



Universidade do Estado do Rio de Janeiro
Centro Biomédico
Faculdade de Ciências Médicas

Jorge Luiz Medeiros Júnior

**Efeito protetor da L-arginina e L-glutamina no pênis de ratos submetidos à
irradiação pélvica**

Rio de Janeiro
2010

Jorge Luiz Medeiros Júnior

**Efeito protetor da L-arginina e L-glutamina no pênis de ratos submetidos à
irradiação pélvica**

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-graduação em Fisiopatologia e Ciências Cirúrgicas, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: Sistema urogenital.

Orientador: Prof. Dr. Waldemar Silva Costa

Coorientador: Prof. Dr. Luiz Eduardo Macedo Cardoso

Rio de Janeiro
2010

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

M488 Medeiros Júnior, Jorge Luiz.
Efeito protetor da L-arginina e L-glutamina no pênis de rato submetidos à irradiação pélvica / Jorge Luiz Medeiros Júnior. 2010. 79 f.

Orientador: Waldemar Silva Costa.
Coorientador: Luiz Eduardo Macedo Cardoso.
Dissertação (Mestrado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Faculdade de Ciências Médicas. Pós-graduação em Fisiopatologia e Ciências Cirúrgicas.

1. Pênis - Teses. 2. Pênis – Efeitos de radiação. 3. Radiação – Teses. 4. glutamina - uso terapêutico. 5. Arginina – uso terapêutico. 6. Efeitos de radiação. 7. Ratos Wistar. I. Costa, Waldemar Silva. II. Cardoso, Luiz Eduardo Macedo. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

CDU 616.665

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

Assinatura

Data

Jorge Luiz Medeiros Júnior

**Efeito protetor da L-arginina e L-glutamina no pênis de ratos submetidos à
irradiação pélvica**

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-graduação em Fisiopatologia e Ciências Cirúrgicas, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: Sistema urogenital.

Aprovado em 28 de julho de 2010

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Waldemar Silva Costa (Orientador)
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Prof. Dr. Luiz Eduardo Macedo Cardoso
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Prof. Dr. André Guilherme Lagreca da Costa Cavalcanti
Hospital Souza Aguiar - HSA

Prof. Dr. Diogo Benchimol de Souza
Instituto de Biofísica - UFRJ

Rio de Janeiro

2010

RESUMO

MEDEIROS JÚNIOR, Jorge Luiz. *Efeito protetor da L-arginina e L-glutamina no pênis de rato submetidos à irradiação pélvica*. 2010. 79 f. Dissertação (Mestrado) em Fisiopatologia e Ciências Cirúrgicas) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2010.

Os aminoácidos L-arginina e L-glutamina foram analisados como protetores dos tecidos erétil do pênis contra os danos induzidos pela radiação. Grupos de ratos Wistar foram tratadas com: nenhuma intervenção, radiação pélvica e sacrifício 7 (RAD7) ou 15 (RAD15) dias; e radiação pélvica, a suplementação diária com L-arginina (A) ou L-glutamina (G), e sacrifício 7 (RAD7 + A, RAD7 + G) ou 15 (RAD15 + A, RAD15 + G) dias após irradiação. Componentes estruturais do corpo cavernoso (CC), túnica albugínea do corpo esponjoso (TAC), e urotélio do pênis foram analisados através de métodos estereológicos e imuno-histoquímico. Os resultados mostraram que, no CC, o tecido conjuntivo foi maior nos RAD15 ($p < 0,04$), mas essa mudança foi parcialmente revertido em RAD15 + G ($p < 0,05$) e RAD15 + A ($p < 0,04$). A matriz fibrosa das trabéculas CC estava manchada de colágeno tipo I. Nos RAD15, a intensidade da marcação foi aumentada, enquanto que em RAD15 + G + A e RAD15 a coloração era semelhante à dos controles. Nenhuma alteração de coloração foram observadas nos grupos que foram sacrificados sete dias após a radiação. Caverosa teor de fibras elásticas na RAD15 foi aumentada ($p < 0,004$), e este foi impedido de RAD15 + A ($p < 0,004$), mas não em RAD15 + G. No TAC, os aminoácidos protegidos ($p < 0,02$) contra o aumento da radiação induzida em fibras elásticas, mas apenas em RAD15. Densidade das células do urotélio e espessura urothelial, foram reduzidos em RAD15 ($p < 0,004$), mas houve efeitos protetores dos dois aminoácidos. Em conclusão, a radiação induzida por alterações nas estruturas penianas tendem a ser mais pronunciado 15 dias após a sessão de radiação. Tanto A e G têm efeitos protetores contra estas alterações, sendo o primeiro um pouco mais eficaz.

Palavras-chave: Radiação. Pênis. L-arginina. L-glutamina.

ABSTRACT

We investigated whether arginine and glutamine protect penile tissues against radiation-induced damage. Groups of Wistar rats were treated with: no intervention; pelvic radiation, and sacrifice 7 (RAD7) or 15 (RAD15) days later; and pelvic radiation, daily supplementation with L-arginine (A) or L-glutamine (G), and sacrifice 7 (RAD7+A, RAD7+G) or 15 (RAD15+A, RAD15+G) days after radiation. Structural components in the corpus cavernosum (CC), tunica albuginea of the corpus spongiosum (TACS), and urothelium of the penis were analyzed using stereological and immunohistochemical methods. The results showed that in the CC, connective tissue was increased in RAD15 ($p < 0.04$), but this change was partially prevented in RAD15+G ($p < 0.05$) and RAD15+A ($p < 0.04$). The fibrous matrix of the CC trabeculae was stained for collagen type I. In RAD15, the intensity of the labeling was increased, whereas in RAD15+G and RAD15+A the staining was similar to that of the controls. No staining changes were seen in the groups that were sacrificed seven days after radiation. Caverosal elastic fiber content in RAD15 was increased ($p < 0.004$), and this was prevented in RAD15+A ($p < 0.004$), but not in RAD15+G. In TACS, the aminoacids protected ($p < 0.02$) against radiation-induced increase in elastic fiber content, but only in RAD15. Cell density in the urothelium, and urothelial thickness, were reduced in RAD15 ($p < 0.004$), but there were protective effects of both aminoacids. In conclusion, radiation-induced alterations in penile structures tend to be more pronounced 15 days after radiation session. Both A and G have protective effects against these changes, with the former being slightly more effective.

Keywords: Radiation. Penis. L-arginine. L-glutamine.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Pênis de rato, vista lateral	13
Figura 2 - Pênis de rato, corte transversal –H&E - 40x.....	14
Figura 3 - Pênis do rato – corpo cavernoso. (a) músculo liso (b) sinusóides e (c) trabéculas – Imunohistoquímica - α -actina de músculo liso - 200x.....	14
Figura 4 - Posicionamento dos animais	19
Figura 5 - Seleção dos campos a serem irradiados	19
Figura 6 - Suplementação utilizando sonda metálica orogástrica	20
Figura 7 - Pênis de rato, com o terço médio selecionado	21
Figura 8 - Quantificação de músculo liso utilizando a grade 100 pontos gerada a partir do software <i>Image J</i> e utilizando a ferramenta “ <i>cell counter</i>	24
Figura 9 - Utilização do software <i>image J</i> para morfometria do epitélio da uretrainício da aferição da altura do epitélio utilizando a ferramenta <i>straight line selection</i> – Tricrômico de Masson – 200x	25
Figura 10 - Término da aferição após 20 medidas em torno da fotomicrografia da uretra – Tricrômico de Masson – 200x	26
Figura 11 - Seleção da área epitélio e o valor da área a ser quantificada.....	27
Figura 12 -Exclusão da área que não foi inclusa na seleção e quantificação dos núcleos uroteliais e utilizando a ferramenta <i>cell counte</i>	27
Tabela 1 – Resulta dos numéricos das estruturas do pênis analisadas após 7 dias da irradiação	30
Tabela 2 - Resultados numéricos das estruturas do pênis após 15 dias da irradiação	30
Figura 13 - Análise morfométrica do tecido conjuntivo no corpo cavernoso do pênis.....	31
Figura 14 - Análise morfométrica do músculo liso no corpo cavernoso do pênis	31
Figura 15 – Análise morfométrica das fibras do sistema elástico no corpo cavernoso do pênis.....	32
Figura 16 - Análise morfométrica das fibras do sistema elástico na túnica albugínea do corpo esponjoso	32
Figura 17 - Análise morfométrica da altura das células epiteliais da uretra.....	33

Figura 18 - Análise morfométrica da densidade de células uroteliais	33
Figura. 19 - Fibras de colágeno tipo I no corpo cavernoso	34
Figura 20 - Fibrilas de colágeno tipo III (Setas Brancas) no corpo cavernoso	35
Figura 21 - Fibras musculares lisas no corpo cavernoso	36
Figura 22 - Fibras do sistema elástico na túnica albugínea do corpo esponjoso	37

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Av	Densidade de área
BSA	Albumina Sérica Bovina
C	Grupo controle.
DAB	3,3, diamino-benzidina tetrahydrocloridro
Gy	Gray
MeV	Mega eletron volts
RAD7	Grupo Irradiado e morto após 7 dias de irradiação.
RAD7+A	Grupo Irradiado, suplementado com o aminoácido L-arginina e mortos após 7 dias de irradiação
RAD7+G	Grupo Irradiado, suplementado com o aminoácido L-glutamina e mortos após 7 dias de irradiação
RAD15	Grupo Irradiado e morto após 15 dias de irradiação.
RAD15+A	Grupo Irradiado, suplementado com o aminoácido L-arginina e mortos após 15 dias de irradiação.
RAD15+G	Grupo Irradiado, suplementado com o aminoácido L- glutamina e morto após 15 dias de irradiação
RAI	Impotência associada a radiação
TACE	Túnica albugínea do corpo esponjoso
UERJ	Universidade do estado do Rio de Janeiro

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	11
1	MATERIAIS E MÉTODOS	17
1.1	Animais	17
1.2	Delineamento experimental	17
1.3	Método de irradiação	18
1.4	Suplementação dos animais	20
1.4.1	<u>L-arginina</u>	20
1.4.2	<u>L-glutamina</u>	20
1.5	Morte dos animais	20
1.6	Análise estrutural	21
1.6.1	<u>Procedimentos histológicos</u>	21
1.6.2	<u>Imunohistoquímica</u>	22
1.6.3	<u>Imunofluorescência</u>	23
1.7	Aquisição das imagens	23
1.8	Morfometria	23
1.8.1	<u>Planimetria por contagem de pontos</u>	23
1.8.1.1	Corpo cavernoso.....	23
1.8.1.2	Corpo esponjoso.....	24
1.8.2	<u>Altura do epitélio da uretra</u>	25
1.8.3	<u>Densidade celular do urotélio</u>	26
1.9	Análise estatística	28
2	RESULTADOS	29
3	DISCUSSÃO	38
4	CONCLUSÃO	41
	REFERÊNCIAS	42
	APENDICE – Protective effects of nutritional supplementation with l-arginine and l-glutamine on the pênis of rats submitted to pelvic radiation.....	49

ANEXO A – Carta da Comissão de Ética para o Cuidado e Uso de Animais Experimentais do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes da UERJ (CEA)	78
ANEXO B – Submissão do artigo científico.....	79

INTRODUÇÃO

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 disfunção urinária, erétil e sangramento retal [1, 4, 5].

A perda da função sexual em homens que sofreram irradiação pélvica é uma das sequelas comuns decorrentes 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 foram descritos resultados quantitativos em relação as essas modificações.

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].

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].

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)

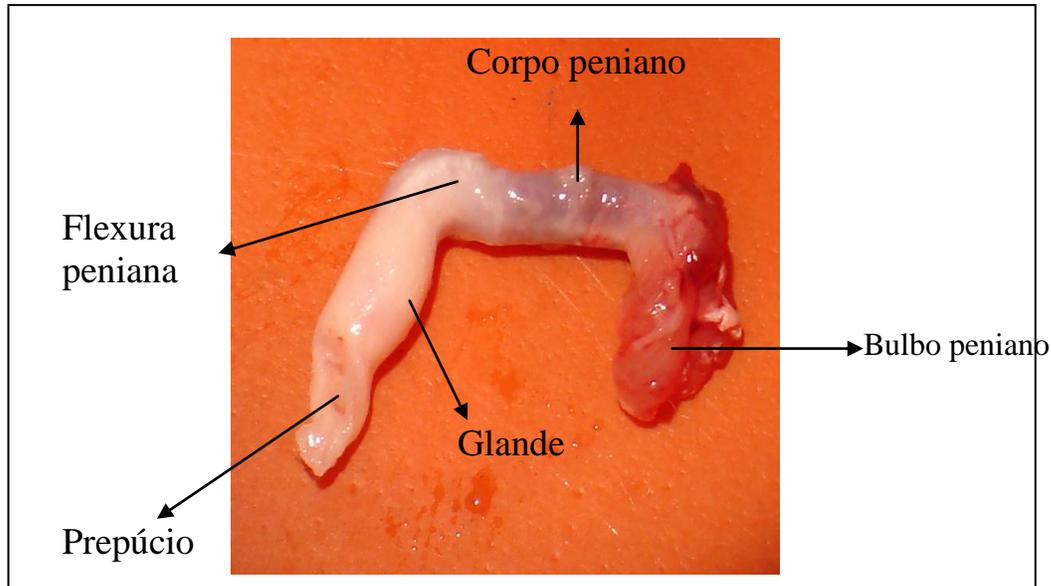


Figura 1 – Pênis de rato, vista lateral.

Os corpos cavernosos são formados por uma camada de células musculares lisas localizadas na região subendotelial que circunda os espaços vasculares (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 os 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].



Figura 2 – Pênis de rato, corte transversal –H&E - 40x

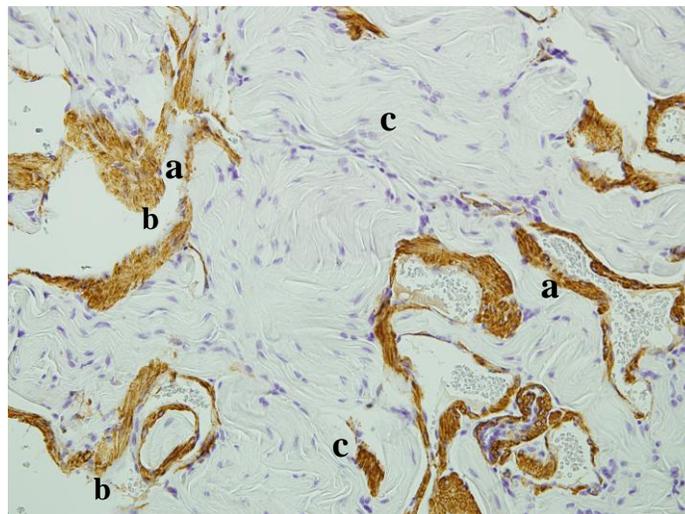


Figura 3 - Pênis do rato – corpo cavernoso. (a) músculo liso (b) sinusóides e (c) trabéculas – Imunohistoquímica - α -actina de músculo liso - 200x

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].

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 α -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 μm 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].

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, retomando a 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 elásticas: com pouca elastina e grande número de microfibrilas organizadas em feixes;

3- Fibras oxitalânicas: compostas somente por microfibrilas [30].

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 20 μ m nas paredes de pequenos vasos sanguíneos a cerca de 200 μ m. 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].

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.

1 MATERIAIS E MÉTODOS

1.1 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 na Unidade de Pesquisa Urogenital (UERJ). Os animais foram mantidos em condições ambientais controladas de temperatura (23 ± 2°C) e ciclo claro-escuro (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), em 25 de março de 2008, sob o n°CEA/224/2008.

1.2 Delineamento 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 7dias (RAD7+A)** - Os animais foram irradiados 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 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.

1.3 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, durante 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 no acelerador linear.



Figura 5 – Seleção dos campos a serem irradiados.

1.4 Suplementação dos animais

1.4.1 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 orogástrica utilizando-se sonda metálica [32, 33].

1.4.2 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 orogástrica.

1.5 Morte dos animais

Os animais foram mortos no 15° e 25° dias de experimento conforme descrito anteriormente. Os ratos foram mortos por sobredose de tiopental sódico (Cristália, São Paulo, Brasil).

1.6 Análise estrutural

1.6.1 Procedimentos histológicos

Para a análise histológica foi utilizado cortes transversais no 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 um período mínimo de 24 horas.

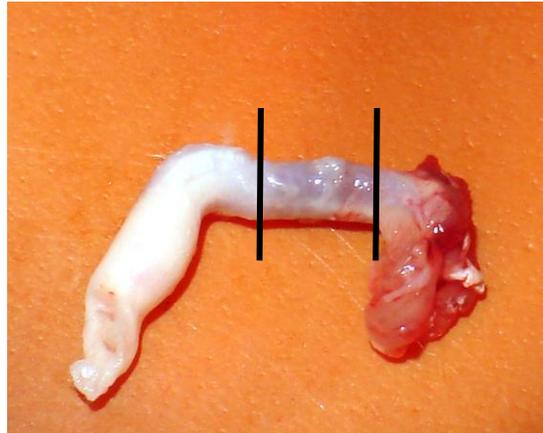


Figura 7 – Pênis de rato, com o terço médio selecionado

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 μ 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.

1.6.2 Imunohistoquímica

Foi realizada a técnica de Avidina Biotina para a identificação das células musculares lisas, utilizando anticorpo monoclonal anti-mouse anti- α 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 tetrahydrocloridro (DAB) (Zymed Laboratórios, número do catálogo 002014 Carlsbad, CA, E.U.A.) a 0,1% em H₂O₂, lavados em água destilada, desidratados em uma serie crescente de etanol, diafanizados em xilol e montados com Enthelan.

1.6.3 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 % por 15 minutos, 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 .

1.7 **Aquisição das imagens**

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).

1.8 Morfometria

1.8.1 Planimetria por contagem de pontos

1.8.1.1 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 .

O software ImageJ (versão 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 98 pontos. A grade foi sobreposta as fotomicrografias digitais dos tecidos eréteis do corpo cavernoso. A densidade de superfície do músculo liso, tecido conjuntivo, e fibras do sistema elástico foram determinadas pela contagem de pontos e expressa por porcentagem do espaço de referência (Figura 8).

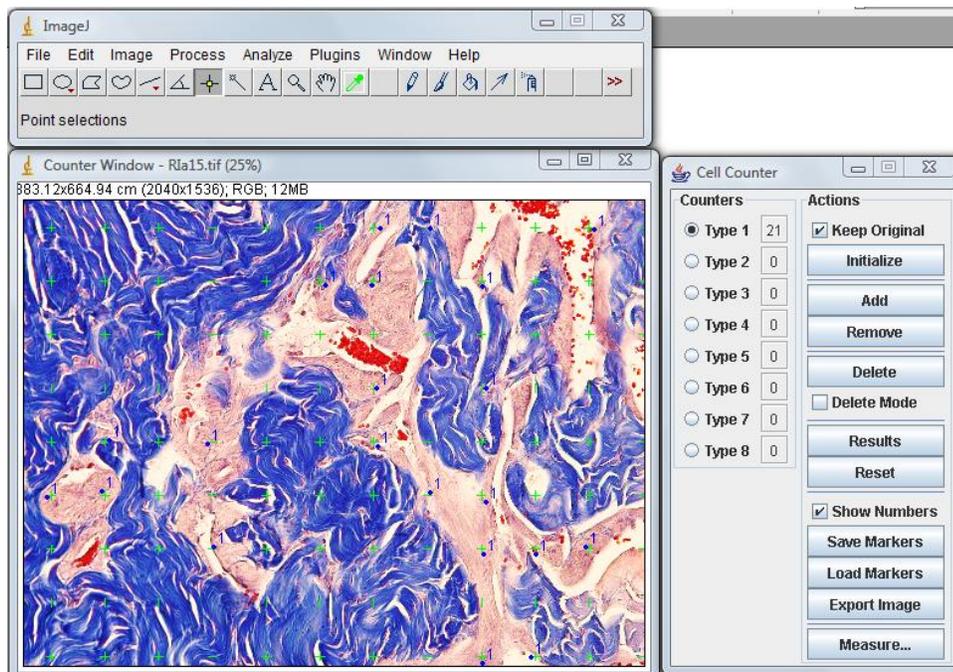


Figura 8 - Quantificação de músculo liso utilizando a grade 100 pontos gerada a partir do software *Image J* e utilizando a ferramenta *cell counter*

1.8.1.2 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 morfométrico utilizando a grade de 100 pontos de maneira similar à quantificação dos corpos cavernosos.

1.8.2 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).

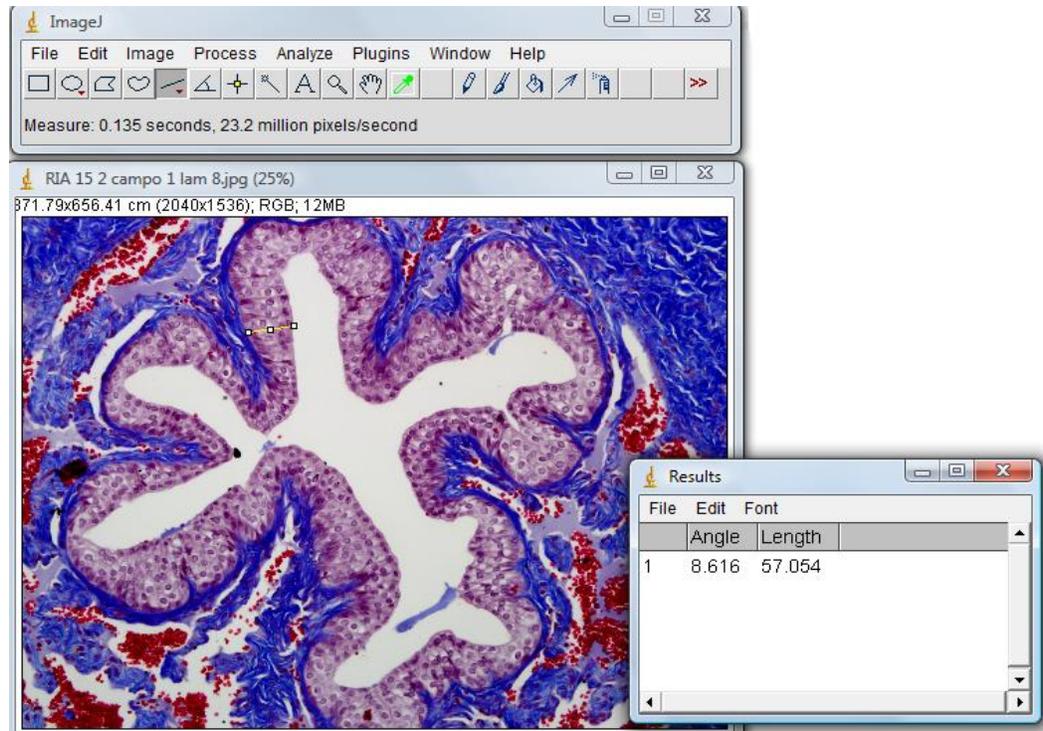


Figura 9 – Utilização do software *image J* para morfometria do epitélio da uretra, início da aferição da altura do epitélio utilizando a ferramenta “*straight line selection*” – Tricrômico de Masson – 200x

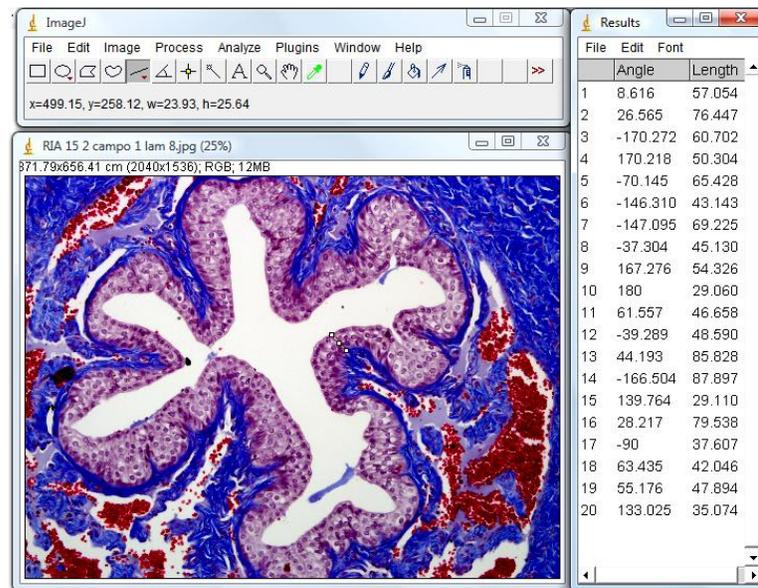


Figura 10 – Término da aferição após 20 medidas em torno da fotomicrografia da uretra – Tricrômico de Masson – 200x

1.8.3 Densidade celular do urotélio

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

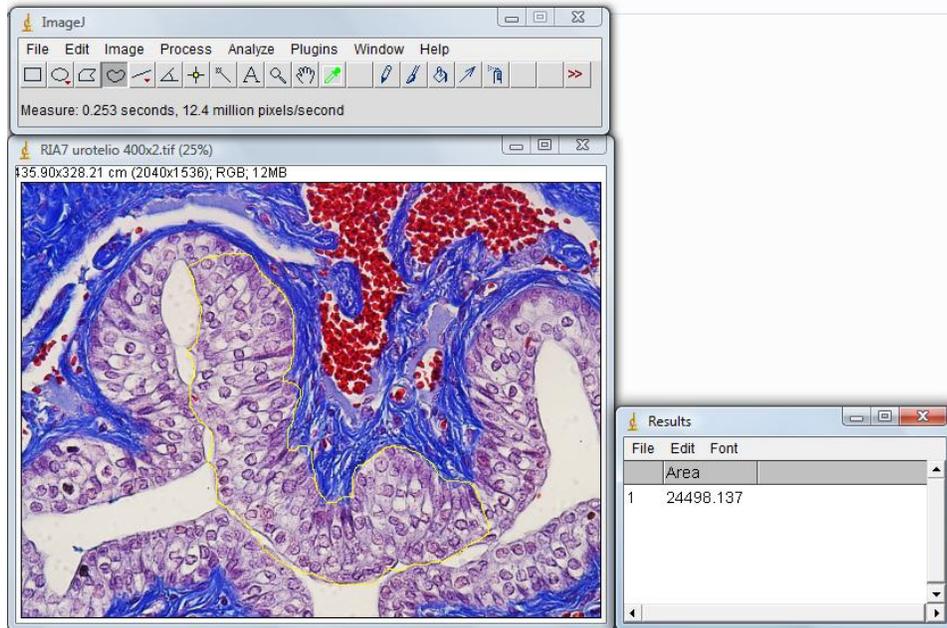


Figura 11 – Seleção da área epitélio e o valor da área a ser quantificada

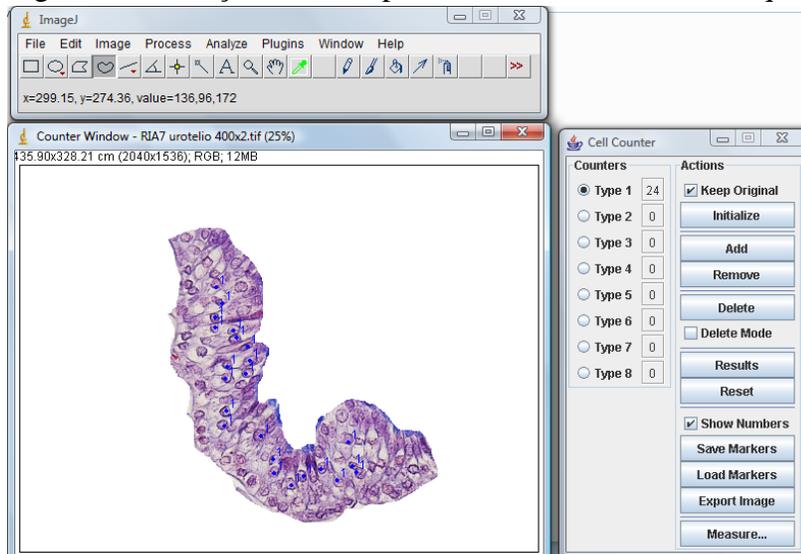


Figura 12 – Exclusão da área que não foi inclusa na seleção e quantificação dos núcleos uroteliais e utilizando a ferramenta *cell counter*

1.9 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 *Graphpad 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 $P < 0,005$.

2 RESULTADOS

Os diferentes tratamentos afetaram significativamente o tecido conjuntivo. O aumento foi observado somente nos grupos avaliados 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.

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.

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

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

	C	RAD7	RAD7 + A	RAD7 + G	
Tecido conjuntivo - CC	61,39	± 64,32	± 65,61	± 65,28	±
	6,01%	3,62%	2,85%	9,85%	
Fibras do sistema elástico - CC	18,31	± 19,31	18,61	± 19,65	±
	2,11%	±3,57%	2,09%	3,93%	
Músculo liso - CC	10,56	± 13,37	± 15,47	± 15,27	±
	3,43%	3,03%	0,791%	3,86%	
Fibras do sistema elástico - TACS	29,281	± 44,43	± 42,91	± 41,16	±
	2,26%	4,12%	1,14%	5,25%	
Densidade celular (Número de células /mm²)	12714,63	11351,83	12182,99	11241,60	
	± 2455,74	± 565,30	± 2361,38	± 1031,11	
Altura do epitélio da uretra (µm)	37,61 ± 3,42	33,79 ± 5,04	37,99	± 39,44 ± 5,84	±
			12,64		

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

	C	RAD15	RAD15 + A	RAD15 + G	
Tecido conjuntivo - CC	61,39	± 72,41	± 63,817	± 67,40	±
	6,01%	3,38%	2,06	2,40%	
Fibras do sistema elástico - CC	18,31	± 29,40	± 21,64	± 29,31	±
	2,11%	2,36%	2,34%	2,94%	
Músculo liso - CC	10,56	± 10,74	± 16,57	± 15,14	±
	3,43%	3,56%	1,96%	1,40%	
Fibras do sistema elástico - TACS	29,281	± 56,08	± 41,93	± 47,34	±
	2,26%	4,74%	10,22%	1,39%	
Densidade celular (Número de células /mm²)	12714,63	8916,08	11113,08	10553,58	
	± 2455,74	± 256,24	± 737,13	± 801,04	
Altura do epitélio da uretra (µm)	37,61 ± 3,42	29,17 ± 3,78	48,14 ± 4,18	43,15 ± 3,80	

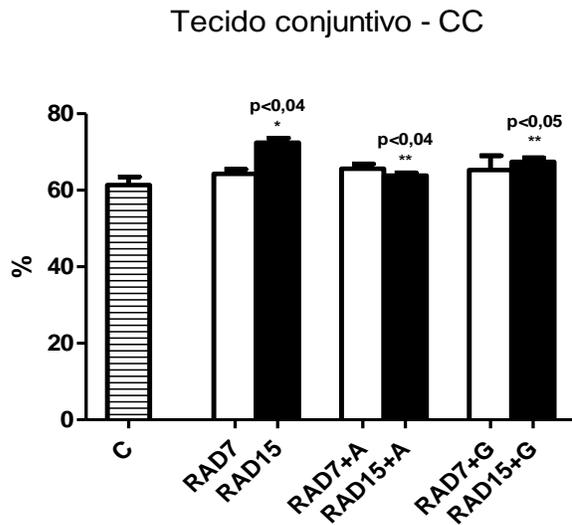


Figura 13 - Análise morfométrica do tecido conjuntivo no corpo cavernoso do pênis, $P < 0,05$ - barra tracejada - controle, barras brancas - resultado 7 dias após a irradiação, barras negras - resultado 15 dias após a irradiação, Os gráficos apresentam as médias e SD, Os dados foram analisados pelo método 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.

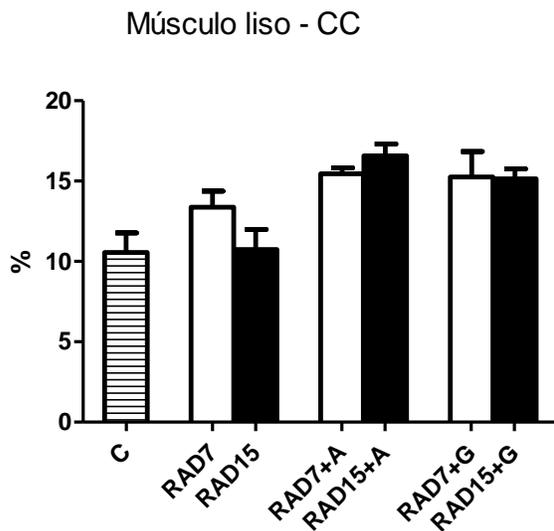


Figura 14 - Análise morfométrica do músculo liso no corpo cavernoso do pênis, - barra tracejada - controle, barras brancas - resultado 7 dias após a irradiação, barras negras - resultado 15 dias após a irradiação.

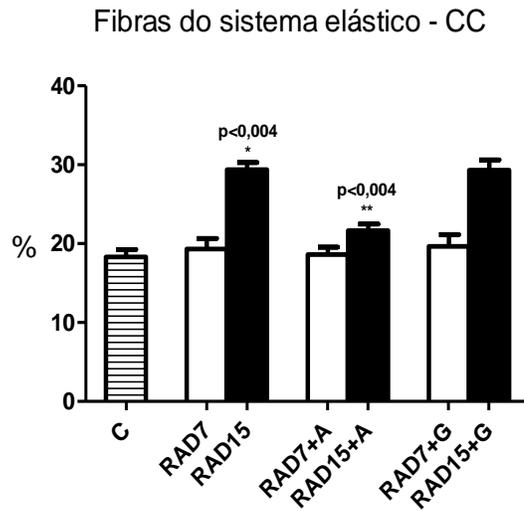


Figura 15 – Análise morfométrica das fibras do sistema elástico no corpo cavernoso do pênis, $P<0,004$ - barra tracejada – controle, barras brancas - resultado 7 dias após a irradiação, barras negras – resultado 15 dias após a irradiação, Os gráficos apresentam as médias e SD, Os dados foram analisados 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.

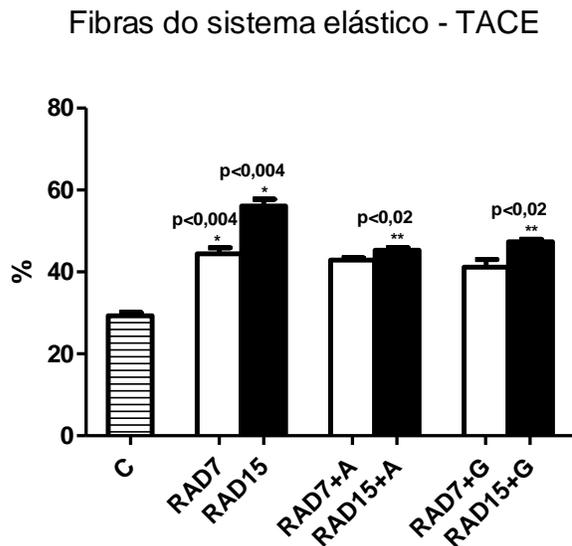


Figura 16 - Análise morfométrica das fibras do sistema elástico na túnica albugínea do corpo esponjoso, $P<0,05$ - barra tracejada – controle, barras brancas – resultado 7 dias após a irradiação, barras negras – resultado 15 dias após a irradiação, Os gráficos apresentam as médias e SD, Os dados foram 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.

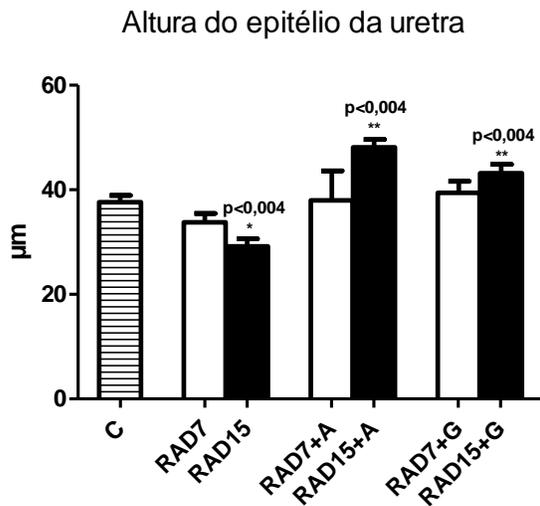


Figura 17 - Análise morfométrica da altura das células epiteliais da uretra. $P<0,05$ - barra tracejada – controle, barras brancas – resultado 7 dias após a irradiação, barras negras – resultado 15 dias após a irradiação, Os gráficos apresentam as médias e SD, Os dados foram analisados pelo método one-way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

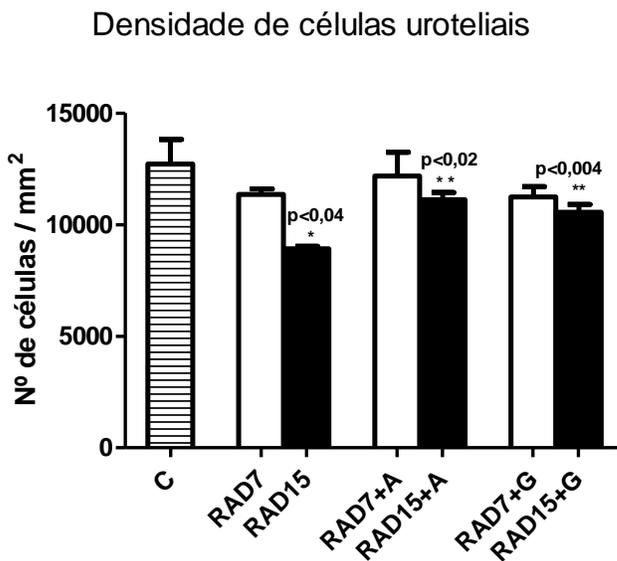


Figura 18 - Análise morfométrica da densidade de células uroteliais. $P<0,05$ -barra tracejada – controle, barras brancas – resultado 7 dias após a irradiação, barras negras – resultado 15 dias após a irradiação, Os gráficos apresentam as médias e SD, Os dados foram analisados pelo método one-way ANOVA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

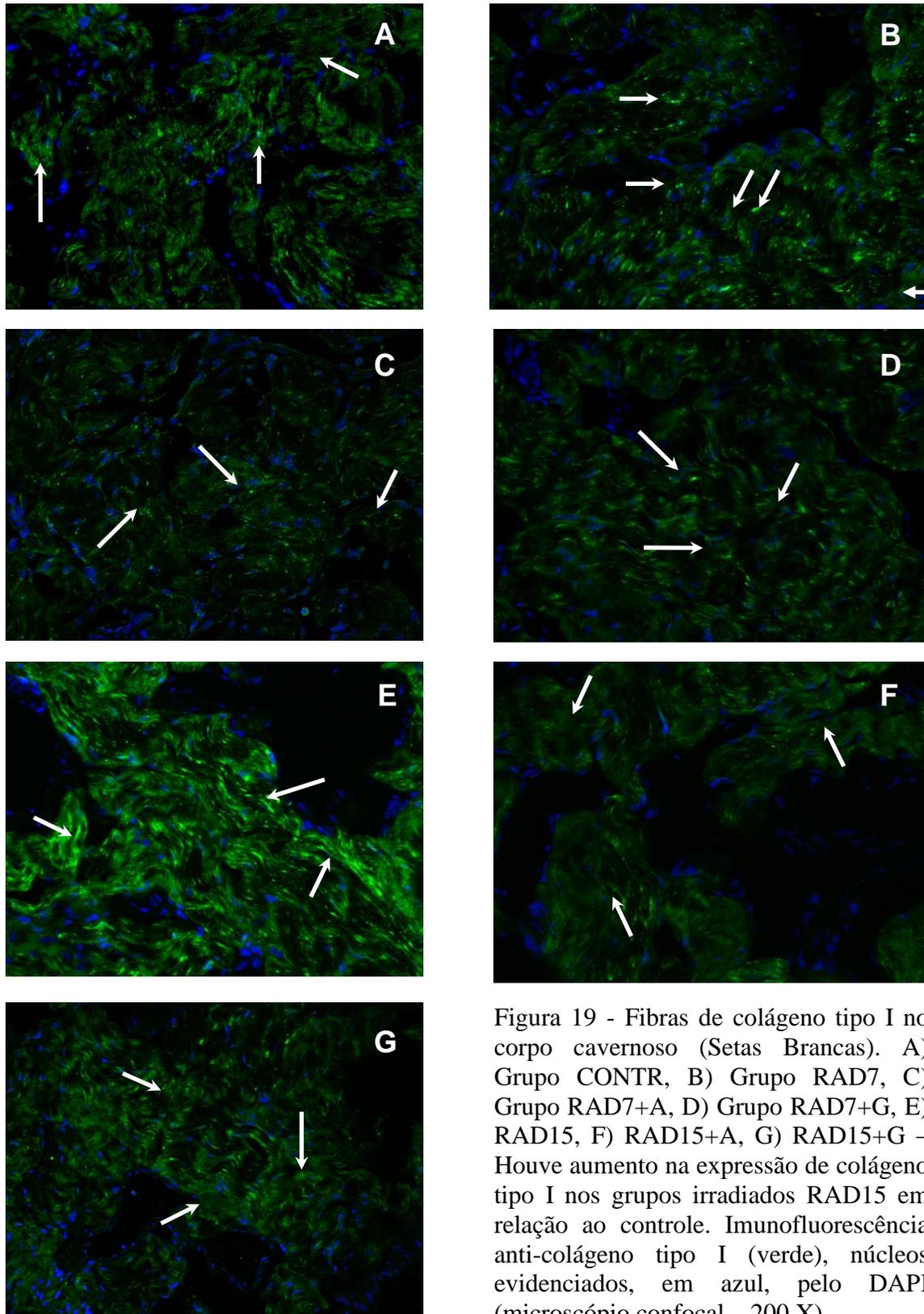


Figura 19 - Fibras de colágeno tipo I no corpo cavernoso (Setas Brancas). A) Grupo CONTR, B) Grupo RAD7, C) Grupo RAD7+A, D) Grupo RAD7+G, E) RAD15, F) RAD15+A, G) RAD15+G – Houve aumento na expressão de colágeno tipo I nos grupos irradiados RAD15 em relação ao controle. Imunofluorescência anti-colágeno tipo I (verde), núcleos evidenciados, em azul, pelo DAPI (microscópio confocal – 200 X).

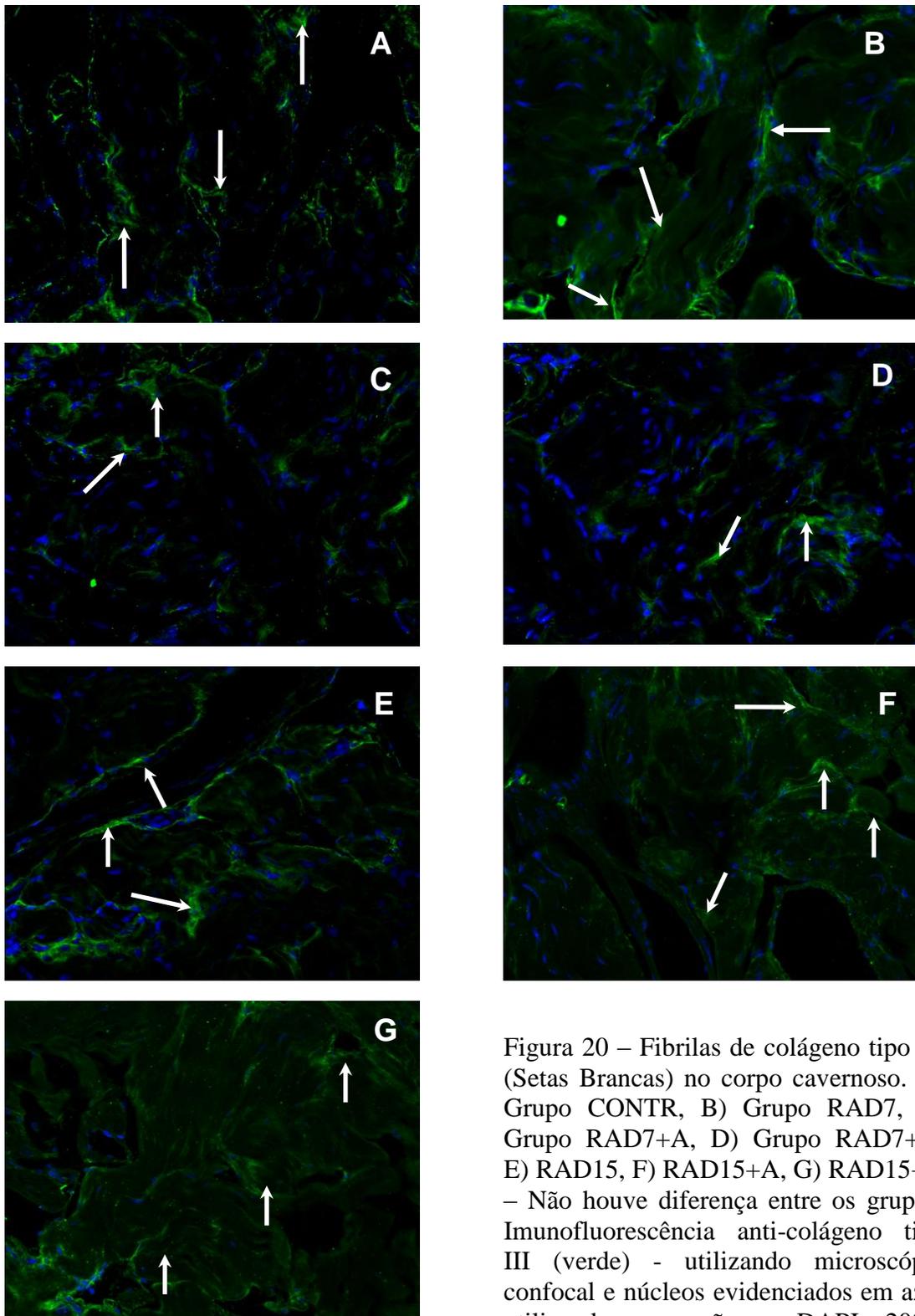


Figura 20 – Fibrilas de colágeno tipo III (Setas Brancas) no corpo cavernoso. A) Grupo CONTR, B) Grupo RAD7, C) Grupo RAD7+A, D) Grupo RAD7+G, E) RAD15, F) RAD15+A, G) RAD15+G – Não houve diferença entre os grupos. Imunofluorescência anti-colágeno tipo III (verde) - utilizando microscópio confocal e núcleos evidenciados em azul utilizando a marcação com DAPI – 200x.

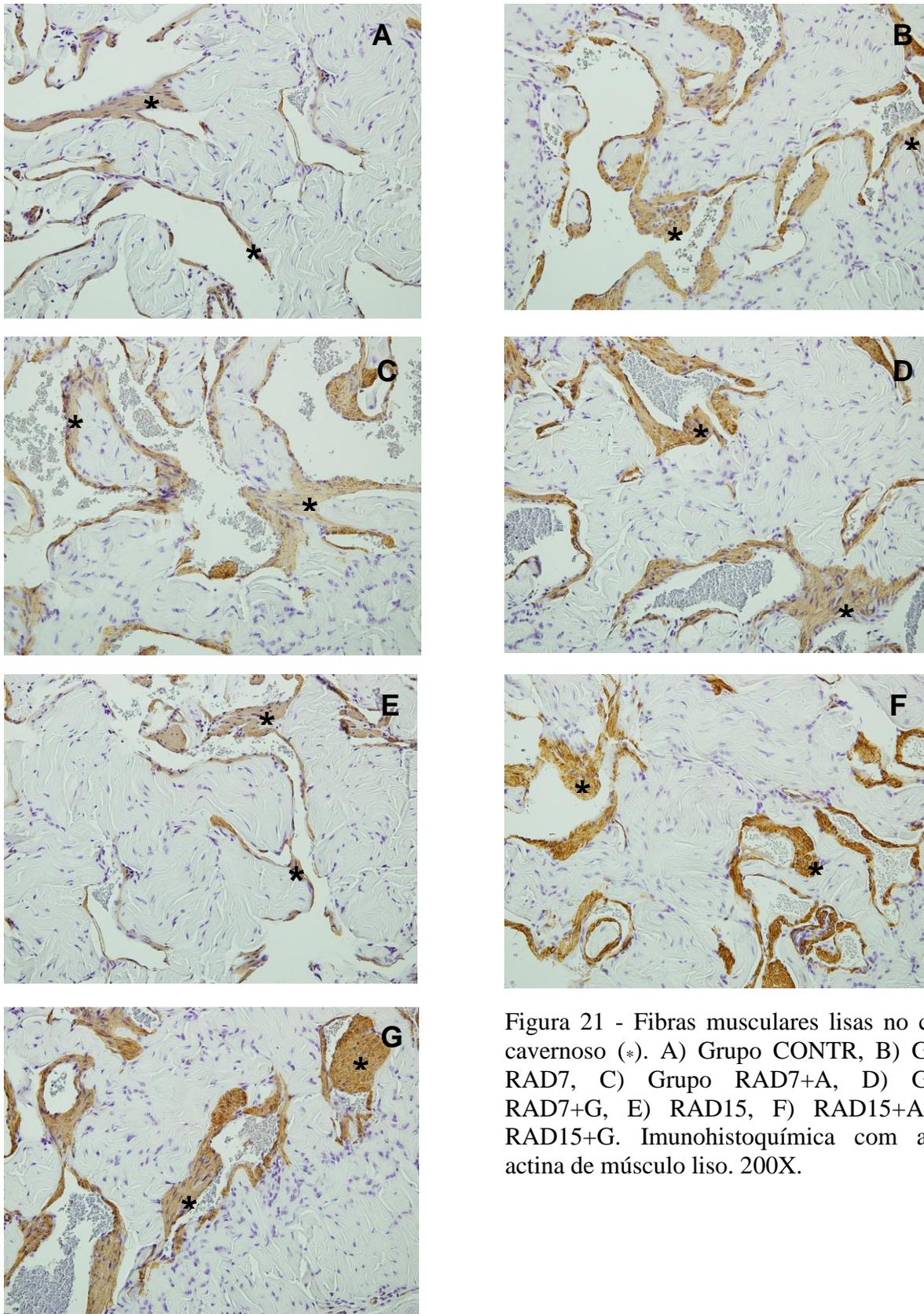


Figura 21 - Fibras musculares lisas no corpo cavernoso (*). A) Grupo CONTR, B) Grupo RAD7, C) Grupo RAD7+A, D) Grupo RAD7+G, E) RAD15, F) RAD15+A, G) RAD15+G. Imunohistoquímica com anti- α actina de músculo liso. 200X.

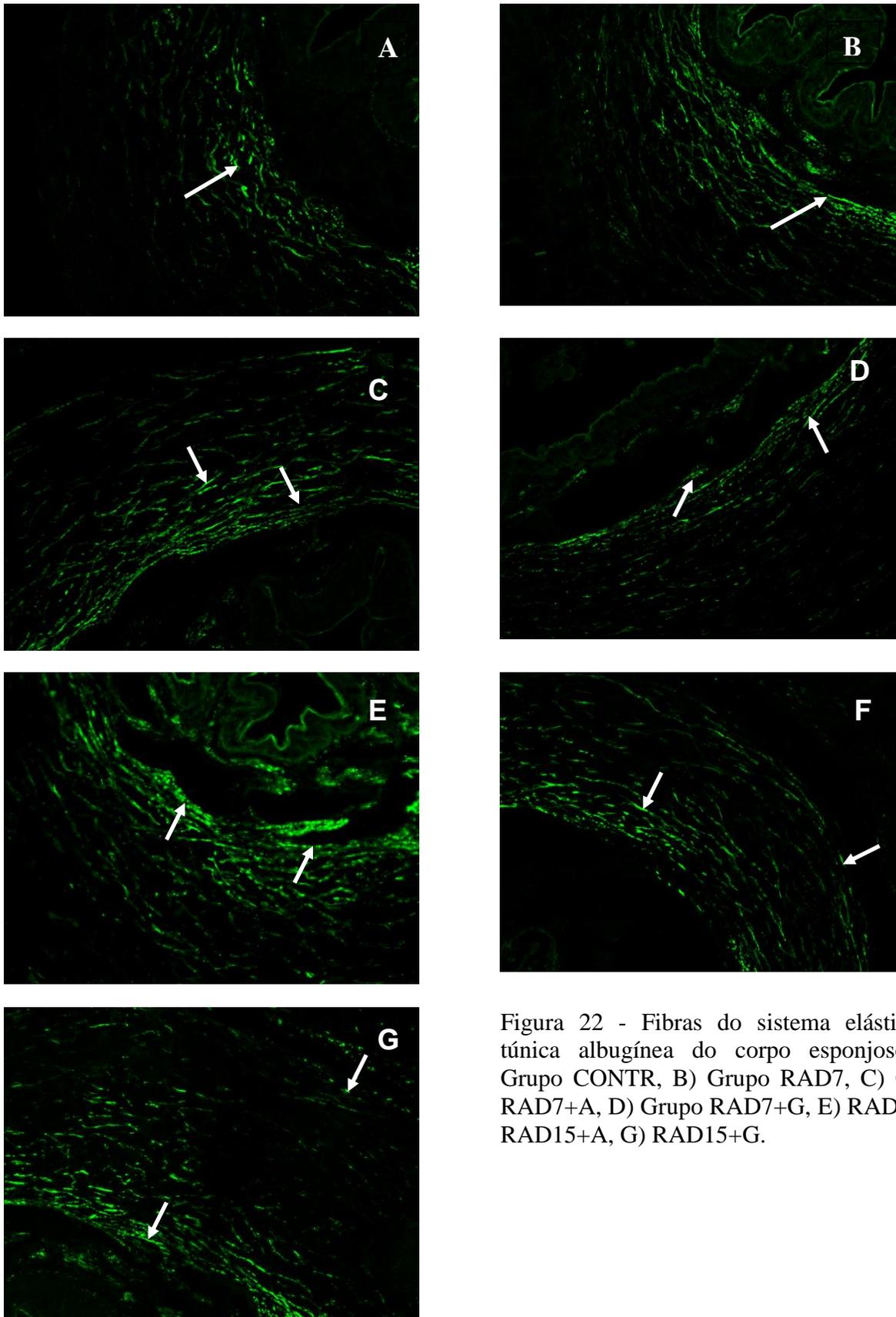


Figura 22 - Fibras do sistema elástico na túnica albugínea do corpo esponjoso. A) Grupo CONTR, B) Grupo RAD7, C) Grupo RAD7+A, D) Grupo RAD7+G, E) RAD15, F) RAD15+A, G) RAD15+G.

3 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 estão entre os principais eventos fisiopatológicos subjacentes da disfunção erétil [36]. O relaxamento do músculo liso trabecular, por exemplo, é um dos eventos necessários para ocorrer à ereção fisiológica, juntamente com o aumento do fluxo sanguíneo e da pressão 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, pode comprometer 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]. Foi demonstrado em diferentes estudos tanto in vivo [39] quanto em in vitro [40] que os radicais livres podem diretamente degradar fibras colágenas em outros tecidos. 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 de 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.

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 estresse físico [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 compõe a fibra elástica, é responsável pela grande capacidade elástica dessas fibras que 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 têm 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 atuam 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 diarreia [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 frequências. Elas são consideradas 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 tóxico 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 da 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].

4 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 algumas mudanças advindas da irradiação nas estruturas penianas. No entanto, a L-arginina parece ser mais efetiva.

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.

APÊNDICE A

1 Protective effects of nutritional supplementation with L-arginine and L-
2 glutamine on the penis of rats submitted to pelvic radiation

3

4 Jorge L. Medeiros Jr., Waldemar S. Costa, Bruno Felix-Patricio, Francisco J.B.

5 Sampaio,

6 and Luiz E.M. Cardoso*

7

8 Urogenital Research Unit, State University of Rio de Janeiro, UERJ, Rio de

9 Janeiro, RJ, Brazil

10

11

12 Running head: Nutritional protection of penis in radiated rats

13

14

15 *Corresponding author:

16

17 Luiz E.M. Cardoso, MD, PhD

18 Urogenital Research Unit - UERJ

19 Av. 28 de Setembro, 87 - fundos - FCM - térreo

20 Rio de Janeiro, RJ, 20551-030, BRAZIL

21 Telephone: (55 21) 2587-6117

22 Fax: (55 21) 2587-6121

23 E-mail: luizemcardoso@gmail.com

24

25

26 Supported by grants from CNPq, FAPERJ, and CAPES, Brazil.

27

28 ABSTRACT

29

30 Background:

31

32 Although organ targeting of current external beam radiotherapy has improved,
33 undesirable damage to adjacent tissues still occurs. Previous investigations
34 indicate that dietary supplements may protect pelvic tissues against such
35 damage, but there is little data about this effect on the penis.

36

37 Objective:

38

39 To determine whether L-arginine and L-glutamine protect penile tissues against
40 radiation-induced alterations.

41

42 Design:

43

44 Groups of 6-9 Wistar rats each were treated as follows: (1) no intervention
45 (CONTR); (2) pelvic radiation, and sacrifice seven (RAD7) or 15 (RAD15) days
46 later; and (3) pelvic radiation, daily supplementation with L-arginine (A) or L-
47 glutamine (G), and sacrifice seven (RAD7+A, RAD7+G) or 15 (RAD15+A, RAD15+G)
48 days after radiation. Structural components in the corpus cavernosum (CC),
49 tunica albuginea of the corpus spongiosum (TACS), and urothelium of the penis
50 were analyzed using stereological and immunohistochemical methods.

51
52 Results:
53
54 In the CC, connective tissue and elastic fibers were increased only in RAD15.
55 Elastic fiber changes were prevented in RAD15+A only, but both aminoacids
56 protected against connective tissue alterations. Elastic fibers in TACS were
57 increased in RAD7 and RAD15, but protective effects were noticeable in RAD15+A
58 and RAD15+G only. Urothelial cell density and thickness were increased and
59 decreased, respectively, in RAD15 only, and these changes was prevented by both
60 aminoacids.

61
62 Conclusion:
63
64 Radiation-induced alterations in penile structures tend to be more pronounced 15
65 days after radiation session. Both A and G have protective effects against these
66 changes, although the former is slightly more effective.

67

68 INTRODUCTION

69

70 More than half of cancer patients are treated with radiotherapy, alone or in
71 combination with surgery and/or chemotherapy [1]. Additionally, one in five
72 patients diagnosed with pelvic cancer will be treated with pelvic radiotherapy
73 [2]. Radiotherapy plays an important role in the treatment of pelvic
74 malignancies and has significantly improved patient prognosis [3].

75 Unfortunately, radiation-induced injury in normal tissues is still a limiting
76 factor in the treatment of cancer with radiotherapy. Side-effects not only limit
77 radiation dose, but might also affect the patient's quality of life [1].

78

79 One of the organs that are affected by pelvic radiotherapy is the penis, since
80 it is included in the treatment field of a wide variety of tumors, such as
81 malignancies of the rectum and prostate [4]. One of the symptoms of radiation
82 induced penis damage is the erection dysfunction. The pathological progression
83 of radiation toxicity in many normal tissues seems to be a consequence of an
84 inflammatory phase followed by late stromal alterations [5]. Morphologically,
85 radiation results in pronounced fibrosis that is mainly seen around blood
86 vessels [4]. Experimental models in rats showed that side effects are dose and
87 time dependent. These alterations are observed at 10 Gy [6]. In large vessels,
88 radiation-induced injury manifests as atherosclerosis, resulting in severe
89 thromboembolic events or stenosis. In smaller vessels, it manifests as
90 telangiectasia, causing excessive bleeding requiring surgical intervention,

91 when occurring in rectal or bladder mucosa [5].

92

93 Arginine has been shown to be the physiological nitrogenous substrate for the

94 production of nitric oxide and is considered an essential amino acid for young

95 mammals, particularly under conditions of severe stress [7]. L-arginine

96 stimulates the secretion of anabolic hormones such as growth hormone, prolactin

97 and also of insulin-like growth factor 1. It is also well established that L-

98 arginine exerts an immunomodulatory action and stimulates wound healing [8].

99 Nitric oxide is a potent vasodilator. In the endothelium, it is produced by

100 catalysis of L-arginine by endothelial nitric oxide synthase, which is a calcium

101 dependent enzyme involved in growth factor mediated angiogenesis [9], secreting

102 vascular endothelial growth factor which is very important to angiogenesis [7].

103 In humans, oral bioavailability of L-arginine is about 70%, and oral

104 administration does not show important hemodynamic effects such as hypotension

105 [10]. L-arginine may be a potential vesical radioprotector because of its

106 characteristics. Also, experiments with irradiated rats have shown that L-

107 glutamine, which enhances the healing of injured mucosae [11], prevents the

108 appearance of early intestinal alterations [12, 13]. However, there is no data

109 on whether these aminoacids can protect the corpus cavernosum from being injured

110 by radiation.

111

112 The aim of this study was thus to assess the effects of pelvic radiation on the

113 different tissues of the rat penis. We focused the analysis on major structures

114 that are involved in erection, such as smooth muscle cells and extracellular
115 matrix fibrillar proteins, and used quantitative histological and image analysis
116 techniques. We also investigated whether L-glutamine and L-arginine
117 supplementation has protective effects against radiation-induced penile
118 injuries.
119

120 MATERIALS AND METHODS:

121

122 Animals and treatments:

123

124 Wistar rats were kept in a standard animal room with controlled temperature and

125 an artificial light: darkness cycle (light from 7:00 AM to 7:00 PM). The

126 handling of the animals was approved by the Animal Care and Use Committee of the

127 Biology Institute of State University of Rio de Janeiro, Brazil, which based

128 their analysis on the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, and the

129 study design was approved by the local Ethical Committee for the care and use of

130 laboratory animals.

131

132 Adult Wistar rats weighting from 270 to 310 g were separated into the following

133 groups of 6 to 9 animals each: control (intact animals); animals submitted to

134 pelvic radiation and sacrificed 7 days later (RAD7); animals receiving pelvic

135 radiation, L-glutamine supplementation, and sacrificed 7 days after the

136 radiation session (RAD7+G); a group identical to RAD7+G, but treated with L-

137 arginine instead (RAD7+A); animals receiving pelvic radiation, L-glutamine

138 supplementation, and sacrificed 15 days after the radiation session (RAD15+G); a

139 group identical to RAD15+G, but treated with L-arginine instead (RAD15+A). Oral

140 supplementation with L-glutamine and L-arginine (0.65 g/kg) was given daily,

141 starting one day before the radiation session and continuing until the sacrifice

142 of the animals, which was done by a lethal dose of pentobarbital. Immediately

143 after sacrifice, the penis was excised, fixed in formalin, and processed by
144 routine histological procedures.

145

146 For the radiation session, the animals were maintained in a dorsal position
147 inside small plastic cages at the moment of abdominal radiation in a way that
148 they could not move. A linear acceleration of 06 MeV (model Clinac 2100,
149 Varian), liberated the radiation with a speed of 240 cGy/min, in a font-skin
150 distance of 100 cm, in a 6x4cm field over the abdomen. The head, thorax and
151 members were outside the radiation field.

152

153 The daily dose of glutamine was prepared as an aqueous solution (4%) in a total
154 volume of 5 mL. It was administered by gavage with an orogastric catheter,
155 always at the same time of the day. All animals had free access to water and
156 standard diet during all the experiment period.

157

158 Histological procedures:

159

160 The material obtained was fixed in formalin (pH 7.2) and processed following the
161 routine histological procedures for the inclusion in paraffin. Section of 5 μ m of
162 thickness was stained by the following methods: Hematoxylin and Eosin for the
163 analysis of the integrity of the specimens and exclusion of the samples with
164 artifacts, and Weigert's resorcin fuchsin for elastic fibers.

165

166 Immunohistochemistry procedure: We performed Avidin Biotin technique for
167 identification of smooth muscle cells using a monoclonal anti-mouse anti- α
168 smooth muscle actin (Zymed Laboratories, catalog number 08-0106 Carlsbad, CA,
169 USA). Negative controls were performed replacing primary antibody by PBS and
170 positive controls using fragments of tissue (skin) that present the antigens
171 investigated. The revelation was made with a solution of 3,3, diamino-benzidine
172 tetrahydrocloridro (DAB) (Zymed Laboratories, catalog number 002 014 Carlsbad,
173 CA, USA) in 0.1% H₂O₂, washed with distilled water, dehydrated in an increasing
174 series ethanol, cleared in xylene and mounted with Ethelan.

175
176 Image acquisition and analysis:
177
178 Five different sections were selected from five fragments. Then, five random
179 fields were evaluated from each section. Therefore, there were 25 test areas
180 from each section. Images were digitized using an Olympus DP70 (12.5 megapixels)
181 video camera coupled to a BX51 Olympus light microscope, which transferred all
182 images captured to a microcomputer.

183
184 Morphological quantification: The quantitative analysis was performed using
185 paraffin sections. After image digitalization was performed using a 100 point
186 grade tool of the software ImageJ version 1.43 (National Institutes of Health,
187 USA), with previous calibrations. Quantification was performed at a final
188 magnification of X200.

189

190 Statistical analysis

191

192 Group means for each variable were first analyzed by one-way ANOVA. When

193 statistical significance was found, pairwise planned comparisons using the

194 Bonferroni method were done: (a) between radiated-only and control animals, to

195 assess the effects of radiation; and (b) between either of the aminoacid-treated

196 groups and radiated-only animals, to assess the effects of L-arginine and L-

197 glutamine. Numerical results are given as mean \pm standard deviation, and

198 statistical significance was considered when $p < 0.05$.

199

200 RESULTS

201

202 Corpus cavernosum

203

204 The different treatments significantly affected connective tissue content in the
205 CC 15 days after radiation (ANOVA, $p < 0.001$) (Table 2), but not after seven
206 days (Table 1). Thus, 15 days after radiation, the content was increased by 18%
207 in RAD15 compared with controls (72.42 ± 3.37 vs 61.39 ± 6.01 , $p < 0.04$).
208 Compared against these RAD15 animals, cavernosal connective tissue content in
209 RAD15+G (67.40 ± 2.40) was reduced by 7% ($p < 0.05$), whereas in RAD15+A (63.82
210 ± 2.06) there was a 12% reduction ($p < 0.04$). As a return from RAD15 values to
211 those of controls would require a 15% reduction, treatment with the aminoacids
212 had a partial protective effect against radiation-induced increase in cavernosal
213 connective tissue content.

214

215 Cavernosal elastic fibers were likewise only affected at the 15-day time point
216 (ANOVA, $p < 0.001$) (Table 2; see Table 1 for seven days time point), when
217 radiation led to a 61% increase in its content compared with control animals
218 (29.40 ± 2.36 vs 18.31 ± 2.11 , $p < 0.004$). Compared with RAD15, L-arginine
219 treatment decreased elastic fiber content by 26% ($p < 0.004$), which is slightly
220 less than the required 38% reduction for reaching control values. In contrast,
221 L-glutamine had no protective effect, as the value for RAD15+G was not
222 significantly different from that of RAD15.

223
224 Although smooth muscle content in the CC was increased by 27% in RAD7 animals
225 (Table 1), in RAD15 the content was nearly identical to that of controls (Table
226 2). Therefore, the increased smooth muscle content in the CC spontaneously
227 returned to normal values 15 days after the radiation session. On the other
228 hand, both aminoacids induced a moderate increase in smooth muscle content in
229 radiated animals sacrificed at the 15-day time point, so that their contents are
230 higher than that of controls. Note that this effect also occurred in radiated
231 animals sacrificed at the seven-day time point. Thus, this aminoacid-induced
232 alteration should be due to a trophic effect on smooth muscle growth.

233
234 Tunica albuginea of the corpus spongiosum
235
236 Radiation and the aminoacid treatments affected the content of elastic fibers in
237 the tunica albuginea of the corpus spongiosum in animals sacrificed at the
238 seven- (Table 1) and 15- (Table 2) day time points (ANOVA, $p < 0.001$). In RAD7,
239 the content of elastic fibers was increased by 52% ($p < 0.004$), but neither L-
240 glutamine nor L-arginine prevented this effect as the values for groups RAD7+A
241 and RAD7+G were not significantly different from that of radiated-only animals.
242 In RAD15, the content was increased by 92% ($p < 0.004$). Although there were
243 significant reductions in RAD15+G (16%, $p < 0.02$) and RAD15+A (25%, $p < 0.02$),
244 compared with RAD15, the rates were smaller than the required 48% reduction for
245 a return to control values. Thus, these aminoacids protect against radiation-

246 induced increase in elastic fiber content in the tunica albuginea of the corpus
247 spongiosum, but this effect is partial and only occurs 15 days after radiation.

248

249 Urothelium

250

251 The various treatments did not significantly affect the thickness and cell
252 density of the penile urothelium in animals sacrificed seven days after
253 radiation (Table 1). A significant effect on these variables was detected,
254 however, in animals sacrificed at the 15-day time point (ANOVA, $p < 0.001$ and p
255 < 0.005 , respectively; Table 2). Accordingly, and compared with controls, cell
256 density in the urothelium was reduced by 30% in RAD15 ($p < 0.004$). In relation
257 to this latter group, L-glutamine increased cell density by 18% ($p < 0.02$),
258 while L-arginine induced an increase of 25% ($p < 0.004$). These are again partial
259 protective effects, as a 43% increase would be required for attaining control
260 values.

261

262 Also compared against controls, radiation reduced urothelial thickness by 22% (p
263 < 0.004). The aminoacid treatments, however, not only countered this effect, but
264 also augmented thickness in relation to control values. Thus, and compared with
265 RAD15, L-glutamine increased urothelial thickness by 48% ($p < 0.004$), while an
266 increase of 65% ($p < 0.004$) was seen in radiated animals treated with L-
267 arginine.

268

269 DISCUSSION

270

271 The trabeculae of the corpus cavernosum are made up of endothelial cells, smooth
272 muscle cells, and a dense extracellular matrix that contains mostly fibrillar
273 proteins such as collagen and elastic fibers [15-17]. These components play
274 important and different roles during erection, and alterations in their
275 structural organization is thought to be one of the key pathophysiological
276 events underlying erectile dysfunction [18]. Relaxation of trabecular smooth
277 muscle, for example, is one of the initial steps of normal erection, elevating
278 blood flow and pressure in the cavernosal vascular spaces [19].

279

280 Cavernosal smooth muscle, however, was significantly increased seven days after
281 one dose of radiation aimed at the pelvic region, as shown by our results. At
282 the 15th day after a single dose of radiation we found spontaneously returned to
283 normal values. On the other hand, in the long run the effects may be different,
284 as findings using this same rat model showed that smooth muscle in the corpus
285 cavernosum was visually decreased five months after a single dose of radiation
286 [20]. Thus, our results showing an enlargement of smooth muscle may be a short-
287 term effect of radiation on the cells of this tissue. Indeed, if arterial tissue
288 is subjected to radiation, the resulting acute injuries are marked by an
289 enhanced release of the mitogen PDGF and by an ensuing smooth muscle cell
290 proliferation [21]. Because the corpus cavernosum is a vascular tissue and
291 cavernosal cells in the rat express PDGF subunits and receptor , a similar

292 inflammatory mechanism might be responsible for the increase in smooth muscle in
293 our irradiated animals.

294
295 In addition to affecting relaxation of the corpus cavernosum, this short-term
296 increase in cavernosal smooth muscle cells may have other negative impacts on
297 erection. Accordingly, we have shown previously that these cells in the rat
298 corpus cavernosum are arranged as a subendothelial layer, whereas in humans they
299 are more homogeneously distributed in the trabeculae [17]. Further, preliminary
300 data obtained in our laboratory indicate that, in the aged rat, when there is
301 already a loss of sexual function[22], this smooth muscle layer is markedly
302 thicker and the sinusoidal vascular space is diminished [23]. As the amount of
303 trabecular connective tissue and of elastic fibers was unchanged in the
304 irradiated groups, as per our results, the 40% increase in smooth muscle after
305 this treatment should lead to a corresponding reduction in the lumen of the
306 cavernosal sinusoids. In RAD15 groups these components were changed, we found
307 the 18% increase when compared with C. This alteration should then have adverse
308 effects on blood flow and other erection-related characteristics of the corpus
309 cavernosum. Indeed, clinical exams indicate that there are hemodynamic changes
310 in the corpus cavernosum of men who have been submitted to pelvic radiation
311 therapy for prostate cancer [24]. As mentioned above, smooth muscle relaxation
312 is necessary to initiate erection. Once the corpus cavernosum starts to expand,
313 its noncircular cross section is maintained by the trabeculae, thereby
314 decreasing compressive forces that are exerted on the corpus spongiosum [19].

315 This function of the trabeculae of limiting expansion should therefore depend
316 directly on the non-distensible collagen fibers thereof. Thus, such an
317 alteration in the cavernosal collagen fibers as a result of radiation might
318 impair the expansion limiter function of the trabeculae, which would in turn
319 compromise the inflation and normal functioning of the urethra during
320 copulation. A radiation model similar to the one used in the present
321 investigation induced vascular alterations in the rat penis, and the fact that
322 antioxidant treatment prevented these lesions strongly indicates that they are
323 mediated by free radicals [25]. Moreover, it has been shown both in vivo[26] and
324 in vitro [27] that free radicals can directly degrade collagen fibers. Because
325 our results suggest an enhanced turnover of trabecular collagen following pelvic
326 radiation, this alteration in the corpus cavernosum might be mediated, at least
327 in part, by free radicals. It should also be mentioned that an acutely degraded
328 and/or disrupted extracellular matrix should lead, in the long run, to the
329 formation of a fibrotic tissue. There is more recent experimental evidence,
330 however, indicating that treatment with certain aminoacids may have a protective
331 effect against radiation induced injuries. For example, investigations using the
332 same radiation protocol as described herein have shown that nutritional
333 supplementation with L-glutamine alone protects against intestinal injuries in
334 rats. Thus, this aminoacid caused a marked decrease in bacterial invasion into
335 the intestinal wall and prevented decreases in the height and density of
336 jejunal/ileal villi and in the thickness of the colonic mucosa [13]. L-glutamine
337 also prevented a decrease in the thickness of the colonic wall [12]. In spite of

338 its beneficial effects on the intestinal wall, L-glutamine did not prevent the
339 adverse effects of radiation on cavernosal smooth muscle and collagen, as shown
340 by our results. When comparing these effects, however, differences between the
341 intestinal wall and the corpus cavernosum should be taken into account. The
342 short-term protective effects on the intestinal epithelium may be attributed to
343 a topical effect of L-glutamine, which itself stimulates proliferation of these
344 cells [11]. Such an effect is less likely to affect cells in the corpus
345 cavernosum. On the other hand, a protection against a decrease in the volume of
346 both the colonic wall and of its smooth muscle layers [12] suggests a more
347 systemic effect of L-glutamine. This aminoacid, however, was ineffective in
348 preventing smooth muscle enlargement in the corpus cavernosum after radiation.
349 Such a differential effect of L-glutamine might be attributed to a metabolic
350 heterogeneity among smooth muscle cells, which are known to have different
351 proliferative responses and react differently to drugs depending on their tissue
352 of origin [28]. In conclusion, the short-term adverse effects of pelvic
353 radiation on the rat corpus cavernosum include smooth muscle growth and a
354 disruption of trabecular collagen. These alterations imply early inflammatory
355 and repair reactions which may affect the normal functioning of the erectile
356 tissue. L-glutamine, which protects intestinal tissue against radiation, did not
357 prevent these injuries.

358

359 In conclusion, the adverse effects on penile structures are detectable seven and
360 15 days after a pelvic radiation session, but they are more pronounced at the

361 latter time point. L-arginine and L-glutamine totally or partially prevent these
362 radiation-induced changes in penile structures, although L-arginine is slightly
363 more effective.
364

365 ACKNOWLEDGMENTS

366

367 All authors equally participated in the design of the experiments, and in data
368 retrieval and analysis. Luiz E.M. Cardoso and Waldemar S. Costa participated in
369 the preparation of the manuscript.

370

371 The authors have no conflict of interest.

372 REFERENCES

373

374 1. Milliat F, Francois A, Tamarat R and Benderitter M: Role of endothelium in
375 radiation-induced normal tissue damages. *Ann Cardiol Angeiol (Paris)*. 2008; 57:
376 139-48.

377

378 2. McGough C, Peacock N, Hackett C, Baldwin C, Norman A, Frost G, Blake P,
379 Tait D, Khoo V, Harrington K, Whelan K and Andreyev HJ: Taste preferences for
380 oral nutrition supplements in patients before and after pelvic radiotherapy: a
381 double-blind controlled study. *Clin Nutr*. 2006; 25: 906-12.

382

383 3. Turina M, Mulhall AM, Mahid SS, Yashar C and Galandiuk S: Frequency and
384 surgical management of chronic complications related to pelvic radiation. *Arch*
385 *Surg*. 2008; 143: 46-52; discussion

386 4. Jaal J and Dorr W: Radiation-induced damage to mouse urothelial barrier.
387 *Radiother Oncol*. 2006; 80: 250-6.

388

389 5. Rodemann HP and Blaese MA: Responses of normal cells to ionizing
390 radiation. *Semin Radiat Oncol*. 2007; 17: 81-8.

391

392 6. Marks LB, Carroll PR, Dugan TC and Anscher MS: The response of the urinary
393 bladder, urethra, and ureter to radiation and chemotherapy. *Int J Radiat Oncol*
394 *Biol Phys*. 1995; 31: 1257-80.

- 395
- 396 7. Zhan Z, Ou D, Piao X, Kim SW, Liu Y and Wang J: Dietary arginine
397 supplementation affects microvascular development in the small intestine of
398 early-weaned pigs. *J Nutr.* 2008; 138: 1304-9.
- 399
- 400 8. Roth E: Immune and cell modulation by amino acids. *Clin Nutr.* 2007; 26:
401 535-44.
- 402
- 403 9. Beenken A and Mohammadi M: The FGF family: biology, pathophysiology and
404 therapy. *Nat Rev Drug Discov.* 2009; 8: 235-53.
- 405
- 406 10. Bode-Boger SM, Boger RH, Galland A, Tsikas D and Frolich JC: L-arginine-
407 induced vasodilation in healthy humans: pharmacokinetic-pharmacodynamic
408 relationship. *Br J Clin Pharmacol.* 1998; 46: 489-97.
- 409
- 410 11. Klimberg VS, Salloum RM, Kasper M, Plumley DA, Dolson DJ, Hautamaki RD,
411 Mendenhall WR, Bova FC, Bland KI, Copeland EM, 3rd and et al.: Oral glutamine
412 accelerates healing of the small intestine and improves outcome after whole
413 abdominal radiation. *Arch Surg.* 1990; 125: 1040-5.
- 414
- 415 12. Diestel CF, Marques RG, Lopes-Paulo F, Paiva D, Horst NL, Caetano CE and
416 Portela MC: Role of L-glutamine and glycine supplementation on irradiated
417 colonic wall. *Int J Colorectal Dis.* 2007; 22: 1523-9.

418

419 13. Ersin S, Tuncyurek P, Esassolak M, Alkanat M, Buke C, Yilmaz M, Telefoncu
420 A and Kose T: The prophylactic and therapeutic effects of glutamine- and
421 arginine-enriched diets on radiation-induced enteritis in rats. *J Surg Res.*
422 2000; 89: 121-5.

423

424 14. Gonzalez A, Gomez BL, Munoz C, Aristizabal BH, Restrepo A, Hamilton AJ and
425 Cano LE: Involvement of extracellular matrix proteins in the course of
426 experimental paracoccidioidomycosis. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2008; 53: 114-
427 25.

428

429 15. Bastos AL, Costa WS, Cardoso LE and Sampaio FJ: Collagen and elastic
430 fibers in the penis of human fetuses at 28 weeks postconception. *Eur Urol.* 1999;
431 36: 158-63.

432

433 16. Bastos AL, Sampaio FJ and Cardoso LE: Compositional changes of collagen
434 and glycosaminoglycans in the tunica albuginea and corpus cavernosum from the
435 human penis during the fetal and postnatal periods. *J Urol.* 2005; 173: 1039-43.

436

437 17. Pinheiro AC, Costa WS, Cardoso LE and Sampaio FJ: Organization and
438 relative content of smooth muscle cells, collagen and elastic fibers in the
439 corpus cavernosum of rat penis. *J Urol.* 2000; 164: 1802-6.

440

- 441 18. Moreland RB: Pathophysiology of erectile dysfunction: the contributions of
442 trabecular structure to function and the role of functional antagonism. Int J
443 Impot Res. 2000; 12 Suppl 4: S39-46.
444
- 445 19. Kelly DA: Penises as variable-volume hydrostatic skeletons. Ann N Y Acad
446 Sci. 2007; 1101: 453-63.
447
- 448 20. Carrier S, Hricak H, Lee SS, Baba K, Morgan DM, Nunes L, Ross GY, Phillips
449 TL and Lue TF: Radiation-induced decrease in nitric oxide synthase--containing
450 nerves in the rat penis. Radiology. 1995; 195: 95-9.
451
- 452 21. Sinzinger H and Firbas W: Irradiation depresses prostacyclin generation
453 upon stimulation with the platelet-derived growth factor. Br J Radiol. 1985; 58:
454 1023-6.
455
- 456 22. Saito TR, Terada M, Moritani N, Hashimoto H, Oikawa T and Soeta S:
457 Developmental expression of penile reflexes and copulatory behavior in male
458 rats. Exp Anim. 2003; 52: 153-7.
459
- 460 23. Machado FA, Costa, W.S., Souza, A., Sampaio, F.J.B., Cardoso, L.E.M: Age-
461 related modifications in the structural organization of thr trabeculae and
462 endothelial regeion in the corpus carvernosum of the rat penis. J Urol. 2008;
463 179:

464 24. Mulhall J, Ahmed A, Parker M and Mohideen N: The hemodynamics of erectile
465 dysfunction following external beam radiation for prostate cancer. *J Sex Med.*
466 2005; 2: 432-7.

467

468 25. Sener G, Atasoy BM, Ersoy Y, Arbak S, Sengoz M and Yegen BC: Melatonin
469 protects against ionizing radiation-induced oxidative damage in corpus
470 cavernosum and urinary bladder in rats. *J Pineal Res.* 2004; 37: 241-6.

471

472 26. Trenam CW, Dabbagh AJ, Morris CJ and Blake DR: Skin inflammation induced
473 by reactive oxygen species (ROS): an in-vivo model. *Br J Dermatol.* 1991; 125:
474 325-9.

475

476 27. Arisawa S, Arisawa T, Ohashi M, Nitta Y, Ikeya T and Asai J: Effect of the
477 hydroxyl radical on fibroblast-mediated collagen remodelling in vitro. *Clin Exp*
478 *Pharmacol Physiol.* 1996; 23: 222-8.

479

480 28. Rodat-Despoix L, Crevel H, Marthan R, Savineau JP and Guibert C:
481 Heterogeneity in 5-HT-induced contractile and proliferative responses in rat
482 pulmonary arterial bed. *J Vasc Res.* 2008; 45: 181-92.

483

484
 485 Table 1. Effects of L-arginine and L-glutamine on different structures of the
 486 penis from rats sacrificed seven days after radiation. These structures were
 487 separately analyzed in the urothelium (UROTH), corpus cavernosum (CC), and
 488 tunica albuginea of the corpus spongiosum (TACS).

489

Penile region	Variable	Animal groups				ANOVA
		CONTROL	RAD7	RAD7+A	RAD7+G	
CC	Connect	61.39 ± 6.01	64.32 ± 3.62	65.61 ± 2.85	65.28 ± 9.85	> 0.05
	Elast	18.31 ± 2.11	19.31 ± 3.57	18.61 ± 2.09	19.65 ± 3.93	> 0.05
	Musc	10.56 ± 3.43	13.37 ± 3.03	15.47 ± 0.79	15.27 ± 3.86	< 0.05
TACS	Elast	29.28 ± 2.26	44.43 ± 4.12****	42.91 ± 1.14	41.16 ± 5.25	< 0.001
UROTH	Dens	12714.6 ± 2455.7	11351.8 ± 565.3	12183.0 ± 2361.4	11241.6 ± 1031.1	> 0.05
	Thickn	37.61 ± 3.42	33.79 ± 5.04	37.99 ± 12.64	39.44 ± 5.84	> 0.05

490
 491 Groups consisted of non-radiated, non-treated animals (CONTROL), radiated-only
 492 animals (RAD7), and radiated animals receiving either L-arginine (RAD7+A) or L-
 493 glutamine (RAD7+G) supplementation.

494
 495 The relative contents of connective tissue (Connect), elastic fibers (Elast),
 496 and smooth muscle (Musc) were evaluated as volumetric density and are expressed
 497 as percentages. In the urothelium, cell density (Dens) was determined as number
 498 of nuclei per mm², while urothelial thickness (Thickn) was measured as a linear

499 distance in μm from the luminal surface of cells to the underlying basement
500 membrane.

501

502 Group means for each variable were analyzed by one-way ANOVA (p values on the
503 table), followed by pairwise comparisons using the Bonferroni method (indicated
504 as * $p < 0.05$, ** $p < 0.04$, *** $p < 0.02$, and **** $p < 0.004$). When results for these
505 comparisons are on RAD7, they denote a difference with regard to CONTROL,
506 whereas on either RAD7+A or RAD7+G they indicate a difference with regard to
507 RAD7. All figures are mean \pm standard deviation.

508

509
 510 Table 2. Effects of L-arginine and L-glutamine on different structures of the
 511 penis from rats sacrificed 15 days after radiation. These structures were
 512 separately analyzed in the urothelium (UROTH), corpus cavernosum (CC), and
 513 tunica albuginea of the corpus spongiosum (TACS).

514

Penile region	Variable	Animal groups				ANOVA
		CONTROL	RAD15	RAD15+A	RAD15+G	
CC	Connect	61.39 ± 6.01	72.41 ± 3.38**	63.817 ± 2.06**	67.40 ± 2.40*	< 0.001
	Elast	18.31 ± 2.11	29.40 ± 2.36****	21.64 ± 2.34****	29.31 ± 2.94	< 0.001
	Musc	10.56 ± 3.43	10.74 ± 3.56	16.57 ± 1.96	15.14 ± 1.40	< 0.001
TACS	Elast	29.281 ± 2.26	56.08 ± 4.74****	41.93 ± 10.22***	47.34 ± 1.39***	< 0.001
UROTH	Dens	12714.6 ± 2455.7	8916.1 ± 256.2**	11113.1 ± 737.1****	10553.6 ± 801.0****	< 0.005
	Thickn	37.61 ± 3.42	29.17 ± 3.78****	48.14 ± 4.18****	43.15 ± 3.80****	< 0.001

515
 516 Groups consisted of non-radiated, non-treated animals (CONTROL), radiated-only
 517 animals (RAD15), and radiated animals receiving either L-arginine (RAD15+A) or
 518 L-glutamine (RAD15+G) supplementation.
 519
 520 The relative contents of connective tissue (Connect), elastic fibers (Elast),
 521 and smooth muscle (Musc) were evaluated as volumetric density and are expressed
 522 as percentages. In the urothelium, cell density (Dens) was determined as number

523 of nuclei per mm², while urothelial thickness (Thickn) was measured as a linear
524 distance in μm from the luminal surface of cells to the underlying basement
525 membrane.
526
527 Group means for each variable were analyzed by one-way ANOVA (p values on the
528 table), followed by pairwise comparisons using the Bonferroni method (indicated
529 as * $p < 0.05$, ** $p < 0.04$, *** $p < 0.02$, and **** $p < 0.004$). When results for these
530 comparisons are on RAD15, they denote a difference with regard to CONTROL,
531 whereas on either RAD15+A or RAD15+G they indicate a difference with regard to
532 RAD15. All figures are mean \pm standard deviation.
533

ANEXO A - Carta da Comissão de Ética para o Cuidado e Uso de Animais Experimentais do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes da UERJ (CEA)



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.



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

ANEXO B – Submissão do artigo científico

responding Author:

https://www.rapidreview.com/ASCN2/GUIs/AuthorFram..

RAPID REVIEW for Web-based Review Management [Feedback](#) [Help](#) [Log Off](#)

Author:
Liz E.M. Cardoso

The American Journal of Clinical Nutrition

My Manuscripts

Sort by MS Number

Sorted by MS Number

[Instructions for Submitting](#)
[More About File Formats](#)
[More About MS Status](#)
[Copyright Form](#)



[Protective effects of nutritional supplementation with l-arginine and l-glutamine on the penis of rats submitted to pelvic radiation](#)



MS # 30100

Journal name: The American Journal of Clinical Nutrition

Version 1

Submitted date: 07/07/2010

MS Status: MS at Check-In

Days since submission: 0

Copyright: No