais. P<0,05 -barra tracejada – controle, barras brancas – resultado 7 dias após a irradiação, barras negras – resultado 15 dias após a irradiação, Os gráficos apresentam as médias e SD, Os dados foram analisados pelo método one-way ANOVA seguido pela comparação pareada através do pós-teste de Bonferroni, \* indicando diferença estatística ao grupo C, \*\* indicando diferença estatística aos animais somente irradiados,

## 5 - DISCUSSÃO

As trabéculas dos corpos cavernosos são constituídas de células endoteliais, células musculares lisas, e uma densa matriz extracelular que contém principalmente proteínas fibrilares, tais como fibras colágenas e elásticas [22, 34, 35]. Esses componentes têm um papéis diferentes e importantes durante a ereção. Alterações em sua organização estrutural são consideradas um dos principais eventos fisiopatológicos subjacentes da disfunção erétil [36]. Relaxamento do músculo liso trabecular, por exemplo, é um dos eventos básicos para ocorrer à ereção fisiológica, juntamente com o aumento do fluxo sanguíneo e da pressão vascular nos espaços cavernosos [37].

A função de limitar a expansão dos sinusóides deve-se diretamente a ação das fibras colágenas não distensíveis, que constituem as trabéculas dos corpos cavernosos. Dessa forma, alterações, como as causadas pela irradiação pélvica, nas fibras de colágeno dos corpos cavernosos podem prejudicar a função de limitador da expansão das trabéculas, que por sua vez, comprometem o funcionamento normal da ereção durante a cópula.

Um modelo de radiação semelhante ao utilizado no presente estudo induziu alterações vasculares no pênis do rato. O tratamento destas alterações utilizando antioxidantes impediram as fortes lesões mediadas por radicais livres [38]. Isto foi demonstrado em diferentes estudos tanto in vivo [39] quanto em in vitro [40] que os radicais livres podem diretamente degradar fibras colágenas. Nossos resultados para os grupos RAD7 sugerem que ocorre um *turnover* importante das fibras de colágeno nas trabéculas após irradiação pélvica. Esta alteração no corpo cavernoso pode ser mediada, pelo menos em parte, pelos radicais livres. Nos grupos RAD15 encontramos modificações no tecido conjuntivo fibroso, sugerindo, em longo prazo, a formação de um tecido fibrótico.

O colágeno tipo I é a mais comum proteína no tecido conjuntivo, sendo encontrada em alguns órgãos em forma de feixes. As principais

funções do colágeno tipo I são: resistência a tensão, força e estiramento [41, 42]. No pênis do rato é encontrada em abundância nas trabéculas dos corpos cavernosos. Utilizando a técnica de imunofluorescência, podemos visualizar a localização dessa proteína de extrema importância para a fisiologia da ereção. Analisando qualitativamente nossas imagens, podemos supor que, o aumento do colágeno ocorrido nos grupo RAD15, deve-se ao suposto aumento do colágeno tipo I observado ao microscópico confocal. Ao que parecem os aminoácidos utilizados para suplementação (RAD15+A e RAD15+G), durante 22 dias de experimento foram eficazes contra os efeitos deletérios da irradiação.

As fibras reticulares são formadas predominantemente por colágeno do tipo III. São fibras extremamente finas, com função de sustentação em diferentes órgãos. Em um trabalho anterior desenvolvido na unidade pesquisa urogenital (UERJ), através impregnação por prata, foi observado que no pênis de rato, as fibras de colágeno do tipo III, são encontradas predominantemente na região subendotelial dos corpos cavernosos. Nossos resultados corroboram os achados de Pinheiro *et.al* (2000)[22]. Ao analisar forma qualitativa o colágeno do tipo III, pela técnica de imunofluorescência, verificou-se que não houve diferença entre os grupos, o que permite supor que o aumento do colágeno encontrado no RAD15 foi possivelmente causado pelo aumento do colágeno do tipo I.

Morfologicamente distintas, redes de fibras elásticas estão presentes na matriz extracelular. Virtualmente estão em todos os órgãos sendo particularmente numerosas em tecidos que são submetidos periodicamente ao stress [43]. O sistema de fibras elásticas tem papel importante na estrutura e função de órgãos que requerem elasticidade [44, 45]. O pênis é um desses órgãos, que apresenta modificações periódicas, segundo o estado de ereção ou detumescência. Estas fibras são importantes para este mecanismo. Estudos em ratos mostram que essas fibras estão em



pequenas quantidades nos corpos cavernosos, mas são abundantes na túnica albugínea que envolve o corpo esponjoso. Diversos trabalhos mostram que modificações conspícuas, na quantidade ou no arranjo, das fibras do sistema elástico podem contribuir para a disfunção erétil [46, 47]. Ao analisar as estas fibras através de método morfométrico, observamos aumento das fibras elásticas no grupo RAD15, e que a suplementação com o aminoácido L-arginina mostrou proteger essa estrutura contra os efeitos deletérios da irradiação. A L-glutamina parece ter efeito mais lento ou de menor relevância, quando comparamos com a L-arginina, na proteção das fibras do sistema elástico. A grande quantidade de elastina que compõem as fibras elásticas, são as responsáveis pela grande capacidade elástica dessas fibras e são encontradas em maior quantidade em tecidos submetidos à constante distensão [48, 49]. Através da técnica de imunofluorescência, podemos identificar que nas trabéculas dos corpos cavernosos essas fibras encontram-se em pequena quantidade, pois essas trabéculas tem função de conferir resistência. O que é função das fibras oxitalânicas, que conferem maior resistência que a elastina, como demonstrado por Cotta-Pereira e Fullmer [48, 49].

Diversos estudos demonstram evidências experimentais, indicando que o tratamento com certos aminoácidos, pode ter efeito protetor contra lesões causadas por irradiação induzida [13, 15, 20, 33].

Estudos utilizando o mesmo protocolo de irradiação como o descrito anteriormente, mostrou que a suplementação nutricional com L-glutamina e L-arginina protegem diversos tecidos contra lesões intestinais em ratos [15, 20, 33].

As células de replicação rápida, como por exemplo células epiteliais são frequentemente afetadas pela irradiação causando alterações na funcionalidade do órgão ou até mesmo limitando o tratamento radioterápico anti-neoplásico devido aos seus efeitos colaterais. No tecido

intestinal, por exemplo acarretam enterite actínica, náuseas, enjôo, dor abdominal e diarréia [50].

Em nosso trabalho podemos observar que os efeitos da irradiação nas células epiteliais da uretra, são vistos tanto na diminuição da altura das células como na densidade celular. Relatos de alterações causadas pela radiação em mucosas urinárias, como a bexiga, são descritas com freqüências. Eles são considerados importantes fatores de qualidade de vida de pacientes submetidos à irradiação pélvica [4]. Os efeitos protetores desses aminoácidos, já foram descritos anteriormente por diversos autores [13, 15, 16, 20, 33, 51]. Os efeitos de curto prazo de proteção sobre o epitélio intestinal podem ser atribuídos ao efeito tópico da L-glutamina e L-arginina, que estimula a proliferação destas células [52]. O mesmo efeito pode ter ocorrido através de um efeito sistêmico e trófico nas células epiteliais da uretra onde foi encontrado um aumento na densidade celular, tendo como consequência o aumento altura do epitélio.

Apesar de seus efeitos benéficos sobre a parede intestinal, L-glutamina e L-arginina não impediram os efeitos negativos da irradiação sobre o músculo liso do corpo cavernoso. A musculatura lisa nos grupos com RAD7 sofreram alterações morfométricas, tendo sua densidade de área aumentada. O efeito foi revertido espontaneamente no grupo RAD15, os aminoácidos obtiveram uma resposta diferenciada nos diferentes períodos analisados. Nos grupos com 15 dias de irradiação ocorreu um possível efeito trófico nas células musculares, esse efeito diferencial da L-glutamina e L-arginina podem ser atribuídos à heterogeneidade metabólica entre as células musculares lisas, que são conhecidos por ter diferentes respostas proliferativas e reagirem diferentemente a drogas de acordo com seu tecido de origem [53].

## **6 - CONCLUSÃO**

Os efeitos adversos nas estruturas penianas tendem a ser mais pronunciadas 15 dias após a irradiação quando comparados com os efeitos observados após 7 dias da irradiação.

A L-arginina e a L-glutamina previnem as mudanças advindas da irradiação nas estruturas penianas. No entanto, a L-arginina parece ser mais efetiva.

## 7 – REFERÊNCIAS

1. Regimbeau JM, Panis Y, Gouzi JL and Fagniez PL: Operative and long term results after surgery for chronic radiation enteritis. *Am J Surg.* 2001; 182: 237-42.
2. Troiano M, Corsa P, Raguso A, Cossa S, Piombino M, Guglielmi G and Parisi S: Radiation therapy in urinary cancer: state of the art and perspective. *Radiol Med.* 2009; 114: 70-82.
3. Mendenhall WM, Henderson RH, Indelicato DJ, Keole SR and Mendenhall NP: Erectile dysfunction after radiotherapy for prostate cancer. *Am J Clin Oncol.* 2009; 32: 443-7.
4. Peters CA, Stock RG, Cesaretti JA, Atencio DP, Peters S, Burri RJ, Stone NN, Ostrer H and Rosenstein BS: TGFB1 single nucleotide polymorphisms are associated with adverse quality of life in prostate cancer patients treated with radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2008; 70: 752-9.
5. Pinkawa M, Gagel B, Piroth MD, Fishedick K, Asadpour B, Kehl M, Klotz J and Eble MJ: Erectile Dysfunction After External Beam Radiotherapy for Prostate Cancer. *Eur Urol.* 2008;
6. Klein EA, Ciezki J, Kupelian PA and Mahadevan A: Outcomes for intermediate risk prostate cancer: are there advantages for surgery, external radiation, or brachytherapy? *Urol Oncol.* 2009; 27: 67-71.
7. van der Wielen GJ, Mulhall JP and Incrocci L: Erectile dysfunction after radiotherapy for prostate cancer and radiation dose to the penile structures: a critical review. *Radiother Oncol.* 2007; 84: 107-13.
8. Merlin SL, Brock GB, Begin LR, Hiou Tim FF, Macramalla AN, Seyam RM, Shenouda G and Dion SB: New insights into the role of endothelin-1 in radiation-associated impotence. *Int J Impot Res.* 2001; 13: 104-9.

9. Wernicke AG, Valicenti R, Dieva K, Houser C and Pequignot E: Radiation dose delivered to the proximal penis as a predictor of the risk of erectile dysfunction after three-dimensional conformal radiotherapy for localized prostate cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2004; 60: 1357-63.
10. Wu G: Amino acids: metabolism, functions, and nutrition. *Amino Acids.* 2009; 37: 1-17.
11. Wu G, Bazer FW, Davis TA, Kim SW, Li P, Marc Rhoads J, Carey Satterfield M, Smith SB, Spencer TE and Yin Y: Arginine metabolism and nutrition in growth, health and disease. *Amino Acids.* 2008;
12. Wang WW, Qiao SY and Li DF: Amino acids and gut function. *Amino Acids.* 2008;
13. Huang CC, Lin TJ, Lu YF, Chen CC, Huang CY and Lin WT: Protective effects of L-arginine supplementation against exhaustive exercise-induced oxidative stress in young rat tissues. *Chin J Physiol.* 2009; 52: 306-15.
14. Loehe F, Bruns CJ, Nitsch SM and Angele MK: The role of L-arginine following trauma and blood loss. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2007; 10: 80-7.
15. Ersin S, Tuncyurek P, Esassolak M, Alkanat M, Buke C, Yilmaz M, Telefoncu A and 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.
16. Debats IB, Wolfs TG, Gotoh T, Cleutjens JP, Peutz-Kootstra CJ and van der Hulst RR: Role of arginine in superficial wound healing in man. *Nitric Oxide.* 2009; 21: 175-83.
17. Pithon-Curi TC, De Melo MP and Curi R: Glucose and glutamine utilization by rat lymphocytes, monocytes and neutrophils in culture: a comparative study. *Cell Biochem Funct.* 2004; 22: 321-6.

18. Curi R, Lagranha CJ, Doi SQ, Sellitti DF, Procopio J and Pithon-Curi TC: Glutamine-dependent changes in gene expression and protein activity. *Cell Biochem Funct.* 2005; 23: 77-84.
19. Roth E: Immune and cell modulation by amino acids. *Clin Nutr.* 2007; 26: 535-44.
20. Diestel CF, Marques RG, Lopes-Paulo F, Paiva D, Horst NL, Caetano CE and Portela MC: Role of L-glutamine and glycine supplementation on irradiated colonic wall. *Int J Colorectal Dis.* 2007; 22: 1523-9.
21. Quinlan DM, Nelson RJ, Partin AW, Mostwin JL and Walsh PC: The rat as a model for the study of penile erection. *J Urol.* 1989; 141: 656-61.
22. Pinheiro AC, Costa WS, Cardoso LE and Sampaio FJ: Organization and relative content of smooth muscle cells, collagen and elastic fibers in the corpus cavernosum of rat penis. *J Urol.* 2000; 164: 1802-6.
23. Ross MH, Pawlina, W.: *Histologia - texto e atlas.* 5. ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan. 2008;
24. Gartner LP, Hiatt, J.L.: *Tratado de histologia em cores.* 3. ed. Rio de Janeiro, Elsevier. 2007;
25. Ushiki T: Collagen fibers, reticular fibers and elastic fibers. A comprehensive understanding from a morphological viewpoint. *Arch Histol Cytol.* 2002; 65: 109-26.
26. van der Rest M and Garrone R: Collagen family of proteins. *FASEB J.* 1991; 5: 2814-23.
27. Heino J: The collagen family members as cell adhesion proteins. *Bioessays.* 2007; 29: 1001-10.
28. Junqueira LC, Carneiro, J.: *Histologia Básica.* 10. ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan. 2004; 540p.

29. Kielty CM, Sherratt MJ and Shuttleworth CA: Elastic fibres. *J Cell Sci.* 2002; 115: 2817-28.
30. Cotta-Pereira G and Iruela-Arispe ML: Extracellular matrix: functional significance of oxytalan, elaunin and elastic fibers. *Prog Clin Biol Res.* 1989; 295: 101-7.
31. Kielty CM: Elastic fibres in health and disease. *Expert Rev Mol Med.* 2006; 8: 1-23.
32. Moura JR, Sass N, Guimaraes SB, Vasconcelos PR, Mattar R and Kulay L, Jr.: Effects of L-arginine oral supplements in pregnant spontaneously hypertensive rats. *Acta Cir Bras.* 2006; 21: 192-6.
33. Hwang JM, Chan DC, Chang TM, Tsao TY, Tsou SS, Lu RH and Tsai LM: Effects of oral arginine and glutamine on radiation-induced injury in the rat. *J Surg Res.* 2003; 109: 149-54.
34. Bastos AL, Costa WS, Cardoso LE and Sampaio FJ: Collagen and elastic fibers in the penis of human fetuses at 28 weeks postconception. *Eur Urol.* 1999; 36: 158-63.
35. Bastos AL, Sampaio FJ and Cardoso LE: Compositional changes of collagen and glycosaminoglycans in the tunica albuginea and corpus cavernosum from the human penis during the fetal and postnatal periods. *J Urol.* 2005; 173: 1039-43.
36. Moreland RB: Pathophysiology of erectile dysfunction: the contributions of trabecular structure to function and the role of functional antagonism. *Int J Impot Res.* 2000; 12 Suppl 4: S39-46.
37. Kelly DA: Penises as variable-volume hydrostatic skeletons. *Ann N Y Acad Sci.* 2007; 1101: 453-63.

38. Sener G, Atasoy BM, Ersoy Y, Arbak S, Sengoz M and Yegen BC: Melatonin protects against ionizing radiation-induced oxidative damage in corpus cavernosum and urinary bladder in rats. *J Pineal Res.* 2004; 37: 241-6.
39. Trenam CW, Dabbagh AJ, Morris CJ and Blake DR: Skin inflammation induced by reactive oxygen species (ROS): an in-vivo model. *Br J Dermatol.* 1991; 125: 325-9.
40. Arisawa S, Arisawa T, Ohashi M, Nitta Y, Ikeya T and Asai J: Effect of the hydroxyl radical on fibroblast-mediated collagen remodelling in vitro. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 1996; 23: 222-8.
41. Salsas-Escat R, Nerenberg PS and Stultz CM: Cleavage site specificity and conformational selection in type I collagen degradation. *Biochemistry.* 49: 4147-58.
42. Salsas-Escat R and Stultz CM: Conformational selection and collagenolysis in type III collagen. *Proteins.* 78: 325-35.
43. Mithieux SM and Weiss AS: Elastin. *Adv Protein Chem.* 2005; 70: 437-61.
44. McLaughlin PJ, Chen Q, Horiguchi M, Starcher BC, Stanton JB, Broekelmann TJ, Marmorstein AD, McKay B, Mecham R, Nakamura T and Marmorstein LY: Targeted disruption of fibulin-4 abolishes elastogenesis and causes perinatal lethality in mice. *Mol Cell Biol.* 2006; 26: 1700-9.
45. Clarke AW, Arnspang EC, Mithieux SM, Korkmaz E, Braet F and Weiss AS: Tropoelastin massively associates during coacervation to form quantized protein spheres. *Biochemistry.* 2006; 45: 9989-96.
46. Costa WS, Felix B, Cavalcanti AG, Medeiros J, Jr. and Sampaio FJ: Structural analysis of the corpora cavernosa in patients with ischaemic priapism. *BJU Int.* 105: 838-41; discussion 41.



47. Costa WS, Carrerete FB, Horta WG and Sampaio FJ: Comparative analysis of the penis corpora cavernosa in controls and patients with erectile dysfunction. *BJU Int.* 2006; 97: 567-9.
48. Cotta-Pereira G, Guerra Rodrigo F and Bittencourt-Sampaio S: Oxytalan, elaunin, and elastic fibers in the human skin. *J Invest Dermatol.* 1976; 66: 143-8.
49. Fullmer HM and Lillie RD: The oxytalan fiber: a previously undescribed connective tissue fiber. *J Histochem Cytochem.* 1958; 6: 425-30.
50. Hauer-Jensen M, Wang J and Denham JW: Bowel injury: current and evolving management strategies. *Semin Radiat Oncol.* 2003; 13: 357-71.
51. Erbil Y, Oztezcan S, Giris M, Barbaros U, Olgac V, Bilge H, Kucucuk H and Toker G: The effect of glutamine on radiation-induced organ damage. *Life Sci.* 2005; 78: 376-82.
52. Klimberg VS, Salloum RM, Kasper M, Plumley DA, Dolson DJ, Hautamaki RD, Mendenhall WR, Bova FC, Bland KI, Copeland EM, 3rd and et al.: Oral glutamine accelerates healing of the small intestine and improves outcome after whole abdominal radiation. *Arch Surg.* 1990; 125: 1040-5.
53. Rodat-Despoix L, Crevel H, Marthan R, Savineau JP and Guibert C: Heterogeneity in 5-HT-induced contractile and proliferative responses in rat pulmonary arterial bed. *J Vasc Res.* 2008; 45: 181-92.

# 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](#)