



Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Centro Biomédico

Faculdade de Ciências Médicas

Flávia Cristina Morone Pinto

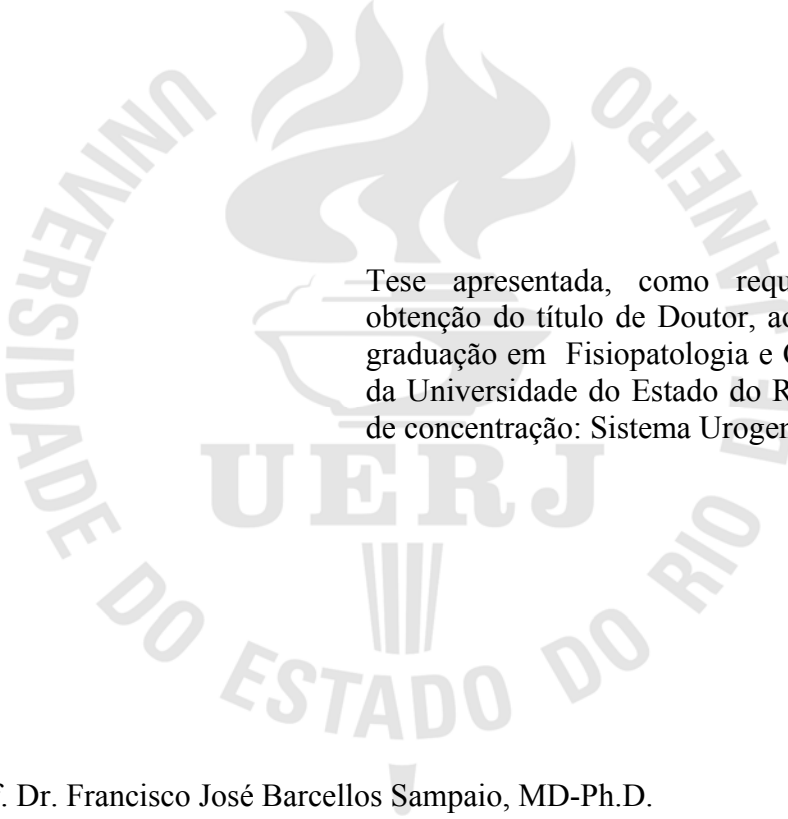
**Efeitos da suplementação oral com L-arginina e L-glutamina sobre a próstata
ventral de ratos submetidos à irradiação**

Rio de Janeiro

2011

Flávia Cristina Morone Pinto

Efeitos da suplementação oral com L-arginina e L-glutamina sobre a próstata ventral de ratos submetidos à irradiação



Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, 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. Francisco José Barcellos Sampaio, MD-Ph.D.

Rio de Janeiro

2011

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/CBB

P659 Pinto, Flávia Cristina Morone.
Efeitos da suplementação oral com L-arginina e L-glutamina sobre a próstata ventral de ratos submetidos à irradiação / Flávia Cristina Morone Pinto. - 2011.
68 f. : il.

Orientador: Francisco José Barcellos Sampaio.
Tese (Doutorado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Arginina - Teses. 2. Glutamina - Teses. 3. Próstata - Teses. 4. Aparelho geniturinário - Teses. 5. Rato como animal de laboratório - Teses. I. Sampaio, Francisco José Barcellos. II. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

CDU 615.849

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta tese/dissertação, desde que citada a fonte.

Assinatura

Data

Flávia Cristina Morone Pinto

Efeitos da suplementação oral com L-arginina e L-glutamina sobre a próstata ventral de ratos submetidos à irradiação

Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-graduação em Fisiopatologia e Ciências Cirúrgicas. Área de concentração: Sistema Urogenital.

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Francisco José Barcellos Sampaio, MD-Ph.D. (Orientador)
Unidade de Pesquisa Urogenital, Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

Prof. Dr. Waldemar Silva Costa, Ph.D.
Universidade do Estado do Rio de Janeiro, UERJ, Rio de Janeiro/RJ

Prof. Dr. Luiz Eduardo de Macedo Cardoso, MD-Ph.D.
Universidade do Estado do Rio de Janeiro, UERJ, Rio de Janeiro/RJ

Prof. Dr. Salvador Vilar Correia Lima, MD-Ph.D.
Universidade Federal de Pernambuco, Recife/PE

Prof. Dr. Marcio Antonio Babinski, Ph.D.
Universidade Federal Fluminense, UFF, Rio de Janeiro/RJ

Rio de Janeiro

2011

RESUMO

PINTO, Flávia Cristina Morone. *Efeitos da suplementação oral com L-arginina e L-glutamina sobre a próstata ventral de ratos submetidos à irradiação*. 2011. 62 f. Tese (Doutorado em Fisiopatologia e Ciências Cirúrgicas) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2011.

O objetivo deste trabalho foi verificar o possível efeito protetor da L-glutamina e da L-arginina sobre a próstata ventral de ratos quando administradas por gavagem. Procurou-se simular as condições clínicas de pacientes submetidos à radioterapia pélvica tendo como órgão alvo outro órgão pélvico que não a próstata. Foram analisados os efeitos desta irradiação sobre a próstata considerando este órgão como normal. Foram utilizados ratos Wistar divididos em quatro grupos: Controle, animais não submetidos à irradiação (n= 10); Irradiado, submetidos à irradiação abdominal e sem suplementação adicional de aminoácido por 21 dias (n= 10); Irradiado + L-glutamina, submetidos à irradiação abdominal e com suplementação adicional de L- glutamina por 21 dias (n= 10); e Irradiado + L-arginina, submetidos à irradiação abdominal e com suplementação adicional de L- arginina por 21 dias (n= 9). Os grupos foram mantidos em condições padrão de laboratório durante todas as etapas do experimento. Os animais submetidos à irradiação abdominal receberam uma dose única de 1000 cGy no dia 8 da experimentação. A L-glutamina e a L-arginina foram dissolvidas em água destilada e administrada por gavagem através da agulha IC-810®. As próstatas foram removidas e processadas para inclusão em parafina. Foram estudados os seguintes parâmetros: estrutura acinar (área dos ácinos e altura do epitélio) e colágeno analisados por métodos morfométricos e peso corporal. O ganho de peso nos grupos suplementados foi significativamente maior se comparado ao grupo irradiado. Houve redução da altura do epitélio no grupo irradiado quando comparado ao controle. A altura do epitélio no grupo suplementado com L-arginina foi significativamente maior do que nos grupos irradiado e suplementado com L-glutamina. Houve diminuição, de aproximadamente 18%, da área dos ácinos no grupo suplementado com L-glutamina. Já no grupo suplementado com L-arginina o valor foi similar ao do controle. O efeito da L-glutamina sobre o parênquima prostático foi o de manter proporcionalmente o colágeno, preservando a integridade da matriz extracelular. No grupo suplementado com L-arginina, apesar da discreta redução na distribuição proporcional de colágeno este também manteve índices semelhantes ao do controle. A radiação abdominal promoveu algumas modificações estruturais na próstata ventral de ratos. Essas modificações podem ser parcialmente prevenidas pela suplementação oral com L-glutamina e de L-arginina.

Palavras-chave: L-arginina. L-glutamina. Próstata. Sistema Urogenital. Ratos.

ABSTRACT

The aim of this study was to investigate the possible protective effect of L-glutamine and L-arginine on the rat ventral prostate when administered by gavage. We tried to simulate the clinical conditions of patients undergoing pelvic radiotherapy as with other pelvic organ target organ than the prostate. We analyzed the effects of irradiation on prostate considering this organ as normal. Wistar rats were divided into four groups: Control, animals not exposed to irradiation (n= 10); Irradiated, submitted to abdominal irradiation and without additional amino acid supplementation (n= 10); Irradiated + L-glutamine, submitted abdominal irradiation and additional supplementation with L-glutamine for 21 days (n= 10), and Irradiated + L-arginine, underwent abdominal irradiation and additional supplementation with L-arginine for 21 days (n= 9). The groups were kept under standard laboratory conditions during all stages of the experiment. The animals underwent abdominal irradiation received a single dose of 1000 cGy in eight days of trial. L-glutamine and L-arginine were dissolved in distilled water and administered by gavage needle through the IC-810 ®. The prostates were removed and processed for paraffin embedding. We studied the following parameters: acinar structure (area of acini and epithelial height) and collagen analyzed by morphometric methods and body weight. Weight gain in the supplemented groups was significantly higher compared to the irradiated group. There was a reduction in epithelial height in the irradiated group compared to control. The height of the epithelium in the group supplemented with L-arginine was significantly higher than in irradiated and supplemented with L-glutamine. There was a decrease of approximately 18% of the area of the lobes in the group supplemented with L-glutamine. In the group supplemented with L-arginine was similar to the value of control. The effect of L-glutamine on the prostatic parenchyma was to keep the collagen in proportion, preserving the integrity of the extracellular matrix. In the group supplemented with L-arginine, despite a slight reduction in the proportional distribution of this collagen also maintained similar levels to the control. The abdominal radiation caused some structural changes in rat ventral prostate. These modifications can be partially prevented by oral supplementation with L-glutamine and L-arginine.

Keywords: L-arginine. L-glutamine. Prostate. Urogenital System. Rats

LISTA DE FIGURAS E GRÁFICOS

Figura 1 –	Desenho esquemático da próstata do rato Wistar	12
Figura 2 –	Anatomia da próstata	13
Figura 3 –	Técnica de dissecação da próstata do rato	13
Figura 4 –	Microscopia da próstata	14
Figura 5 –	Bioquímica da L-glutamina	15
Figura 6 –	Representação esquemática da biossíntese do óxido nítrico a partir da L-arginina	17
Figura 7 –	Desenho experimental	20
Figura 8 –	Administração da L-arginina e L-glutamina por via oral	22
Figura 9 –	Fotomicrografia dos ácinos da próstata corados com H&E	27
Figura 10 –	Fotomicrografia do epitélio dos ácinos da próstata corados com H&E	28
Figura 11 –	Fotomicrografia dos ácinos da próstata corados com <i>Picro Sirius red</i>	30
Figura 12 –	Fotomicrografia dos ácinos da próstata após histofotometria computadorizada, corados com <i>Picro Sirius red</i>	31
Gráfico 1 –	Área dos ácinos por grupo	26
Gráfico 2 –	Distribuição do colágeno por grupo	29

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Peso Médio dos animais por grupo e ganho de peso após o período experimental	25
Tabela 2 –	Características morfométricas da próstata ventral	32

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA –	Análise de Variância
GC –	Glândula de Coagulação
H&E –	Hematoxilina e Eosina
PD –	Próstata Dorsal
PL –	Próstata Lateral
PV –	Próstata Ventral
NO –	Óxido Nítrico
NOS –	Óxido Nítrico-Sintetase
cNOS –	Óxido Nítrico-Sintetase Constitutivas
eNOS –	Óxido Nítrico-Sintetase Endotelial
iNOS –	Óxido Nítrico-Sintetase Induzidas
nNOS –	Óxido Nítrico-Sintetase Neuronal
ZC –	Zona Central
ZP –	Zona Periférica
ZT –	Zona de Transição

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	11
1	REVISÃO DA LITERATURA	11
1.1	Anatomia da próstata do rato	12
1.2	Aminoácidos associados ao tratamento radioterápico	15
1.2.1	<u>Biossíntese da L-glutamina</u>	15
1.2.2	<u>Biossíntese da L-arginina</u>	16
1.2.2.1	Biossíntese de Óxido Nítrico	17
1.3	Substâncias radioprotetoras	18
2.	MATERIAIS E MÉTODOS	19
2.1	Animais	19
2.2	Radioterapia	21
2.3	Suplementação com aminoácidos	21
2.3.1	<u>Suplementação com L-glutamina</u>	21
2.3.2	<u>Suplementação com L-arginina</u>	22
2.4	Sacrifício	23
2.5	Análise Morfométrica	23
2.6	Estatística	24
3	RESULTADOS	24
3.1	Biometria	24
3.2	Estrutura prostática	25
3.3	Análise do colágeno	28
4	DISCUSSÃO	32
4.1	Biometria	33
4.2	Estrutura prostática	34
4.3	Análise do colágeno	35
5	CONCLUSÃO	36
6	BIBLIOGRAFIA	37

ANEXO 1 – Comitê de ética em pesquisa.....	41
ANEXO 2 – Protocolo para irradiação de ratos Wistar	42
ANEXO 3 – Protocolo para observação de sinais de Toxicidade	44
ANEXO 4 – Protocolo para análise estrutural da próstata de ratos	45
ANEXO 5 – Protocolo para o processamento do material	46
ANEXO 6 – Protocolo para coloração com H&E	47
ANEXO 7 – Protocolo para análise estereológica da próstata de ratos	48
ANEXO 8 – Protocolo para seleção de campos na análise morfométrica	49
ANEXO 9 – Protocolo para análise morfométrica	50
ANEXO 10 – Protocolo para coloração com Picro Sirius red	51
ANEXO 11 – Protocolo para análise da distribuição de colágeno na próstata	52
ANEXO 12 – Protocolo para análise quantitativa de colágeno	54
APÊNDICE 1 – Artigo submetido	55

INTRODUÇÃO

1 REVISÃO DE LITERATURA

A irradiação por ionização permanece como uma das ferramentas mais eficazes no tratamento do câncer, visando a regressão clínica de tumores. Segundo Ross (1999), os mecanismos moleculares são os responsáveis pelas diferenças na radio-sensibilidade celular.

A radiação ionizante quando usada para destruir células tumorais em órgãos pélvicos afeta inevitavelmente células normais e outros órgãos circunvizinhos. Apesar disso a radioterapia pélvica é cada vez mais indicada como coadjuvante no tratamento de neoplasias com resultados cada vez melhores, mas com efeitos colaterais significativos. Como consequência observa-se a crescente incidência de lesões actínicas agudas ou crônicas, retais, vesicais e para outros órgãos pélvicos. A radiação por ionização induz uma série de lesões bioquímicas no DNA, porém a maioria destas lesões é reparada rapidamente por caminhos enzimáticos, consideravelmente preservados (Santos, 2006; Tagkalidis e Tjandra, 2001). Neste sentido, acredita-se que a suplementação com L-glutamina e arginina possa aumentar as chances de reparo das células do epitélio da próstata.

Apesar da L-arginina e da L-glutamina serem produzidas pelo próprio corpo, em situações especiais, como nas infecções e em casos de estresse a suplementação com esses aminoácidos torna-se essencial. Segundo Cukier (2005) a L-glutamina é o principal elemento oxidativo das células epiteliais, constituindo-se em aminoácido oxidável e a L-arginina é precursora de poliaminas e óxido nítrico e está relacionada com a síntese de aminoácidos e seus derivados e interfere diretamente no metabolismo da uréia. Neste sentido, busca-se com este estudo discutir os efeitos da suplementação oral de L-glutamina e de L-arginina sobre a próstata irradiada.

1.1 Anatomia, histologia e imunohistoquímica da próstata de rato

A próstata do rato é dividida em 4 lóbulos, são eles: próstata anterior ou glândula de coagulação (GC), próstata dorsal (PD), lateral (PL) e ventral (PV). As dimensões estão ilustradas na figura abaixo (Figura 1 e 2B).

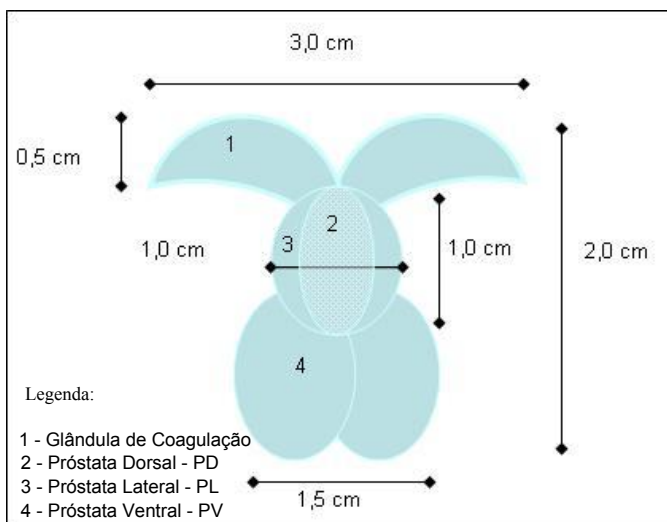


Figura 1: Desenho esquemático da próstata do Rato Wistar adulto.

De acordo com a classificação de McNeal (1978), a próstata do homem pode ser dividida em zonas: zona de transição (ZT), zona central (ZC) e zona periférica (ZP). A concepção anatômica em zonas é a mais utilizada pela importância histopatológica (Figura 2A).

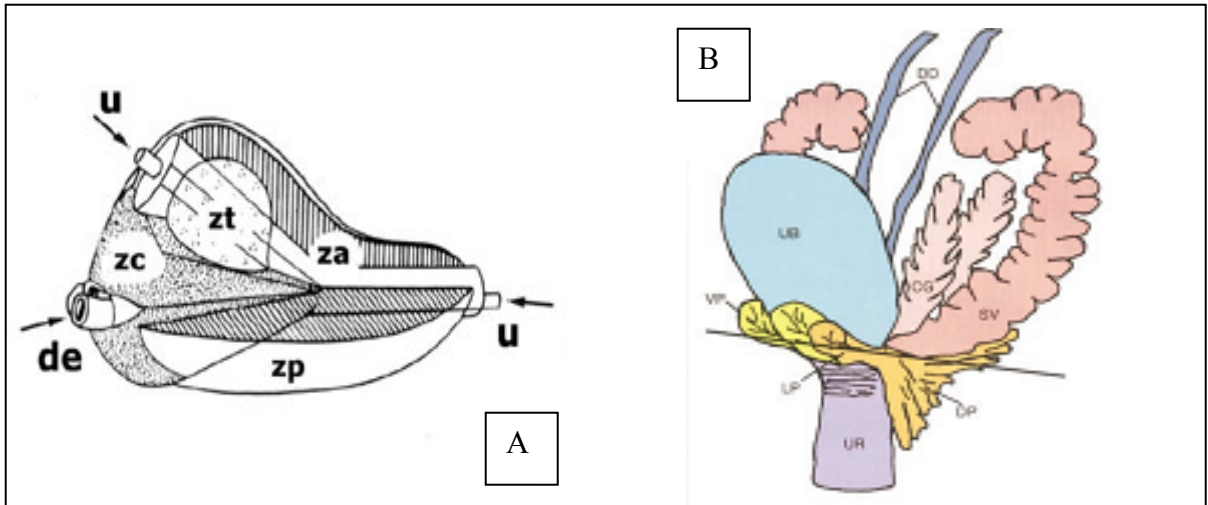


Figura 2. Anatomia da Próstata. *A*, Vista lateral, esquema anatômico da próstata humana de acordo com Mcneal, 1978 (Sampaio, 1992), uretra (U), ducto ejaculador (DE), zona de transição (ZT), zona periférica (ZP) e zona central (ZC). *B*, esquema anatômico da próstata do roedor, próstata anterior (CG), dorsal (DP), lateral (LP) e ventral (VP), de acordo com Shappell *et al.* (2004).

A figura 3 ilustra a próstata do rato após dissecação, onde podem ser evidenciadas também a bexiga e a vesícula seminal.

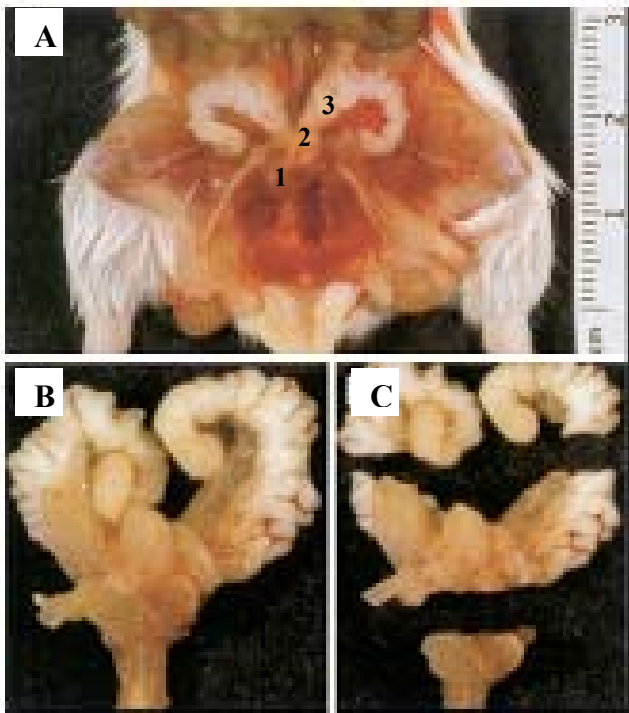


Figura 3. Técnica de dissecação da próstata. *A*, exposição da próstata (1), bexiga (2) e vesícula seminal (3). *B e C*, bloco após dissecação. (Shappell, 2004)

A próstata humana e a do roedor é composta por glândulas constituídas por ácinos e ductos excretores revestidos por células secretoras (Figura 4). As células basais, cuja função se relaciona com a diferenciação mioepitelial, também fazem parte desta arquitetura. Existe ainda uma terceira população de células epiteliais altamente especializadas e conhecidas como as células neuroendócrinas (Shappell, 2004).

O crescimento e fisiologia da próstata são dependentes de andrógenos e sua privação resulta numa regressão acentuada na glândula. Esta redução no tamanho é causada pela perda de células epiteliais por apoptose e uma reorganização proeminente da matriz extracelular. A próstata, tem função secretora e é responsável por produzir 70% do volume seminal. O sêmen produzido ajuda a neutralizar o ambiente ácido da vagina e fornece carboidratos e outros nutrientes para o espermatozoide (Farnsworth, 1999).

O desenvolvimento normal da próstata ventral (PV) do rato passa por três fases distintas: (1) a de crescimento inicial dentro das três primeiras semanas, (2) a de repouso e (3) a de crescimento puberal, sendo esta última coincidente com o surgimento no plasma de testosterona. Assim, o crescimento pós-natal da PV resulta da combinação da proliferação epitelial e/ou diferenciação e síntese e/ou acúmulo de produtos secretórios no lúmen (Vilamaior *et al.*, 2006).

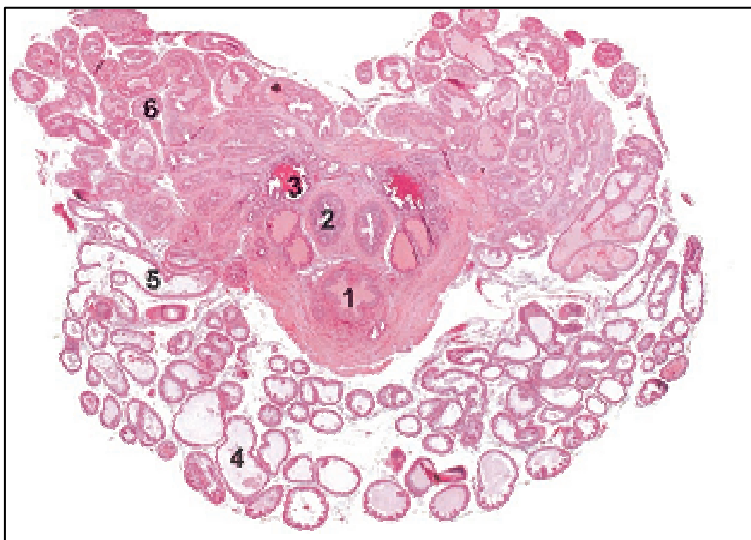


Figura 4. Microscopia da próstata do rato. 1, uretra; 2, dutos deferentes; 3, vaso sanguíneo. 4, próstata ventral; 5 próstata lateral; 6, próstata dorsal (H&E). (Shappell, 2004)

1.2 Aminoácidos associados ao tratamento radioterápico

1.2.1 Biossíntese da L-glutamina

A L-glutamina (Ácido L-2-Aminoglutarâmico, C₅H₁₀N₂O₃), um aminoácido neutro e gliconeogênico, classificado como não-essencial, porém, pode se tornar indispensável em situações catabólicas, como trauma e sepse (Figura 5). Por essa razão, este aminoácido pode ser considerado como condicionalmente essencial (Newsholme, 2001).

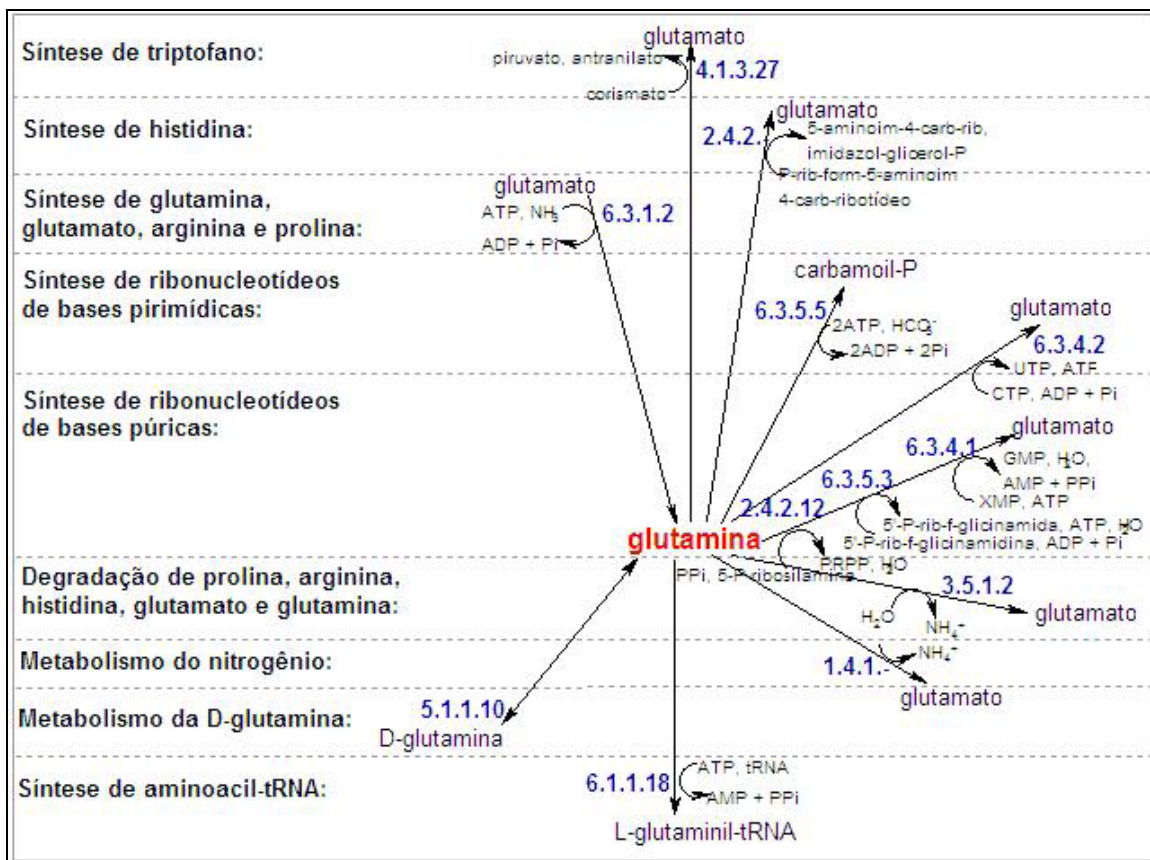


Figura 5. Bioquímica da L-glutamina.

Fonte: www.bioq.unb.br/.../sint_aas_gln_arg_glu_pro.htm

Segundo Kelly e Wischmeyer (2003) os potenciais efeitos benéficos da suplementação com L-glutamina podem ser:

- Aumentar a síntese de glutathione, potencializando as defesas antioxidantes.
- Manter a integridade da mucosa intestinal (fonte energética para enterócitos), evitando a translocação bacteriana.
- Aumentar a síntese de proteínas da resposta inflamatória, atenuando o processo inflamatório.
- Preservar a função imune, servindo de fonte energética para linfócitos e precursores de citocinas.

A glutamina atua ainda como condutora de nitrogênio entre os órgãos, podendo ser precursora de nucleotídeos e glicose. É metabolizada em glutathione, que protege os tecidos normais contra o dano oxidativo (Hall *et al.*, 1996).

Segundo Novak *et al.* (2002), a suplementação com este aminoácido promoveu redução das infecções e do tempo de internação em um grupo de pacientes cirúrgicos, sendo verificada diminuição da mortalidade em pacientes críticos. Diestel *et al.* (2005) sugerem que a suplementação de L-glutamina no período anterior e posterior à irradiação, auxilia na reparação da parede colônica de ratos, favorecendo a sua recuperação no período pós-irradiação.

Acredita-se que os efeitos tóxicos da radioterapia ampliam-se quando os estoques de L-glutamina estão depletados (Lopes-Paulo, 2005). Possivelmente, a deficiência de glutamina pode limitar tanto a produção de proteínas na resposta inflamatória, como a síntese da glutathione, comprometendo as defesas antioxidantes do organismo (Pacífico *et al.*, 2005).

1.2.2 Biossíntese da L-arginina

Apesar da L-arginina ser produzida pelo próprio corpo, em situações especiais, como nas infecções e em casos de estresse a suplementação com esses aminoácidos torna-se essencial. É um aminoácido semi-essencial produzido no organismo, porém em quantidade insuficiente para todas as necessidades. Além do ciclo da uréia, a arginina é utilizada na síntese de creatinina e fornece ornitina para a síntese de poliaminas (Konturek e Konturek, 1995).

Segundo Flora Filho e Zilberstein (2000), como há uma solicitação metabólica continuada da L-arginina, existe uma neo-síntese da L-arginina nos túbulos proximais renais a partir da

citrulina. As proteínas ingeridas são degradadas até arginina, que podem ser diretamente absorvidas e utilizadas no ciclo da uréia no tecido hepático, ou transformadas no epitélio intestinal em ornitina que, juntamente com a glutamina secretada como glutamato, será convertida em citrulina. A citrulina também pode ser convertida diretamente em L-arginina no citoplasma das células endoteliais e dos macrófagos. Ligthart-Melis *et al.* (2008), afirmam ainda que a glutamina é um importante precursor da neo-síntese de L-arginina.

1.2.2.1 Biossíntese de Óxido Nítrico

A síntese do NO resulta da oxidação de um dos dois nitrogênios guanidino da L-arginina, que é convertida em L-citrulina. Algumas isoformas desta mesma enzima (NOS) são conhecidas, sendo elas constitutivas (cNOS) ou induzidas (iNOS). A enzima NO sintetase constitutiva é conhecida como eNOS (NOS endotelial), ao passo que aquela que se encontra presente no sistema nervoso central e periférico é chamada nNOS (NOS neuronal). A NO sintetase induzida pelo estímulo imunológico ou inflamatório é designada como iNOS (NOS induzida) (Dusse, Vieira, Carvalho, 2003).

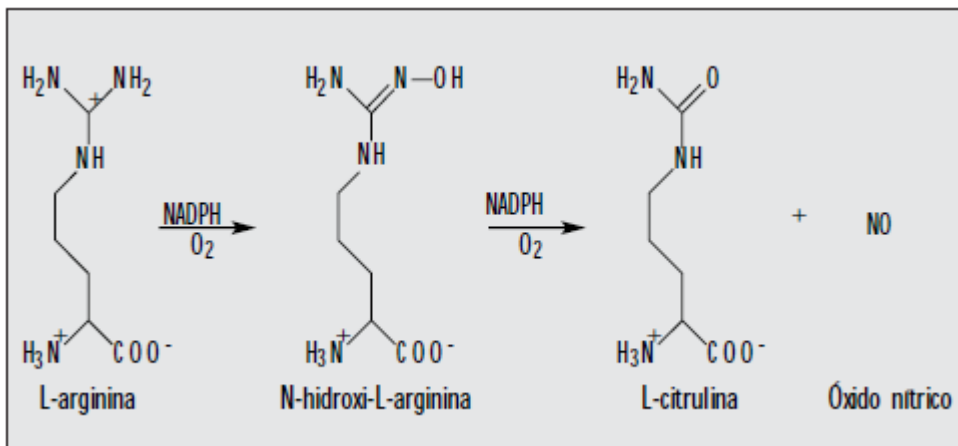


Figura 6. Representação esquemática da biossíntese do óxido nítrico a partir da L-arginina. Fonte: Dusse, Vieira, Carvalho, 2003.

Queiroz e Batista (1999) apresentam, como observado na figura 6, a conversão da L-arginina para L-citrulina e NO, catalisada pela NO sintetase. Há dependência de algumas isoformas da NOS a um cofator, a calmodulina. A eNOS e a nNOS dependem da concentração de cálcio para se ligar a este cofator e serem ativadas. Já iNOS independe da concentração de cálcio e da calmodulina. A forma indutiva produz quantidades maiores de óxido nítrico que as constitutivas.

A citotoxicidade dos macrófagos contra células tumorais depende da presença de L-arginina e sua atividade é acompanhada pela formação de nitrito e citrulina (Queiroz e Batista, 1999).

O NO derivado das células endoteliais (eNOS) é atualmente considerado essencial para a homeostase vascular e tem sido o alvo para a prevenção de doenças cardiovasculares. O NO é o principal mediador citotóxico de células imunes efetoras ativadas e constitui a mais importante molécula reguladora do sistema imune. Tem um papel como mensageiro/modulador em diversos processos biológicos essenciais. No entanto o NO é potencialmente tóxico. A toxicidade se faz presente, particularmente, em situações de estresse oxidativo, geração de intermediários do oxigênio e deficiência do sistema antioxidante (Dusse, Vieira, Carvalho, 2003).

1.3 Substâncias radioprotetoras

Nos últimos anos, diversos agentes citoprotetores foram desenvolvidos para proteger células normais da ação tóxica da quimioterapia e radioterapia antineoplásica. Do ponto de vista teórico, o agente citoprotetor ideal seria aquele capaz de manter a intensidade relativa de dose quimioterápica ou radioterápica, proteger um maior espectro de órgãos e tecidos do mais amplo número de agentes quimioterápicos, preservar a ação antitumoral, ter a menor toxicidade intrínseca e proteger de radicais livres (Souza *et al.*, 2000).

Partindo deste princípio pode-se acreditar que tanto a L-arginina como a L-glutamina, por apresentarem mecanismos próprios para inativação de radicais livres produzidos pela irradiação, seriam potenciais substâncias radioprotetoras, objeto de estudo nesta pesquisa e em outras realizadas na Unidade de Pesquisa Urogenital/UERJ. A questão norteadora para esta pesquisa foi:

Em pacientes com câncer em algum órgão pélvico que não seja a próstata e que fazem radioterapia o uso de alguns aminoácidos, como L-arginina e L-glutamina podem ter um efeito radioprotetor?.

O presente trabalho teve como objetivo verificar o possível efeito protetor da L-glutamina e da L-arginina, quando administradas por gavagem, sobre a próstata ventral de ratos, simulando as condições clínicas de pacientes submetidos à radioterapia pélvica tendo como órgão alvo outro órgão pélvico que não a próstata e analisar os efeitos desta irradiação sobre a próstata considerando este órgão como normal.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

O estudo foi aprovado pela Comissão Ética em Experimentação Animal do Centro de Ciências Biológicas da Universidade do Estado do Rio de Janeiro, protocolo número CEA/224/2008 (Anexo 1), e seguindo as recomendações do guia convencional para experimentação com animais (*Guide for the care and use of laboratory animals*, 1996).

2.1 Animais

Foram utilizados ratos Wistar albinos machos com 90 dias de idade e peso corporal de aproximadamente 350g.

Neste estudo foi realizada a radioterapia abdominal, com os animais na posição dorsal (Ersin *et al.*, 2000; Erbil *et al.*, 2005; Diestel *et al.*, 2005). O órgão-alvo foi próstata. Mesmo sendo realizada a radioterapia abdominal, o campo de exposição calculado e a distancia fonte-pele permitiram atingir a região pélvica, onde este órgão está situado.

Os animais de todos os grupos foram pesados diariamente. Para calcular o ganho ponderal de peso, subtraiu-se o peso médio no final do tratamento (22º dia) pelo peso médio no início do

experimento. E para calcular o peso médio foi realizada a média de todos os pesos de todos os dias de experimento.

Os animais foram divididos em quatro grupos:

- Controle - animais não submetidos à irradiação (n= 10);
- Irradiado, submetidos à irradiação abdominal e sem suplementação adicional de aminoácido por 21 dias (n= 10);
- Irradiado + L-glutamina, submetidos à irradiação abdominal e com suplementação adicional de L- glutamina por 21 dias (n= 10); e
- Irradiado + L-arginina, submetidos à irradiação abdominal e com suplementação adicional de L- arginina por 21 dias (n= 9).

A figura abaixo ilustra o plano experimental adotado neste estudo.

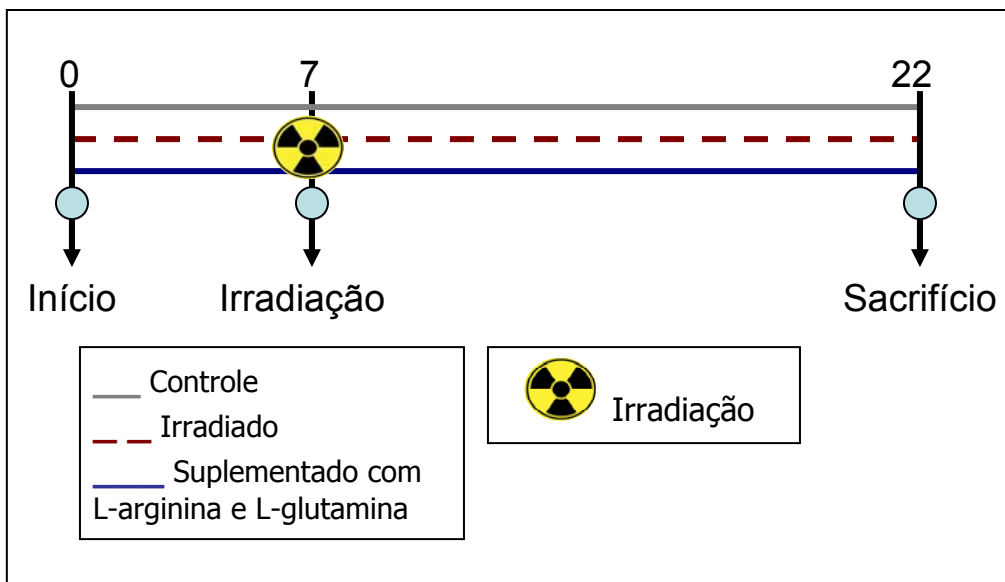


Figura 7. Plano Experimental.

2.2 Radioterapia

Os grupos foram mantidos em condição padrão de laboratório durante todas as etapas do experimento. Os animais submetidos a irradiação abdominal receberam uma dose única de 1000 cGy no dia 8 da experimentação. Os grupos suplementados receberam L-glutamina e L-arginina por 21 dias de experimento, conforme protocolo descrito a seguir. A irradiação foi realizada no Setor de Radioterapia do Centro Universitário de Controle do Câncer – CUCC/UERJ (Anexo 2).

Para irradiação os animais foram preparados da seguinte forma (Anexo 2):

- Foram alojados em frascos de contenção individual, de modo que ficassem imobilizados;
- A carga de irradiação seguiu protocolo prévio;
- Os animais foram agrupados no campo e irradiados.

2.3 Suplementação com aminoácidos

2.3.1 Suplementação com L-glutamina

A L-glutamina foi dissolvida em água destilada e administrada por gavagem com o auxílio da agulha IC-810® (Figura 8). Foi usada na dosagem de 0,2g/ dia de tratamento, conforme protocolo usado por Diestel *et al.* (2005). A via oral foi a escolhida, pois após a irradiação o consumo de L-glutamina pelas células intestinais aumenta e dessa forma os níveis séricos deste aminoácido quando produzidos pelo próprio organismo serão maiores e a disponibilidade também será maior (Souba *et al.*, 1990).

2.3.2 Suplementação com L-arginina

A L-arginina (Sigma-Aldrich®) foi dissolvida em água destilada e administrada por gavagem através da agulha IC-810® (Figura 8). Foi usada a concentração de 0,65g/kg de peso corporal e dose de 0,2g/ dia de tratamento. Este protocolo foi definido a partir dos diversos estudos encontrados na literatura (Yanni *et al.*, 2008; Moura *et al.*, 2006; Seçilmi *et al.*, 2005; Hwang *et al.*, 2003).

Durante todas as etapas do experimento os animais foram pesados e os sinais de toxicidade foram observados (piloereção, vocalização, hiperatividade, cromodacriorréia, epistaxe, hipoatividade, queda de pelos, dentre outros). O anexo 3 apresenta o protocolo que foi usado para o controle dos sinais de toxicidade.

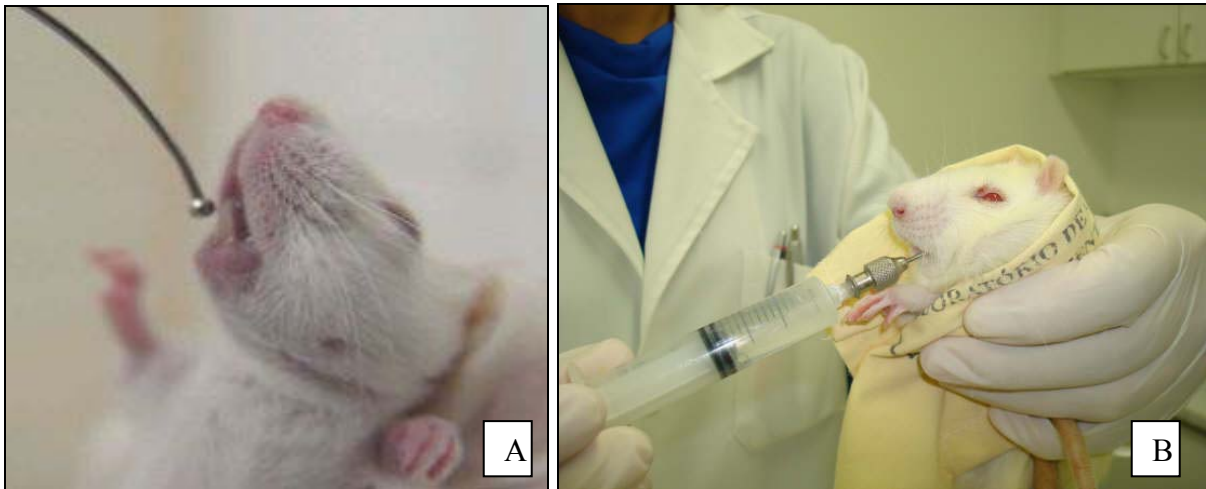


Figura 8. Administração de L-glutamina e L-arginina por via oral. *A*, gavagem com agulha IC-810® (Agulha de aço inox BD-12®, Cânula diâmetro 1,2mm com esfera de 2,3mm, Raio de 40mm, Comprimento de 54mm); *B*, suplementação com aminoácido por via oral.

2.4 Sacrifício

Os animais do controle e todos os animais dos grupos irradiado e irradiado com suplementação foram mortos no 22º dia.

Antes de serem mortos os animais foram anestesiados com uma injeção intraperitoneal de tiopental sódico (Thiopentax®, 50 mg/kg), submetidos a tricotomia abdominal, anti-sepsia com colocação de campos cirúrgicos, seguido por laparotomia. A próstata ventral foi dissecada e separada dos demais lóbulos (glândula de coagulação, lóbulo dorsal e lateral), analisada macroscopicamente (Anexo 4), pesada e fixada em formalina tamponada.

2.5 Análise Morfométrica

Para análise da área e altura do epitélio a próstata ventral foi processada (Anexo 5) e corada em H&E (Anexo 6). Para todas as análises, foram usados cortes, com cinco µm de espessura, para observação das estruturas acinares da próstata, para área dos ácinos foi utilizado o aumento de 200x e para análise da altura do epitélio foi utilizado o aumento de 1000X. Os cortes histológicos foram analisados em microscópio óptico (BX51 - Olympus®), com câmera acoplada (DP70 - Olympus®) ligada ao monitor. A análise morfométrica foi realizada em campos aleatórios (Anexos 7 e 8). Foi utilizado o programa Image J® (*Image Processing and Analysis in Java*) para análise das imagens captadas.

Para análise morfométrica (densidade de área) do colágeno foram usados cortes, também com 5 µm cada, corados com Picro Sirius Red sem polarização (Anexo 10) (Montes e Junqueira, 1991). As imagens foram capturadas pelo Image pró-express® em aumento de 400X e processadas pelo Adobe Photoshop 6.0®, a fim de preservar nas imagens apenas a substância interacinar. Em seguida, as imagens foram enviadas para o programa Image Pró-plus 4.5®, onde foi realizada a máscara que oferecia a área e a porcentagem de colágeno. Foi usada a técnica da Histofotometria Computadorizada (Oberholzer et al., 1996; Novelli, 1992), descrita no anexo 11.

2.6 Estatística

A análise estatística foi conduzida da seguinte forma: análise de variância (ANOVA) foi usada para tratamento dos dados que se ajustava a uma curva normal, seguido do teste *T* de *Student*. O teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de Mann-Whitney foi usado para análise de dados não paramétricos. Para a análise de proporções e percentagens, foi usado o teste de Qui-quadrado.

Em todos os casos as diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$. Os cálculos estatísticos foram realizados por meio dos programas MINITAB® (MTB, *University of Pennsylvania*, 1984) e GraphPad Prism® (Prism 5 for Windows, version 5.00, march, 2007. GraphPad software, *Inc.*).

Os valores são expressos como média, desvio padrão e porcentagens. As diferenças são indicadas como se segue: a ≠ controle, b ≠ irradiado, c ≠ irradiado com suplementação.

3 RESULTADOS

3.1 Biometria

Nos animais suplementados com L-glutamina a média de peso foi maior tanto em relação ao controle como em relação ao grupo irradiado, porém o ganho de peso foi menor (14,1g) do que no controle (20,8g). Já no grupo suplementado com L-arginina o peso médio dos animais foi similar ao do controle, mas o ganho de peso (27,7g) foi superior ao de todos os grupos e significativamente maior do que o do irradiado e do suplementado com L-glutamina. O grupo irradiado foi o que apresentou menor ganho de peso (3,1g). A tabela 1 apresenta a média de peso entre os grupos e o ganho ponderal de peso ao final do experimento.

Tabela 1. Peso Médio dos animais por grupo e ganho de peso após o período experimental.

Grupos	Controle	Irradiado	Irradiado + L-glutamina	Irradiado + L-arginina
Peso Médio (g)	304,56±18,64	315,00±20,05 ^a	317,79±2,78 ^{a,b}	306,66±32,01 ^{b,c}
Ganho Ponderal de Peso (g)	20,8	3,1 ^{a,b,c}	14,1 ^b	27,7 ^{b,c}

Os valores relacionados ao peso são Média±Desvio Padrão. Os valores relativos ao peso médio foram analisados pelo teste de Kruskal Wallis seguido do teste *U* de Mann-Whitney. Para todas as análises a diferença foi considerada como estatisticamente significativa quando $p \leq 0,05$. As diferenças são indicadas como se segue: **a** ≠ controle, **b** ≠ irradiado, **c** ≠ irradiado com suplementação.

3.2 Estrutura Prostática

A área dos ácinos no grupo irradiado foi similar a do controle ($p= 0,9715$). O grupo que recebeu a suplementação com L-glutamina foi estatisticamente diferente quando comparado ao controle ($p= 0,0387$), ao irradiado ($p= 0,0015$) e ao suplementado com L-arginina ($p= 0,0391$). No grupo que recebeu L-arginina a área dos ácinos foi discretamente menor que a do controle e a do grupo irradiado ($p= 0,5648$ e $p= 0,3470$, respectivamente).

A figura 9 ilustra a estrutura acinar da próstata ventral do rato Wistar nos grupos controle, irradiado e suplementados.

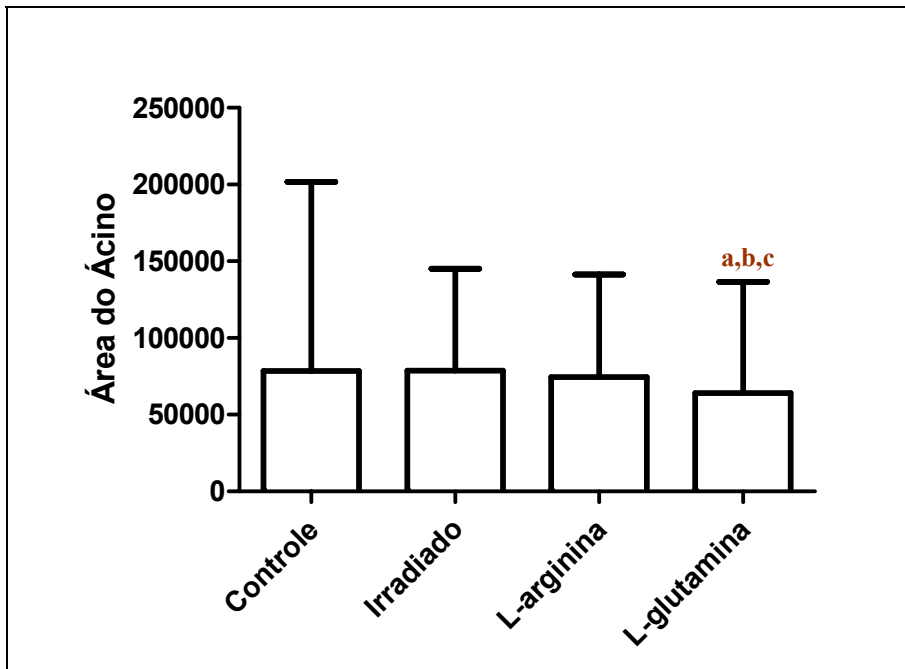


Gráfico 1. Área dos ácinos por grupo em μm^2 .

a ≠ controle, **b** ≠ irradiado, **c** ≠ irradiado com suplementação.

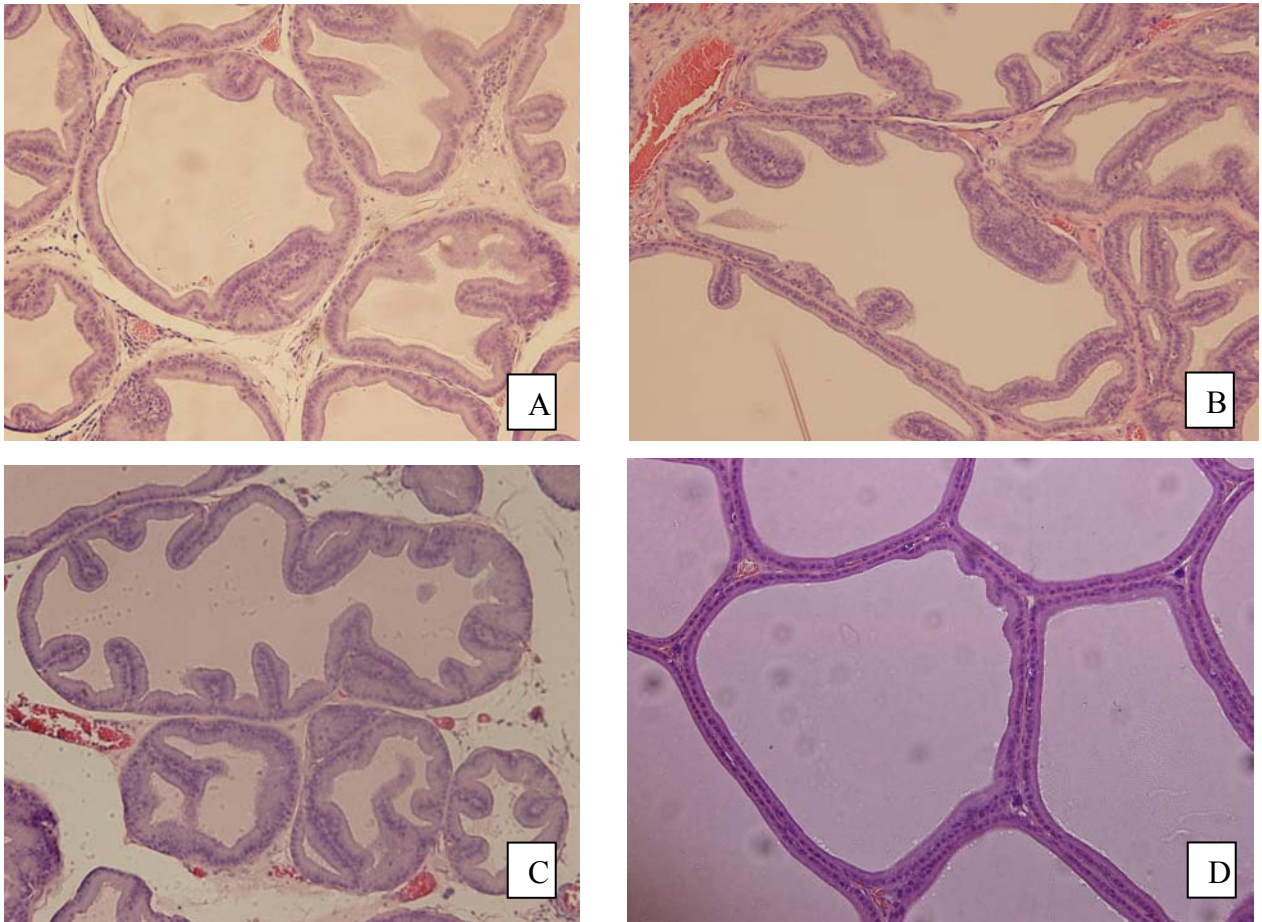


Figura 9. Fotomicrografia dos ácinos da próstata corados com H&E. Controle (A), Irradiado (B), Irradiado com suplementação de L-glutamina (C) e Irradiado com suplementação de L-arginina (D). [H&E – 200X]

Houve redução significativa da altura do epitélio no grupo irradiado quando comparado ao controle ($p < 0,0001$). A altura do epitélio no grupo irradiado com suplementação de L-arginina ($19,76\mu\text{m}$) foi significativamente maior do que no irradiado ($11,59\mu\text{m}$) e no suplementado com L-glutamina ($13,14\mu\text{m}$), $p < 0,0001$. Não houve diferenças entre o controle e o grupo suplementado L-arginina (Tabela 2). Não houve diferenças significativas entre o grupo suplementado com L-glutamina e o controle, como também não houve diferença com o grupo irradiado. O epitélio dos acinos pode ser visualizado na figura 10.

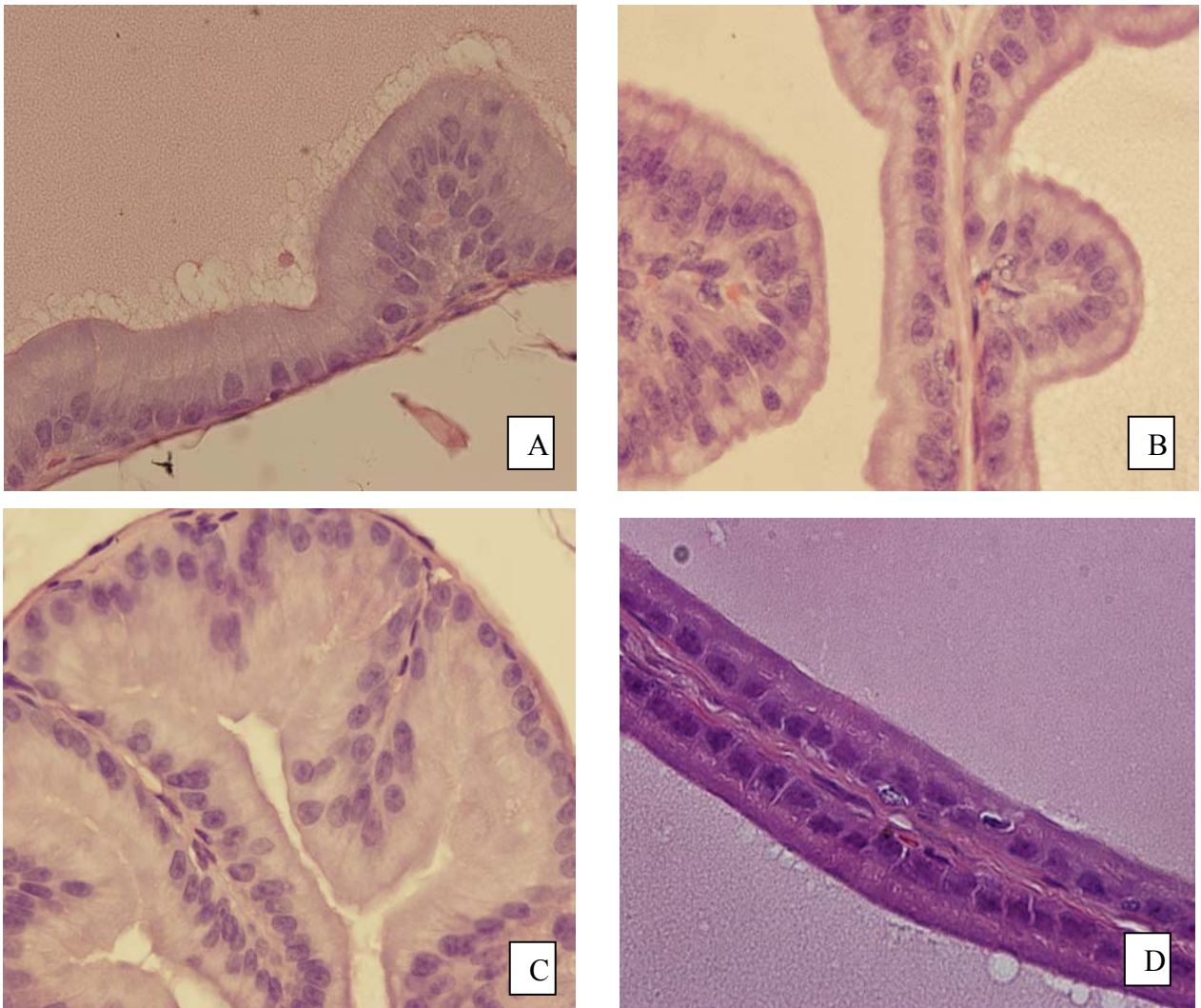


Figura 10. Fotomicrografia do epitélio dos ácinos da próstata corados com H&E. Controle (A), Irradiado (B), Irradiado com suplementação de L-glutamina (C) e Irradiado com suplementação de L-arginina (D). [H&E – 1000X]

3.3 Análise do colágeno

A distribuição de colágeno por área aumentou significativamente no grupo suplementado com L-glutamina quando comparado ao irradiado ($p= 0,0406$). Com relação ao controle, o grupo suplementado com L-glutamina apresentou valores similares ($p= 0,3789$).

O grupo suplementado com L-arginina não foi diferente do grupo irradiado ($p= 0,8674$) e também apresentou valores similares ao do controle ($p= 0,1237$).

Entre os grupos suplementados com L-glutamina e L-arginina houve diferença significativa ($p= 0,0273$).

O grupo irradiado não foi diferente do controle ($p= 0,1684$).

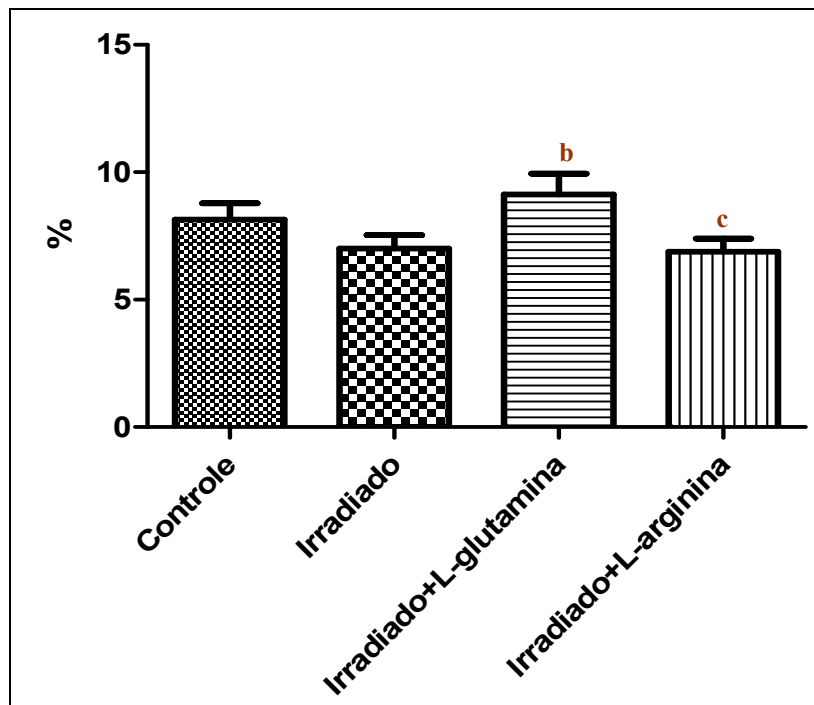


Gráfico 2. Distribuição de colágeno por grupo.

a ≠ controle, **b** ≠ irradiado, **c** ≠ irradiado com suplementação.

A figura 11 apresenta a próstata corada pelo *Picro Sirius red* (A1, B1, C1 e D1) e a figura 12 ilustra o processamento no Adobe Photoshop 6.0® (A2, B2, C2 e D2).

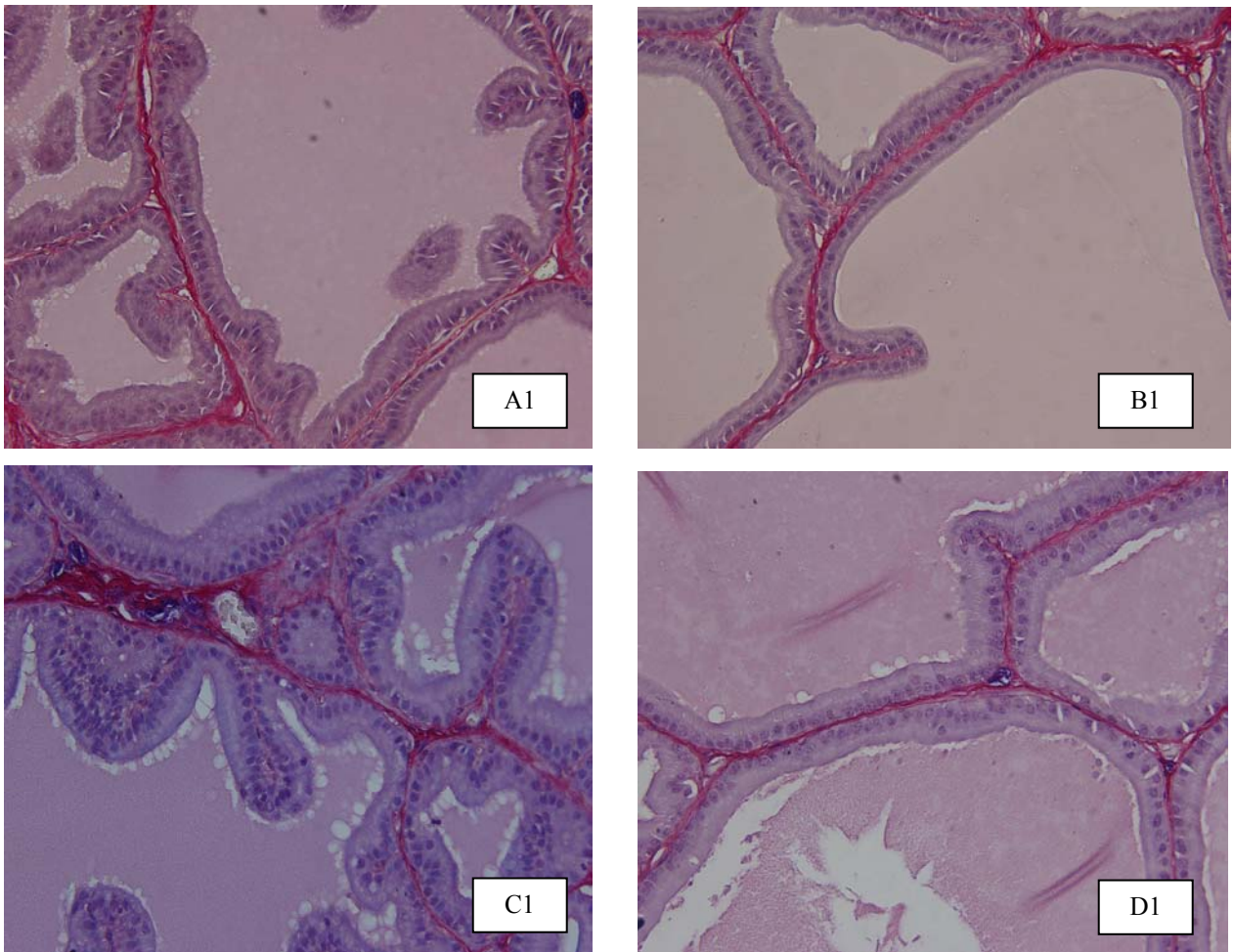


Figura 11. Fotomicrografia dos ácinos da próstata corados com Picro Sirius red. Controle (*A1*), Irradiado (*B1*) e Irradiado com suplementação de L-glutamina (*C1*) e Irradiado com suplementação de L-arginina (*D1*). [Picro Sirius Red – 400X]

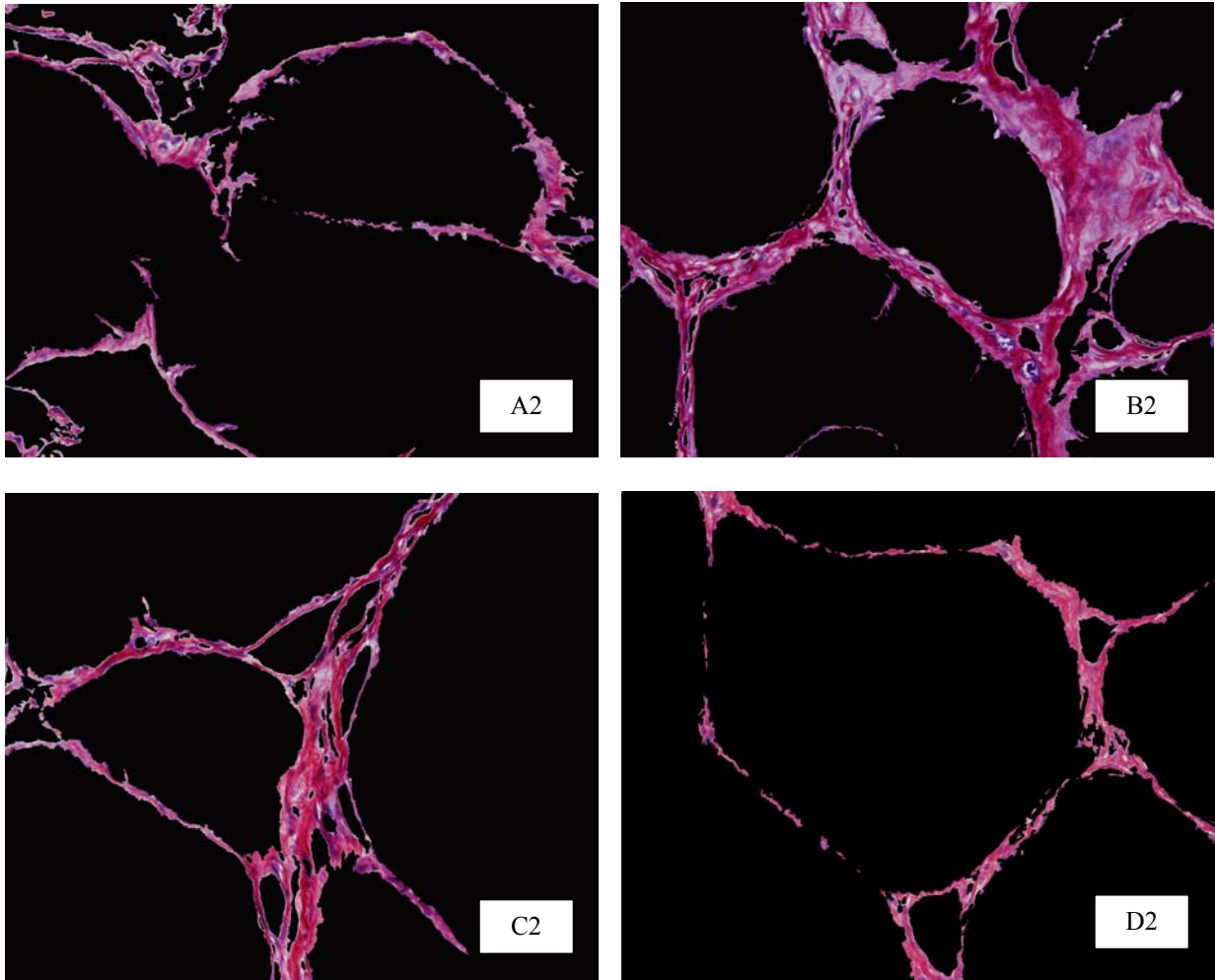


Figura 12. Fotomicrografia dos ácinos da próstata após histofotometria computadorizada, corados com Picro Sirius red. Controle (*A2*), Irradiado (*B2*) e Irradiado com suplementação de L-glutamina (*C2*) e Irradiado com suplementação de L-arginina (*D2*). [Picro Sirius Red – 400X]

Tabela 2. Características Morfométricas da Próstata Ventral

Grupos	Área dos Ácinos (μm^2)	Altura do Epitélio (μm)	Distribuição do Colágeno (%)
Controle	78.374,2	18,31 \pm 2,0	8,14 \pm 4.2
Irradiado	78.588,0	11,59 \pm 0.8 ^a	7,00 \pm 3.8
Irradiado + L-glutamina	64.122,1 ^{a,b,c}	13,14 \pm 1,4	9.13 \pm 3.4 ^b
Irradiado + L-arginina	74.414,4	19,76 \pm 5,6 ^{b,c}	6,88 \pm 3,72 ^c

Os dados representados são média \pm DP e valores percentuais (%). Para os valores percentuais foi aplicado o *Chi-square*. Foi realizada ANOVA seguida do “*T test Student unpaired*” para as análises da área do ácino e altura do epitélio. Em todas as análises, a diferença foi considerada como estatisticamente significativa quando $p < 0,05$. **a** \neq controle, **b** \neq irradiado, **c** \neq irradiado com suplementação.

4 DISCUSSÃO

A irradiação pélvica produz efeitos colaterais nocivos dentre eles incidência de lesões actínicas agudas ou crônicas para outros órgãos pélvicos além do órgão alvo. A ação deletéria da irradiação tem início imediatamente após a exposição do tecido, porém as manifestações histológicas podem aparecer somente semanas ou meses após irradiação (Tubiana, 2009; Stone *et al.*, 2003; Tagkalidis e Tjandra, 2001).

Considerando o tempo de resposta da próstata a estas lesões radioinduzidas determinou-se o período de 21 dias após a radioterapia para avaliação do tecido, visto ser o metabolismo tecidual do rato mais rápido do que o do homem, permitindo assim uma avaliação comparativa das lesões. Desta forma foi possível avaliar e fornecer informações importantes sobre a relação entre a dose e o efeito da radioterapia, assim como o efeito radioprotetor da suplementação com L-glutamina e L-arginina.

Souba *et al.* (1990) estudaram as conseqüências no organismo da depleção de L-glutamina. Estudos anteriores em ratos (Lopes-Paulo, 2005; Souba *et al.*, 1990; Souba, Smith e Wilmore, 1985) mostraram que a L-glutamina além de estimular a síntese da arginina auxilia na reparação da parede colônica atuando em outros tecidos e órgãos favorecendo a sua recuperação

no período pós-irradiação. No entanto, são escassas ou inexistentes as informações sobre os efeitos da L-glutamina e da L-arginina na preservação e manutenção da integridade do sistema urogenital, em particular na próstata. Procurou-se então estabelecer através de dados quantitativos precisos os possíveis benefícios da suplementação com L-glutamina e L-arginina sobre a próstata de ratos irradiados.

A escolha do lobo ventral da próstata para ser analisado se deve ao fato de que a maioria dos autores está de acordo que este é o que mais se assemelha histologicamente e funcionalmente a próstata humana (Justulin Jr *et al.*, 2010; Shappell *et al.*, 2004).

4.1 Biometria

Dietas especiais não evitam a enterite actínica, mas facilitam a recuperação da mucosa. Lopes-Paulo (2005) mostrou que a suplementação de L-glutamina em ratos no período anterior e posterior à irradiação, auxiliou a reparação da parede colônica. Hwang *et al.* (2003) sugerem que dietas enriquecidas com L-arginina tem efeito protetor sobre a mucosa intestinal após a irradiação, acelerando a cicatrização e prevenindo a translocação bacteriana, bem como a perda de peso. Os resultados encontrados neste estudo indicam também uma tendência positiva de resposta. O ganho de peso nos grupos suplementados foi significativamente maior se comparado ao grupo irradiado. Merece destaque o ganho de peso corporal no grupo suplementado com L-arginina. Estes dados estão de acordo com o estudo de Hwang *et al.* (2003), onde não houve perda de peso corporal com a administração oral de L-arginina. A L-glutamina e a L-arginina são aminoácidos não-essenciais, com importantes efeitos metabólicos e imunológicos, particularmente em situações de trauma e condições de estresse. A suplementação da dieta com estes aminoácidos tem sido demonstrada por melhorar o metabolismo e aumentar a imunidade mediada por células e a sobrevivência após a queimadura em cobaias (Saito *et al.*, 1987). Acredita-se que a recuperação do peso após a suplementação com L-glutamina e L-arginina possa ser atribuída a estes efeitos metabólicos e imunológicos, considerando que a irradiação provoca uma condição de estresse orgânico.

4.2 Estrutura Prostática

A produção de radicais livres constitui um dos fatores decorrentes da interação da radiação com a matéria atuando sobre as estruturas celulares (Tuji, 2005; Borek, 1993). Os efeitos imediatos da radiação são observados nos tecidos que apresentam maior capacidade proliferativa provocando danos vasculares, hipóxia e hipocelularidade (Stone *et al.*, 2003). A observação do epitélio acinar mostrou que com relação à altura do epitélio a radiação provocou uma alteração significativa com uma diminuição de aproximadamente 36% em relação ao controle, caracterizando o efeito da irradiação sobre o epitélio. O estudo de Terracio e Douglas (1982) sobre o crescimento celular da próstata ventral de ratos em culturas primárias revelou que em culturas suplementadas com L-glutamina houve um discreto aumento no crescimento das células epiteliais. Aparentemente a L-glutamina atua de forma discreta em relação às células epiteliais promovendo uma relativa proteção. Como não houve diferença estatística entre o controle e o grupo suplementado com L-glutamina podemos supor que este aminoácido atuou na conservação do epitélio.

Com a suplementação de L-arginina houve regeneração do epitélio acinar comprovada pela diferença estatística entre este grupo e o irradiado, assim como entre ele e o controle. Segundo Cukier (2005) a L-arginina é o principal combustível oxidativo das células epiteliais, constituindo-se em aminoácido oxidável e precursor de poliaminas e óxido nítrico, além de estar relacionado com o metabolismo da uréia.

Com relação aos ácinos o parâmetro analisado foi a área ocupada por eles. A irradiação parece não exercer nenhuma ação no sentido de modificar o tamanho de modo significativo. A L-glutamina foi identificada como o aminoácido mais abundante no músculo e capaz de auxiliar o processo de regeneração da fibra muscular. Isto sugere que a suplementação com este aminoácido pode ajudar em estados crônicos desenvolvidos diante de patologias e/ou lesão tecidual (Bassit *et al.*, 2000). Ainda em relação a célula muscular, a L-glutamina atua fazendo o transporte do nitrogênio para a formação de grande parte dos aminoácidos corporais. Portanto, a L-glutamina atua na síntese de proteína e na construção de tecido muscular (Rennie *et al.*, 1994). Essas características parecem explicar a diminuição, de aproximadamente 18% da área dos ácinos no

grupo suplementado com L-glutamina e que pode estar associada a ação deste aminoácido com os componentes da matriz extracelular da próstata, em especial a uma ação direta sobre as fibras musculares lisas. Tal fato aumentaria a densidade do músculo presente na matriz haveria reorganização do parênquima com conseqüente redução do tamanho dos ácinos.

Já no grupo suplementado com L-arginina possivelmente não houve uma ação sobre os componentes da matriz extracelular uma vez que os valores relativos a área dos ácinos são semelhantes ao do grupo controle.

4.3 Análise do colágeno

Stone *et al.* (2003) mostraram que a resposta dos tecidos à irradiação pode estar relacionada à capacidade da célula de reparar ou não as lesões radioinduzidas. A suplementação com L-glutamina pode estar envolvida no processo de remodelação da matriz extracelular influenciando no aumento da síntese de colágeno a partir dos fibroblastos, miofibroblastos e células musculares, que quando ativado servem como produtores primários de colágeno.

O efeito da L-glutamina sobre o parênquima prostático foi o de manter proporcionalmente o colágeno, preservando a integridade da matriz extracelular.

Em relação a L-arginina o efeito parece ser semelhante ao da L-glutamina uma vez que no grupo suplementado com L-arginina apesar da redução na distribuição proporcional de colágeno, também manteve índices semelhantes ao do controle.

5 CONCLUSÃO

A radiação abdominal promoveu algumas modificações estruturais na próstata ventral de ratos. Essas modificações foram parcialmente prevenidas pela suplementação oral com L-glutamina e de L-arginina, caracterizando o efeito destes aminoácidos sobre o estroma prostático e apresentando-se como uma tentativa para compensar possíveis danos que seriam provocados pela irradiação.

BIBLIOGRAFIA

- BASSIT, R.A.; SAWADA, L.A.; BACURAU, R.F.; NAVARRO, F.; COSTA ROSA, L.F. The effect of BCAA supplementation upon the immune response of triathletes. **Med. Sci. Sports Exerc.**, 32 (7): 12-14, 2000.
- BILLIS, A. Patologia Cirurgica da Prostata. Campinas: IDB, 2003. 252p
- BOREK, C. Molecular Mechanisms in Cancer Induction and Prevention. **Env Health Perspect Suppl.**, v.101, p.237-245, 1993.
- CUKIER, R.I. A molecular dynamics study of water chain formation in the próton-conducting K channel of cytochrome c oxidase. **Biochim Biophys Acta**, jan 7: 1706 (1-2): 134-46, 2005.
- DIESTEL, C.F.; LOPES-PAULO, F.; MARQUES, R.G.; HORST, N.L.; CAETANO, C.E.R. Efeito da suplementação oral de L-glutamina na parede colônica de ratos submetidos à irradiação abdominal **Acta Cir. Bras.**, vol.20 suppl.1, 2005.
- DUSSE, L.M.S; VIEIRA, L.M; CARVALHO, M. das G. Revisão sobre óxido nítrico. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial.**, Rio de Janeiro, v. 39, n. 4, p. 343-350, 2003.
- ERBIL, Y.; ÖZTEZCAN, S.; GIRIS, M.; BARBAROS, U.; OLGAC, V.; BILGE, H.; KUCUCUK, H.; TOKER, G. The effect of glutamine on radiation-induced organ damage. **Life Sci.** 78:376–382, 2005.
- ERSIN, S.; TUNCYUREK, P.; ESASSOLAK, M.; ALKANAT, M.; BUKE, C.; YILMAZ, M.; TELEFONCU, A.; KOSE, T. The prophylactic and therapeutic effects of glutamine and arginine enriched diets on radiation-induced enteritis in rats. **J Surg Res.**, 89:121–125, 2000.
- FARNSWORTH, W.E. Prostate stroma: physiology. **Prostate.**, 38:60-72, 1999.
- FLORA FILHO, R. e ZILBERSTEIN, B. Óxido Nítrico: o simples mensageiro percorrendo a complexidade. Metabolismo, síntese e funções. **Rev. Ass. Méd. Brasil.**, 46(3): 265-71, 2000.
- Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. Institute of Laboratory Animal Resources. Commission on Life Sciences. National Research Council. National Academy Press, Washington, D.C. 1996. Disponível em: http://www.nap.edu/openbook.php?record_id=5140
- HALL, J.C.; HEEL, K.; MCCAULEY, R. Glutamine. **Br J Surg.**, 83(3):305-12, 1996.
- HWANG, J-M.; CHAN, DE-C.; CHANG, T-M.; TSAO, T-YI.; TSOU, S-S.; LU, R-H.; TSAI, L-M. Effects of Oral Arginine and Glutamine on Radiation-Induced Injury in the Rat. **Journal of Surgical Research.**, 109: 149–154, 2003.

JUSTULIN Jr., L.A.; ACQUARO, C.; CARVALHO, R.F.; SILVA, M.D.; FELISBINO, S.L. Combined effect of the finasteride and doxazosin on rat ventral prostate morphology and physiology. **Int J Androl.**, 1;33(3):489-99, 2010.

KELLY, D.; WISCHMEYER, P.E. Role of L-glutamine in critical illness: new insights. **Curr Opin Clin Nutr Metab Care.**, 6(2):217-22, 2003.

KONTUREK, S.K. e KONTUREK, P.C. Role of nitric oxid in the digestive system. **Digestion** 56:1-13, 1995.

LIGTHART-MELIS, G.C.; van de POLL, M.C.; BOELENS, P.G.; DEJONG, C.H.; DEUTZ, N.E.; van LEEUWEN, P.A. Glutamine is a important precursor for de novo synthesis of arginine in humans. **Am J Clin Nutr.**, May; 87(5): 1282-9, 2008.

LOPES-PAULO, F. Efeitos da glutamina sobre a parede intestinal e sua aplicabilidade potencial em coloproctologia. **Rev. bras Coloproct.**, 25(1):75-78, 2005.

McNEAL, J. E. The prostate and prostatic urethra: A morphology synthesis. **J. Urol.**, 107:1008, 1972.

MONTES, G.S.; JUNQUEIRA, L.C. The use of the Picrosirius-polarization method for the study of the biopathology of collagen. **Mem Inst Oswaldo Cruz.**; 86 Suppl 3:1-11, 1991.

MOURA, J.R.S.A. de; SASS, N.; GUIMARÃES, S.B.; VASCONCELOS, P.R.L. de; MATTAR, R.; KULAV Jr, L. Effects of L-arginine oral supplements in pregnant spontaneously hypertensive rats. **Acta Cirúrgica Brasileira.**, Vol 21 (4), 2006.

NEWSHOLME, P. Why is L-glutamine metabolism important to cells of immune system in healthy, postinjury, surgery or infection? **J Nutr.**, 131(Suppl): 2515S-22S, 2001.

NOVAK, F.; HEYLAND, D.K.; AVENELL, A.; DROVER, J.W.; SU, X. Glutamine supplementation in serious illness: a systematic review of the evidence. **Crit Care Med.**, 30(9):2022-9, 2002.

NOVELLI, M.D. Introdução de uma nova metodologia para análise morfométrica através do processamento de imagens por computadores, com aplicação no ensino e na pesquisa [Tese - Doutorado]. Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 1992.

OBERHOLZER, M.; ÖSTREICHER, M.; CHRISTEN, H.; BRÜHLMANN, M. Methods in quantitative image analysis. **Histochem Cell Biol.**, 105:333-55, 1996.

PACÍFICO, S.L.; LEITE, H.P.; CARVALHO, W.B de. A suplementação de glutamina é benéfica em crianças com doenças graves? **Rev. Nutr.**, Campinas, 18(1):95-104, jan./fev., 2005.

QUEIROZ, S.L. e BATISTA, A.A. Funções biológicas do óxido nítrico. **Quím. Nova**, v.22 n.4 São Paulo jul./Ago. 1999.

RENNIE, M.J.; TADROS, L.; KHOGALI, S.; AHMED, A. e TAYLOR, P.M. Glutamine transport and its metabolic effects. **J. Nutr.**, 124 (8 Suppl):1.503S-1.508S, 1994.

ROSS, G.M. Induction of cell death by radiotherapy. **Endocrine-Related Câncer.**, 6: 41-44, 1999.

SAITO, H.; TROCKI, O.; WANG, S. L.; GONCE, S. J.; JOFFE, S. N.; and ALEXANDER, J. W. Metabolic and immune effects of dietary arginine supplementation after burn. **Arch. Surg.**, 122: 784, 1987.

SAMPAIO, F. J. B. Neoplasia prostática: conceitos anatômicos fundamentais para a compreensão da patologia benigna e maligna. **J. Bras. Urol.**, 18:121-5, 1992.

SANTOS Jr., J.C.M. Radioterapia - Lesões Inflamatórias e Funcionais de Órgãos Pélvicos. **Rev bras Coloproct.**, 26(3): 348-353, 2006.

SEÇILMI, M.A.; KARATA, Y.; YORULMAZ, Ö.; BÜYÜKAFŞAR, K.; ŞİNGIRIK, E.; DORAN, F.; INAL, T.C.; DIKMEN, A. Protective Effect of L-Arginine Intake on the Impaired Renal Vascular Responses in the Gentamicin-Treated Rats. **Nephron Physiol.**, 100:p13-p20, 2005

SHAPPELL, S.B.; THOMAS, G.V.; ROBERTS, R.L.; HERBERT, R.; ITTMANN, M.M.; RUBIN, M.A.; HUMPHREY, P.A.; SUNDBERG, J.P.; ROZENGURT, N.; BARRIOS, R.; WARD, J.M.; CARDIFF, R.D. Prostate Pathology of Genetically Engineered Mice: Definitions and Classification. The Consensus Report from the Bar Harbor Meeting of the Mouse Models of Human Cancer Consortium Prostate Pathology Committee. **Cancer Research**, 64, 2270–2305, March 15, 2004.

SOUZA, C.A.; VIGORITO, A.C.; ARAN, F.J. P.; OLIVEIRA, G.B.; EID, K.A.B.; RUIZ, M.A. Terapêutica citoprotetora em pacientes tratados com quimio e/ou radioterapia anti neoplásica. **Rev.bras.hematol.hemoter.**, 22(2): 123-128, 2000.

SOUBA, W.W.; HERSKOWITZ, K.; AUSTGENM, T.R.; CHEN, M.K.; SALLOUM, R.M. Glutamine nutrition: theoretical considerations and therapeutic impact. **J Parent Enter Nutr.**, 14:37-42, 1990.

SOUBA, W.W.; SMITH, R.J.; WILMORE, D.W. Glutamine metabolism by the intestinal tract. **J Parent Enter Nutr.**, 9:608-16, 1985.

STONE, H.B.; COLEMAN, C.N.; ANSCHER, M.S.; McBRIDE, W.H. Effects of radiation on normal tissue: consequences and mechanisms. **Lancet Oncol.**, 4:529–536; 2003.

TAGKALIDIS, P.P.; TJANDRA, J.J. Chronic radiation proctitis. **ANZ J Surg.**, 71: 230-7, 2001.

TERRACIO, L.; DOUGLAS, W.H. Densitometric and morphometric evaluation of growth in primary cultures of rat ventral prostate epithelial cells. **Prostate**, 3(2):183-91, 1982.

TUBIANA, M. Prevention of cancer and the dose-effect relationship: the carcinogenic effects of ionizing radiations. **Cancer Radiother.**, 13(4): 238-258, 2009.

TUJI, F.M.; ALMEIDA, S.M.; BÓSCOLO, F.N.; MANZI, F.R. Avaliação do efeito radioprotetor do selenito de sódio no processo de reparação tecidual em ratos. **Radiol. Brás.** 38(5): 359-364, 2005.

VILAMAIOR, P.S.; TABOGA, S.R.; CARVALHO, H.F. Postnatal growth of the ventral prostate in Wistar rats: a stereological and morphometrical study. **Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol.**, 288:885-892, 2006.

YANNI, A.E.; MARGARITIS, E.; LIARAKOS, N.; PANTOPOULOU, A.; POLAKOU, M.; KOSTAKIS, M.; PERREA, D.; KOSTAKIS, A. Time-dependent alterations in serum NO concentration after oral administration of L-arginine, L-NAME, and allopurinol in intestinal ischemia/reperfusion. **Vascular Health and Risk Management**, 4(2), 2008.

ANEXO 1
COMITÊ DE ÉTICA



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

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº **CEA/224/2008** sobre "**Análise estrutural e ultra-estrutural do sistema urogenital de ratos irradiados suplementados ou não com L-arginina e L-L-glutamina**", sob a responsabilidade de **Waldemar Silva Costa**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética Para o Cuidado e Uso de Animais Experimentais do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes da UERJ (CEA), em **25/03/2008**. Este certificado expira em **25/03/2010**.

Rio de Janeiro, 25 de março de 2008.

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

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

ANEXO 2



UNIVERSIDADE DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO

LABORATÓRIO DE PESQUISA UROGENITAL

PROTOCOLO PARA ANÁLISE PARA IRRADIAÇÃO DE RATOS WISTAR

Procedimento Operacional Padrão (POP) N°: 01/2010*Unidade de Pesquisa Urogenital - UERJ*Título: Irradiação de Ratos Wistar

Elaboração: Flávia Morone

Revisor Técnico: Prof. Dr. Waldemar Costa

Ano: 2010



Animal: Rato Wistar

Sexo: Macho

Idade: Adulto

Exposição: Dose única de irradiação - $^{60}\text{Co-}\gamma$

Preparação dos animais para radioterapia



Animais posicionados sob a fonte para radioterapia

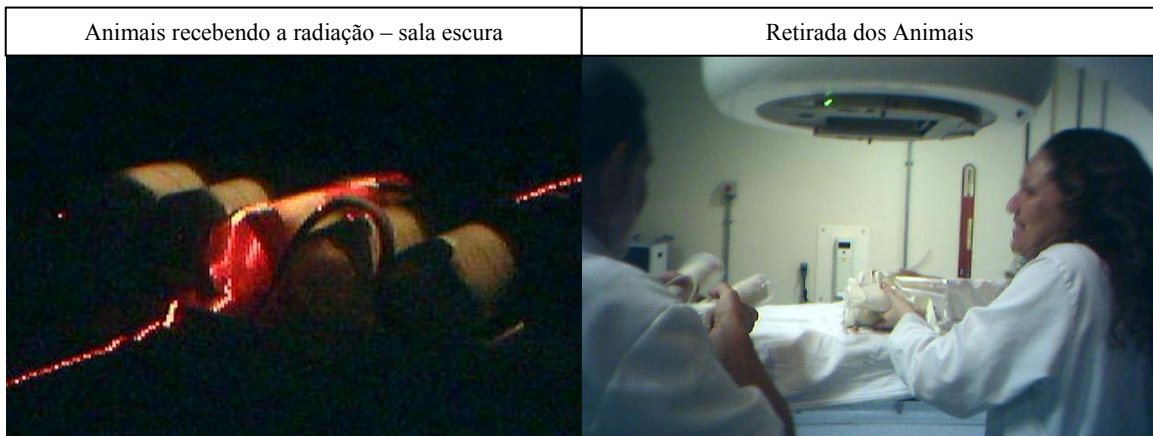


Animais posicionados para receber a radiação



Animais recebendo a radiação





1. Informações Relevantes à Técnica de Radioterapia:

- Distância “Fonte-Pele” = 100 cm.
- Campo de exposição = 531 cm²
- Energia (capacidade de penetração tecidual) = 6 MeV = TLE (Transferência Linear de Energia) : Taxa de energia depositada por partículas carregadas, por unidade de distância percorrida. Define o grau de ionização de uma radiação.
- Tipo de partícula (feixe) = Isótopo radioativo – ⁶⁰Co- γ – gerando raios gama.
- Dose = 240 R (Röntgen)/ minuto, o equivalente a aproximadamente 1164 cGy.
- Tempo de exposição = 6 minutos.
- Método de Aplicação: teleterapia profunda.
- Ângulo de incidência da radiação = direto à 0° (potencial de movimentação do braço = 180°).
- Posição dos animais = Dorsal.

Obs.: cGy e R - As unidades internacionalmente utilizadas para medir as quantidades de radiação são o Röntgen e o gray. O Röntgen (R) é a unidade que mede o número de ionizações desencadeadas no ar ambiental pela passagem de uma certa quantidade de radiação. Já o gray expressa a dose de radiação absorvida por qualquer material ou tecido humano. Um gray (Gy) corresponde a 100 centigrays (cGy) - (Pró-onco, 1993).

2. Informações Relevantes ao Experimento:

- **Grupos de Estudo:**
 - Controle
 - Irradiado
 - Irradiado + Glutamina (L-glutamina)
- **Exposição**
 - Glutamina por via oral – gavagem, durante 15 dias, na dose de 0,2 g/dia de tratamento (0,65g/Kg de peso corporal);
 - Irradiação no 8º dia de tratamento com glutamina, dose única de aproximadamente 1164 cGy.
- **Avaliação:**
 - Durante o período de exposição à glutamina e após o dia da irradiação: Observações em relação aos sinais clínicos de toxicidade;
 - Análise Macroscópica, após dissecação e retirada dos órgãos de interesse: próstata;
 - Análise Microscópica, após o processamento do material

ANEXO 3



UNIVERSIDADE DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO

LABORATÓRIO DE PESQUISA UROGENITAL

Protocolo para Observação dos Sinais de Toxicidade

Procedimento Operacional Padrão (POP) N°: 002/2010*Unidade de Pesquisa Urogenital - UERJ*Título: Avaliação de Sinais de Toxicidade

Elaboração: Flávia Morone

Revisor Técnico: Prof. Dr. Waldemar Costa

Ano: 2010

Grupo: _____	Período (dia) de Observação											
Sinais de Toxicidade												
Piloereção												
Vocalização												
Hiperatividade												
Cromodacriorréia												
Epistaxis												
Hipoatividade												
Sem resposta estímulo externo												
Lacrimejamento												
Lateralização – marcha comprometida												
Queda de Pelos												

Examinador: _____

ANEXO 4



UNIVERSIDADE DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO
LABORATÓRIO DE PESQUISA UROGENITAL
PROTOCOLO PARA ANÁLISE ESTRUTURAL DA PRÓSTATA DE RATOS

WISTAR

Procedimento Operacional Padrão (POP) N°: 003/2010

Unidade de Pesquisa Urogenital - UERJ

Título: Análise Estrutural da Próstata

Elaboração: Flávia Morone

Revisor Técnico: Prof. Dr. Waldemar Costa

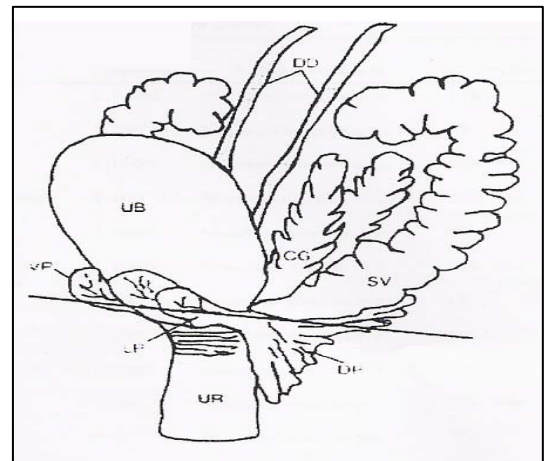
Ano: 2010

IDENTIFICAÇÃO: _____

SOBRE A PESQUISA:	
GRUPO:	<input type="checkbox"/> CONTROLE
	<input type="checkbox"/> TRATADO
SUBSTÂNCIA:	
DOSE:	
ESQUEMA DE TRATAMENTO (N° de doses/ Intervalo):	
SOBRE O ANIMAL:	
IDADE:	
PESO (P):	
PESO DA PRÓSTATA (PP):	PESO RELATIVO (PP/P):

MORFOLOGIA EXTERNA

- N° DE LÓBULOS:
- QUANTO A SIMETRIA:
- Lobo Ventral:
- Lobo Lateral:
- Lobo Dorsal:
- Glândula de Coagulação:
- QUANTO A FORMA:
- Lobo Ventral:
- Lobo Lateral:
- Lobo Dorsal:
- Glândula de Coagulação:
Examinador:



ANEXO 5



UNIVERSIDADE DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO
LABORATÓRIO DE PESQUISA UROGENITAL
PROTOCOLO PARA PROCESSAMENTO DO MATERIAL

Procedimento Operacional Padrão (POP) N°: 004/2010

Unidade de Pesquisa Urogenital - UERJ

Título: Processamento de Material

Elaboração: Flávia Morone

Revisor Técnico: Prof. Dr. Waldemar Costa

Ano: 2010

DATA:/...../.....

Técnico /Pesquisador.....

Numero de protocolo.....

Tipo de material :..... Fixador.....

01-Desidratação:

Álcool 70% (30')	a
Álcool 80% (30')	a
Álcool 90% (30')	a
Álcool 95% (30')	a
Álcool 100% (45')	a
Álcool 100% (1h)	a

02-Diafanização:

Xilol I (45')	a
Xilol II (1h)	a

03-Impregnação:

Parafina I (45')	a
Parafina II (1h)	a

04-Inclusão:

Observações:

Responsável:

ANEXO 6



UNIVERSIDADE DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO
LABORATÓRIO DE PESQUISA UROGENITAL
PROTOCOLO PARA COLORAÇÃO COM H&E

Procedimento Operacional Padrão (POP) N°: 005/2010

Unidade de Pesquisa Urogenital - UERJ

Título: Coloração com HE

Elaboração: Flávia Morone

Revisor Técnico: Prof. Dr. Waldemar Costa

Ano: 2010

Hematoxilina e Eosina – HE

Procedimentos:

- Desparafinar em duas mudas de xilol (10 minutos cada);
- Hidratar em duas mudas de álcool absoluto (3 minutos cada);
- Hidratar em álcool 90%, 80% e 70% (1 minuto cada);
- Lavar em água destilada;
- Corar em Hematoxilina de Delafield (2 a 5 minutos);
- Lavar em água corrente (3 a 5 minutos);
- Desidratar em álcool 70%, 80% e 90% (1 minuto cada);
- Desidratar em duas mudas de álcool absoluto (3 minutos cada);
- Clarificar em duas mudas de xilol (5 minutos cada);
- Montar com Bálsamo do Canadá ou Entellan.

Resultados:

Núcleo: Azul

Citoplasma: Rosa

Fonte: Bancroft, JD; Harry, CC. Manual of histological techniques and their diagnostic applications. New York: Churchill Livingstone. pag: 17-34, 1994.

ANEXO 7



UNIVERSIDADE DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO

LABORATÓRIO DE PESQUISA UROGENITAL

PROTOCOLO PARA ANÁLISE ESTEREOLÓGICA DA PRÓSTATA DE RATOS WISTAR

Procedimento Operacional Padrão (POP) N°: 006/2010

Unidade de Pesquisa Urogenital - UERJ

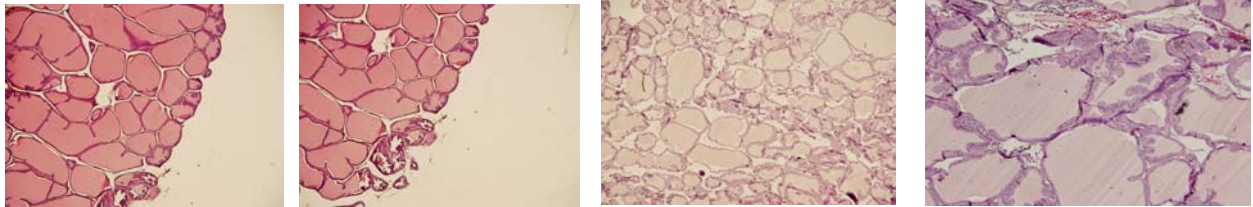
Título: Análise Estereológica da Próstata de Ratos Wistar

Elaboração: Flávia Morone

Revisor Técnico: Prof. Dr. Waldemar Costa

Ano: 2010

Lâmina N° ____ Téc. Coloração _____ Grupo _____ Peça _____

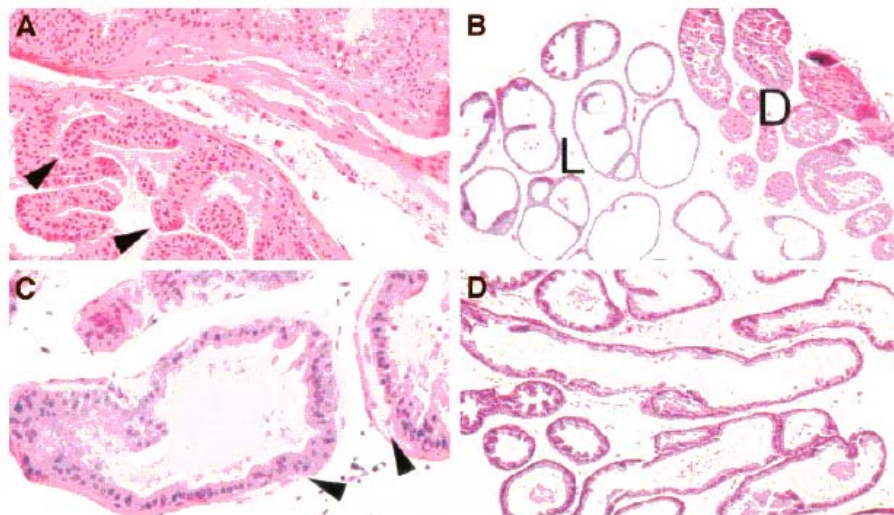


Glândula de coagulação

Glândula de coagulação

Próstata Dorso-lateral

Próstata Ventral



A= Próstata Anterior ou GC; B= Próstata Dorsal (D) e Lateral (L); C= Próstata Dorsal; D= Próstata Ventral Fonte:

Fotomicrografia de Próstata de Rato *in* Shappell et al, 2004.

ANEXO 8



UNIVERSIDADE DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO

LABORATÓRIO DE PESQUISA UROGENITAL

PROTOCOLO PARA SELEÇÃO DE CAMPOS NA ANÁLISE MORFOMÉTRICA

Procedimento Operacional Padrão (POP) N°: 007/2010

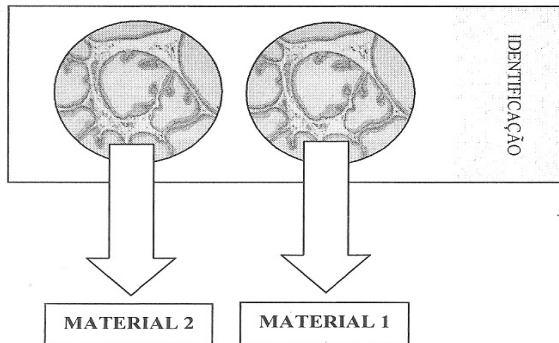
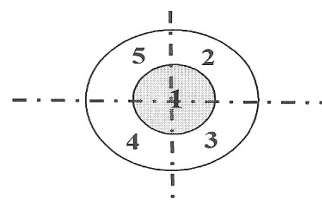
Unidade de Pesquisa Urogenital - UERJ

Título: Seleção de Campos para Morfometria

Elaboração: Flávia Morone

Revisor Técnico: Prof. Dr. Waldemar Costa

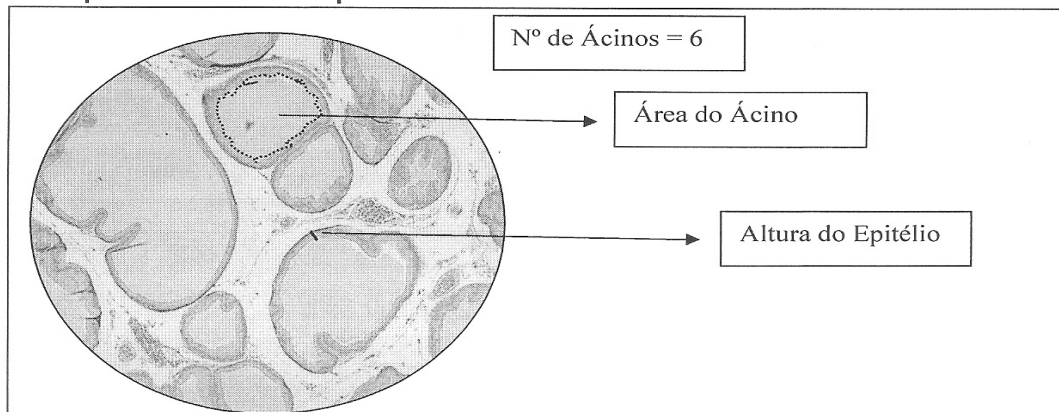
Ano: 2010

LÂMINA**DIVISÃO DOS CAMPOS**

- Os campos serão selecionados e a fotomicrografia será no aumento de **200x**

- Serão analisados os seguintes critérios: número de ácidos por campo; tamanho dos ácidos (área); e, altura do epitélio. Para isto será usado o programa *Image J*.

- N° de Ácidos: Contagem do número de ácidos inteiros no campo.
- Área dos Ácidos: Selecionar a ferramenta do programa e anotar o resultado.
- Altura do Epitélio: Selecionar a ferramenta do programa e anotar o resultado.

Exemplo: Pv 4 lam1 campo 2

ANEXO 9



UNIVERSIDADE DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO
LABORATÓRIO DE PESQUISA UROGENITAL
PROTOCOLO PARA ANÁLISE MORFOMÉTRICA

Procedimento Operacional Padrão (POP) N°: 008/2010

Unidade de Pesquisa Urogenital - UERJ

Título: Análise Morfométrica da Próstata de Ratos Wistar

Elaboração: Flávia Morone

Revisor Técnico: Prof. Dr. Waldemar Costa

Ano: 2010

GRUPO:		Material:			ID:	
Dados	Campo 1	Campo 2	Campo 3	Campo 4	Campo 5	Obs.
N° Ácinos						
Área dos ácinos:						
Ácino 1						
Ácino 2						
Ácino 3						
Ácino 4						
Ácino 5						
Ácino 6						
Ácino 7						
Altura do Epitélio:						
Ácino 1						
Ácino 2						
Ácino 3						
Ácino 4						
Ácino 5						
Ácino 6						
Ácino 7						

Examinador: _____

GRUPO:		Material:			ID:	
Dados	Campo 1	Campo 2	Campo 3	Campo 4	Campo 5	Obs.
N° Ácinos						
Área dos ácinos:						
Ácino 1						
Ácino 2						
Ácino 3						
Ácino 4						
Ácino 5						
Ácino 6						
Ácino 7						
Altura do Epitélio:						
Ácino 1						
Ácino 2						
Ácino 3						
Ácino 4						
Ácino 5						
Ácino 6						
Ácino 7						

Examinador: _____

ANEXO 10



UNIVERSIDADE DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO
LABORATÓRIO DE PESQUISA UROGENITAL
PROTOCOLO PARA COLORAÇÃO COM “PICRO SIRIUS RED”

Procedimento Operacional Padrão (POP) N°: 009/2010

Unidade de Pesquisa Urogenital - UERJ

Título: Coloração com Picro Sirius Red

Elaboração: Flávia Morone

Revisor Técnico: Prof. Dr. Waldemar Costa

Ano: 2010

Picro Sirius Red

Procedimentos:

- Desparafinar em duas mudas de xilol (10 minutos cada);
- Hidratar em álcool absoluto, 90%, 70% e água destilada (3 minutos cada);
- Corar em Solução de Sirius Red 0,1% (1 hora);
- Passar em duas mudas de HCl 0,01N (1 minuto cada);
- Lavar em água destilada;
- Corar em Hematoxilina de Harris (6 minutos);
- Lavar em água corrente;
- Desidratar em álcool 70% e 90% (2 minutos cada) e duas mudas de álcool absoluto (3 minutos cada);
- Clarificar em duas mudas de xilol (5 minutos cada);
- Montar com Bálsamo do Canadá ou Entellan.

Resultados:

Fibras e Fibrilas colágenas: vermelho

Núcleo: roxo

Com polarização: - Fibras de colágeno tipo I: amarelo ou vermelho.

- Fibras de colágeno II: Variável

- Fibras de colágeno tipo III: verde

Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Vol. 86, Suppl. III, 1-11, 1991

**THE USE OF THE PICROSIRIUS-POLARIZATION METHOD FOR THE STUDY
OF THE BIOPATHOLOGY OF COLLAGEN**

G. S. MONTES & L. C. U. JUNQUEIRA

Laboratório de Biopatologia Celular, Faculdade de Medicina da USP, Av. Dr. Arnaldo 455,
01246 São Paulo, SP, Brasil

ANEXO 11



UNIVERSIDADE DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO

LABORATÓRIO DE PESQUISA UROGENITAL

PROTOCOLO PARA ANÁLISE DA DISTRIBUIÇÃO DE COLÁGENO NA

PRÓSTATA

<p>Procedimento Operacional Padrão (POP) N°: 010/2010</p>
--

<p><i>Unidade de Pesquisa Urogenital - UERJ</i></p>

<p>Título: <u>Análise Morfométrica de Colágeno</u></p>
--

<p>Elaboração: Flávia Morone</p>

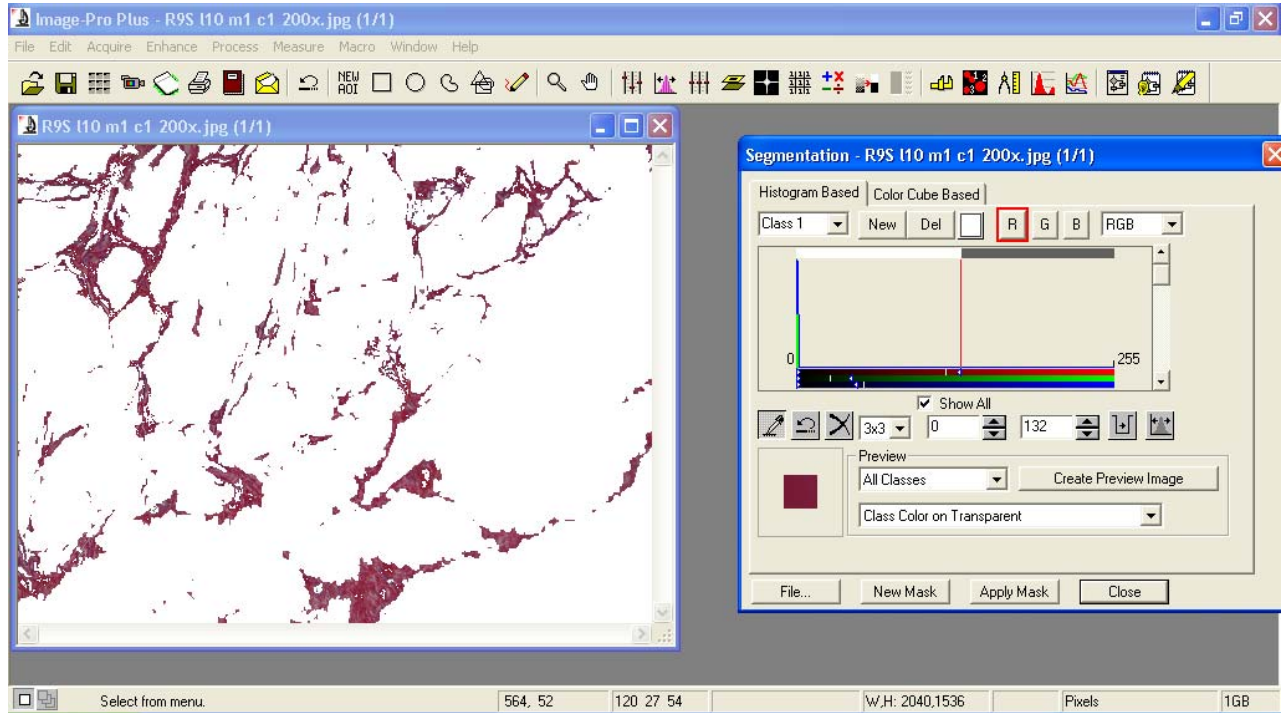
<p>Revisor Técnico: Prof. Dr. Waldemar Costa</p>
--

<p>Ano: 2010</p>

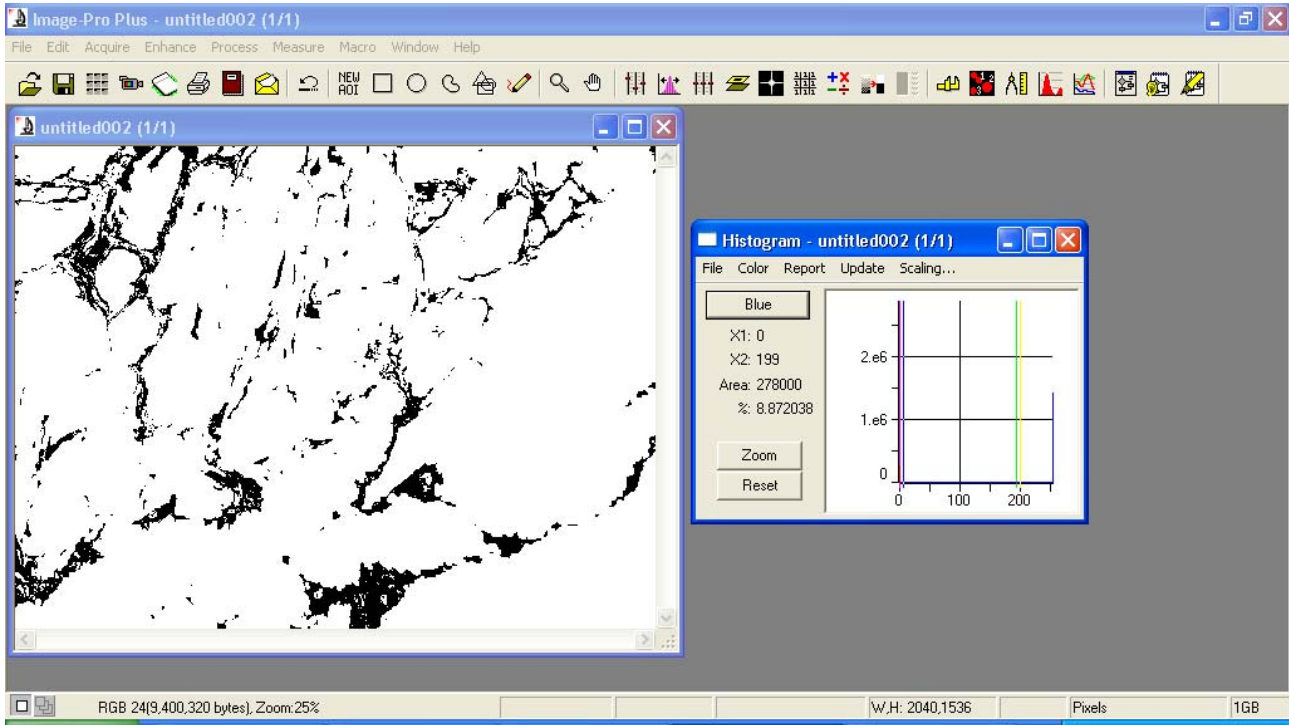
- 1- Processar o material e corar em “**Picro Sirius Red**” seguindo a técnica.
- 2- Usar o Programa **Image Pró Express** (versão 5.0) para capturar as imagens.
 - a. Fotografar* o material usando aumento de 400x (objetiva de 40x) sem polarização.
 - b. Clicar em “digital capture” para capturar a imagem, “Preview” para visualizar e Colocar na Resolução 2040x1536 (pixel);
 - c. Fazer o “Auto White Balance”;
 - d. “Snap” para fotografar e salvar a imagem.
- 3- Abrir o **Adobe Photoshop** (versão 6.0):
 - a. Abrir a imagem fotografada;
 - b. Utilizar a ferramenta “varinha mágica” para selecionar todas as áreas que não estão coradas como colágeno;
 - c. “Deletar” todo o campo selecionado anteriormente;
 - d. Usar a ferramenta “borracha” para limpar o que ainda restou na imagem e que não é colágeno;
 - e. Salvar a imagem.
- 4- No programa **Image Pró-plus** (versão 4.5):
 - a. Ir em “process” e clicar em “segmentation”;
 - b. Selecionar a ferramenta de cor (conta gotas);
 - c. Em “histogram Based” clicar no tom mais escuro da imagem e selecionar;
 - d. Fazer o “New Mask”;
 - e. Salvar a imagem.
- 5- Para finalizar, ainda no programa **Image Pró-plus** (versão 4.5), clicar em “Histogram” e arrasta a linha na direção da esquerda até o eixo “X” para calcular a área e a porcentagem de colágeno.

* Para fotografar foi usada a câmera Olympus DP70 acoplada ao microscópio ótico – Olympus BX 51. ** As imagens a seguir ilustram as etapas 4 e 5 deste protocolo.

Etapa 4.



Etapa 5.



ANEXO 12



UNIVERSIDADE DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO
LABORATÓRIO DE PESQUISA UROGENITAL
PROTOCOLO PARA ANÁLISE QUANTITATIVA DE COLÁGENO

Procedimento Operacional Padrão (POP) N°: 011/2010

Unidade de Pesquisa Urogenital - UERJ

Título: Análise Quantitativa de Colágeno

Elaboração: Flávia Morone

Revisor Técnico: Prof. Dr. Waldemar Costa

Ano: 2010

GRUPO:		ID:	
DADOS	CAMPO 1	CAMPO 2	CAMPO 3
Área			
%			
GRUPO:		ID:	
DADOS	CAMPO 1	CAMPO 2	CAMPO 3
Área			
%			
GRUPO:		ID:	
DADOS	CAMPO 1	CAMPO 2	CAMPO 3
Área			
%			
GRUPO:		ID:	
DADOS	CAMPO 1	CAMPO 2	CAMPO 3
Área			
%			
GRUPO:		ID:	
DADOS	CAMPO 1	CAMPO 2	CAMPO 3
Área			
%			
GRUPO:		ID:	
DADOS	CAMPO 1	CAMPO 2	CAMPO 3
Área			
%			
GRUPO:		ID:	
DADOS	CAMPO 1	CAMPO 2	CAMPO 3
Área			
%			
GRUPO:		ID:	
DADOS	CAMPO 1	CAMPO 2	CAMPO 3
Área			
%			
GRUPO:		ID:	
DADOS	CAMPO 1	CAMPO 2	CAMPO 3
Área			
%			

APÊNDICE 1

Artigo submetido.

Fwd: Reception of paper B-4265

From: **F Hernández** <fhcalvo@um.es>
Date: 2011/1/14
Subject: Reception of paper B-4265
To: wscosta@gmail.com

Reference: B-4265

Dear Dr. Costa et al.,
I am pleased to acknowledge receipt of the paper entitled
"Effects of l-glutamine oral supplementation on prostate of irradiated rats"
submitted for publication in HISTOLOGY AND HISTOPATHOLOGY
(2009 IMPACT FACTOR:2.404).
As soon as the manuscript has been seen by the referees, you
will be informed as to whether it can be accepted.

IF IT IS ACCEPTED, the authors are requested to cover part of
the printing cost (each paper about 550 euros; with colour,
about 800 euros; or equivalent US \$).

Yours sincerely,

Prof. Francisco Hernández-Calvo,

P.S.(NOTE):
The cost of the 1 institutional subscription for 1 year
(2011)is 550 euros or US \$700.

Prof. Francisco Hernández-Calvo
Founder and Editor of
HISTOLOGY AND HISTOPATHOLOGY
<http://www.hh.um.es>
E-mail<fhcalvo@um.es>
Department of Cell Biology and Histology
School of Medicine
University of Murcia
30100 Espinardo - MURCIA
SPAIN

Prof. Waldemar Silva Costa, PhD
Urogenital Research Unit
State University of Rio de Janeiro
Rio de Janeiro - Brasil
wscosta@gmail.com
www.urogenitalresearch.org

EFFECTS OF L-GLUTAMINE ORAL SUPPLEMENTATION ON PROSTATE OF IRRADIATED RATS

Flavia C. M. **Pinto**, Luiz Eduardo M. **Cardoso**, Waldemar S. **Costa**, Pamella **Campos**, Diogo B. **de Souza**, Bianca **Gregório**, Francisco J. B. **Sampaio**.

All authors from Urogenital Research Unit, State University of Rio de Janeiro, RJ, Brazil

EFFECTS OF L-GLUTAMINE ON PROSTATE RATS

CORRESPONDENCE AUTHOR:

Waldemar S. Costa

Urogenital Research Unit – UERJ, Av. 28 de Setembro, 87, Fundos, Vila Isabel, Rio de Janeiro, RJ, Brazil. CEP: 20551-030

Phone: +55 21 2688-8399

e-mail: wscosta@gmail.com

Key words: Prostate, Radiation, L-glutamine.

ABSTRACT

Introduction: Ionizing radiation often adversely affects normal cells of the surrounding organs. Supplementation with L-Glutamine reduces infection rate and mortality in critically ill patients. The aim of the study is to investigate the protective effect of L-Glutamine in animals submitted to ventral radiation when the target organ is not the prostate. **Material and Methods:** Male adult Wistar rats were divided into groups of 10 animals each: Controls (C), maintained under standard conditions and not exposed to radiation; Radiated group (R), submitted to abdominal radiation only; and Supplemented and radiated group (R+G), submitted to abdominal radiation and L-glutamine. The animals of group R+G were supplemented with L-glutamine in the beginning of the experiment until death in the 22th day. **Results:** Collagen surface density in the C and R groups were not statistically different, but a significant difference was observed when comparing groups R+G and R ($p = 0.040$). The R+G group values did not differ significantly from C group. The prostate acinar area of group R was similar to that of C ($p = 0.971$), but in R+G it was significantly reduced when compared with the C ($p = 0.038$) and R ($p = 0.001$) groups. Epithelial height was significantly reduced when comparing the C and R ($p = 0.005$) groups, yet there was no statistical difference between the C and R+G groups. **Conclusion.** Pelvic radiation promotes structural modifications in ventral prostate of rats, which can be partially prevented by L-Glutamine.

INTRODUCTION

Ionizing radiation, when used to destroy tumor cells in pelvic organs always affect the normal cells of the target and surrounding organs leading to important side effects. Despite its negative aspects, pelvic radiotherapy is increasingly used in cancer treatment. As consequence, there is a growing incidence of acute and chronic radiation related lesions in pelvic organs (Tagkalidis et al., 2001).

One of the organs that may be affected during pelvic radiation is the prostate. Despite the anatomical differences between human and mouse prostate, there are many similarities that allow the use of the latter as an experimental model, especially in regard to the acinar epithelium (Abate-Shen et al., 2002).

The L-Glutamine is a conditionally essential amino acid. It is considered non-essential in homeostatic situations but becomes essential in catabolic circumstances such as trauma and sepsis (Newsholme, 2001, Kelly et al., 2003). L-Glutamine is metabolized to glutathione which protects tissues against oxidative damage. It also acts as a nitrogen conductor between cells, and may be precursor for nucleotides and glucose (Novak et al., 2002). Supplementation with this amino acid prevents bacterial translocation from intestinal mucosa, reduces infection rate, hospitalization time and mortality in critically ill patients (Hall et al., 1996, Novak et al., 2002). Diestel et al. (2005) suggests that L-Glutamine supplementation assists the repair in rat's colonic wall after irradiation. It is believed that radiotherapy toxic effects are widened when L-glutamine levels are low (Lopes Paulo, 2005). Possibly the L-glutamine deficiency may limit both, the protein production in inflammatory response and glutathione synthesis compromising the body antioxidant defenses (Pacific et al., 2005).

The aim of the present work is to investigate the protective effect of L-Glutamine in animals submitted to ventral radiation when the target is not the prostate.

MATERIAL AND METHODS

Thirty male adult (90 days old, 350 grams of body weight) Wistar rats were used. The animals were kept in a room with controlled temperature (25 ± 1 C) and with artificial dark–light cycle (lights on from 7:00 am to 7:00 pm) and were fed standard rat food and water ad libitum.

All experiments were done according to the Brazilian law for scientific use of animals, and this project was formally approved by the ethical committee for animal experimentation of Biological Sciences Center, State University of Rio de Janeiro.

The animals were randomly assigned into three groups. Control group (C) was maintained under standard conditions and was not exposed to irradiation (n=10). Radiated group (R) was submitted to abdominal irradiation only (n=10). Supplemented and radiated group (R+G) was submitted to abdominal irradiation and L-glutamine (n=10). The animals of the group R+G were supplemented with L-glutamine (Resource Glutamina, Novartis, Rio de Janeiro, Brazil) in the beginning of the experiment until death in the 22^oday (Fig.1). L-Glutamine was administered by gavage at a dose of 0.2 g/Kg of body weight diluted in distilled water (Diestel et al., 2005).

The animals of the R and R+G group were maintained in a dorsal position inside small plastic cages at the moment of abdominal radiation in a way that they could not move. A linear acceleration of 06 MeV (model Clinac 2100®– Varian®), liberated the radiation with a speed of 240 cGy/min, in a font-skin distance of 100cm, in a 6x4cm field over the abdomen. The head, thorax and members were out of the radiation field. R and R+G received a unique dose of abdominal radiation (1164cGy).

During all stages of the experiment, the animals were daily weighted and observed for signs of toxicity such as inappetence, weight loss, piloerection, hyper or hypo activity.

All animals were killed by sodium thiopental overdose and the prostate was dissected.

Ventral prostate was fixed in 4% buffered formaldehyde, processed for paraffin embedding and sections of 5µm thickness were obtained. Samples were stained with hematoxylin and eosin to study acinar structures and Picrosirius red for collagen analysis.

Images were captured by a digital camera (DP70 - Olympus ®) coupled to a light microscope (BX51 - Olympus ®). All analysis was performed on random fields with the software ImageJ ® (National Institute of Health, USA).

After calibration, the area of the prostatic acini and epithelium height were measured with “free hand selections” and “straight line selections” tools respectively.

For collagen analysis, a 100 points grid was superimposed over the images, and the point counting method (Oberholzer et al., 1996, Pereira-Sampaio et al., 2007) was used to objectively determinate collagen surface density, expressed as percentage.

For parametric values analysis of variance (ANOVA) followed by Student t test were used. For nonparametric data Kruskal-Wallis test, followed by Mann-Whitney test were used. In all cases, significance was set at a probability value of 0.05. Statistical calculations were performed using GraphPad Prism® software (version 5.0, GraphPad Software, Inc.).

RESULTS

The collagen density between C and R group show no statistical difference ($p = 0.160$). Collagen increased significantly in the group R+G when compared with group R ($p = 0.040$). The R+G group values did not differ significantly from C group ($p = 0.37$) (Table 1, Figure 2).

The prostate acinar area of group R was similar to that of C group ($p = 0.97$). The R+G group had a statistically decrease when compared with C group ($p = 0.03$) and with R group ($p = 0.001$) (Table 2, Fig. 3).

Regarding epithelial height, it was significantly reduced in group R when compared C and R group ($p = 0.005$). Among the C group and R +G group there were no statistical difference (Table 2, Fig. 4).

DISCUSSION

The pelvic radiation is well recognized to produce major side effects contributing to morbidity from oncologic patients. Most of these effects occur in consequence of radiation of organs without cancer. This can begins immediately after the tissue exposition but the histological modification may take some weeks to occur (Tagkalidis et al., 2001, Stone et al., 2003, Tubiana, 2009).

In the present study, we studied tissue modifications after two weeks from radiation. This period of time was determined taking in account that rat's tissue metabolism is faster than the

human. Also the choice of the ventral lobe to be analyzed comes from the statement that this tissue is the most similar to the human prostate (Shappell et al., 2004, Justulin et al., 2010).

Studies in rats (Souba et al., 1985, Souba et al., 1990), showed that L-Glutamine aids in colonic wall healing after radiation. However, there is a lack of information regarding L-glutamine in preserving and maintaining the integrity of the prostate after pelvic radiotherapy. The present study establishes through quantitative and precise methods the benefits of oral supplementation with L-glutamine for protecting the prostate from radiation.

One of the consequences of the radiation-matter interaction on cell's structures is the production of reactive oxygen species and oxidative damage (Borek, 1993). The immediate radiation effects can be easily observed in tissues with great proliferative capability, such as epithelium, leading to vascular injuries, hypoxia, and cell death (Stone et al., 2003).

Radiation promoted a significant change in prostate acinar epithelium height, decreasing it in approximately 36%, when compared to control animals. This modification may be a result from the death of some epithelial cells, and corroborates with what was previously point out by Stone et al. (2003). A study concerning morphometric evaluation of ventral prostate cells of rats growth in primary cultures, exposed that L-Glutamine supplemented cultures had a faster cellular growth (Terracio et al., 1982). Actually, L-Glutamine acts on epithelial cells providing an adequate environment for its development. Since there was no statistical difference between control and supplemented groups, we can suppose that L-Glutamine acted on epithelium healing process after radiation.

Radiation causes no significant change on the total area of the acini. However in the group supplemented with L-glutamine a 18% reduction in the size of acini was observed. This decrease could be explained by protein synthesis and muscle tissue development stimulated by L-glutamine (Rennie et al., 1994). When muscle matrix density rises, the parenchyma should be reorganized and, as consequence, the acinar size reduces. Stone et al. (2003) showed that the intensity of radiation side effects can be related with cellular ability to repair the induced lesions. It is believed that L-Glutamine supplementation can be involved in extracellular matrix remodeling, influencing the rising collagen synthesis from fibroblasts, myofibroblasts and muscle cells. These cells, when activated acts as collagen primary producers and others extracellular matrix components. The data presented in the present study suggests that L-Glutamine may have a protective effect over prostate extracellular matrix, maintaining normal collagen levels.

It is possible that an analysis of the effects of pelvic radiation in prostate rats made over longer periods than that used, 21 days, can result in more drastic changes than those observed in this work.

In conclusion, pelvic radiation promotes some structural modifications on ventral prostate of rats. These modifications can be partially prevented by oral supplementation with L-Glutamine.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by grants from the National Council of Scientific and Technological Development (CNPq) and Foundation for Research Support of Rio de Janeiro (FAPERJ), Brazil.

REFERENCES

- Abate-Shem C., Shen M.M. (2002). Mouse models of prostate carcinogenesis. *Trends in genetics*. 18, 51-55.
- Borek C. (1993). Molecular mechanisms in cancer induction and prevention. *Environ Health Perspect*. 101, 237-245.
- Diestel C.F., Lopes-Paulo F., Marques R.G., Horsts N.L. and Caetano C.E. (2005). Effect of oral supplement of l-glutamine in colonic wall of rats subjected to abdominal irradiation. *Acta Cir Bras*. 20, 139-145.
- Hall J.C., Heel K. and McCauley R. (1996). Glutamine. *Br J Surg*. 83, 305-312.
- Justulin L.A., Jr., Acquaro C., Carvalho R.F., Silva M.D. and Felisbino S.L. (2010). Combined effect of the finasteride and doxazosin on rat ventral prostate morphology and physiology. *Int J Androl*. 33, 489-499.
- Kelly D. and Wischmeyer P.E. (2003). Role of L-glutamine in critical illness: new insights. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 6, 217-222.
- Lopes-Paulo, F. (2005). Efeitos da glutamina sobre a parede intestinal e sua aplicabilidade potencial em coloproctologia. *Rev. bras Coloproct*. 25, 75-78.
- Newsholme P. (2001). Why is L-glutamine metabolism important to cells of the immune system in health, postinjury, surgery or infection? *J Nutr*. 131, 2515S-2522S.
- Novak F., Heyland D.K., Avenell A., Drover J.W. and Su X. (2002). Glutamine supplementation in serious illness: a systematic review of the evidence. *Crit Care Med* 30, 2022-2029.
- Oberholzer M., Ostreicher M., Christen H. and Bruhlmann M. (1996). Methods in quantitative image analysis. *Histochem Cell Biol*. 105, 333-355.
- Pacífico, S.L.; Leite, H.P.; Carvalho, W.B de. (2005). A suplementação de glutamina é benéfica em crianças com doenças graves? *Rev. Nutr. Campinas*. 18, 95-104.
- Pereira-Sampaio M., Favorito L.A., Henry R. and Sampaio F.J. (2007). Proportional analysis of pig kidney arterial segments: differences from the human kidney. *J Endourol*. 21, 784-788.
- Rennie M.J., Tadros L., Khogali S., Ahmed A. and Taylor P.M. (1994). Glutamine transport and its metabolic effects. *J Nutr*. 124, 1503S-1508S.
- Shappell S.B., Thomas G.V., Roberts R.L., Herbert R., Ittmann M.M., Rubin M.A., Humphrey P.A., Sundberg J.P., Rozengurt N., Barrios R., Ward J.M. and Cardiff R.D. (2004). Prostate pathology of genetically engineered mice: definitions and classification. The consensus report from the Bar Harbor meeting of the Mouse Models of Human Cancer Consortium Prostate Pathology Committee. *Cancer Res*. 64, 2270-2305.

Souba W.W., Smith R.J. and Wilmore D.W. (1985). Glutamine metabolism by the intestinal tract. *J Parenter Enteral Nutr.* 9, 608-617.

Souba W.W., Herskowitz K., Austgen T.R., Chen M.K. and Salloum R.M. (1990). Glutamine nutrition: theoretical considerations and therapeutic impact. *JPEN J Parenter Enteral Nutr.* 14, 237S-243S.

Stone H.B., Coleman C.N., Anscher M.S. and McBride W.H. (2003). Effects of radiation on normal tissue: consequences and mechanisms. *Lancet Oncol.* 4, 529-536.

Tagkalidis P.P. and Tjandra J.J. (2001). Chronic radiation proctitis. *ANZ J Surg.* 71, 230-237.

Terracio L. and Douglas W.H. (1982). Densitometric and morphometric evaluation of growth in primary cultures of rat ventral prostate epithelial cells. *Prostate.* 3, 183-191.

Tubiana M. (2009). Prevention of cancer and the dose-effect relationship: the carcinogenic effects of ionizing radiations. *Cancer Radiother.* 13, 238-258.

Figure 1 - Experimental design

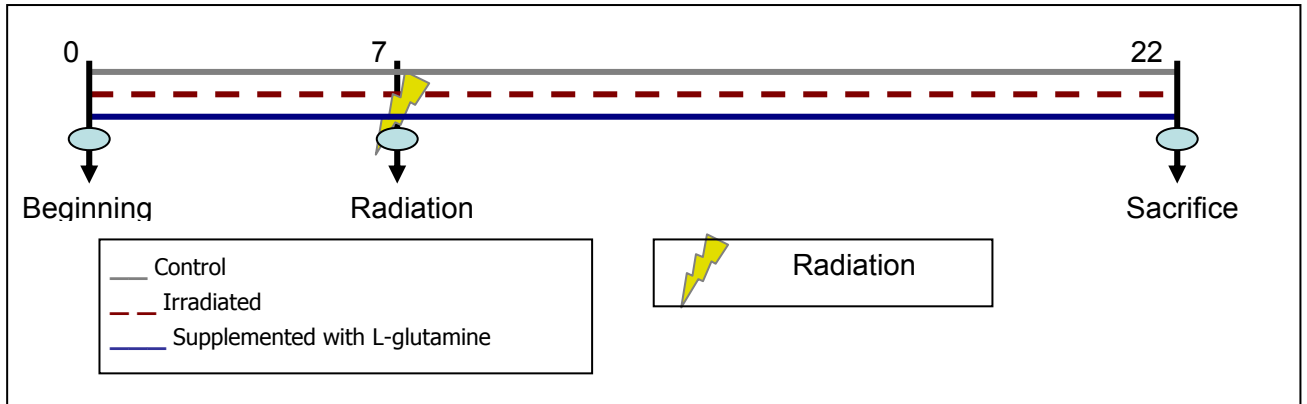
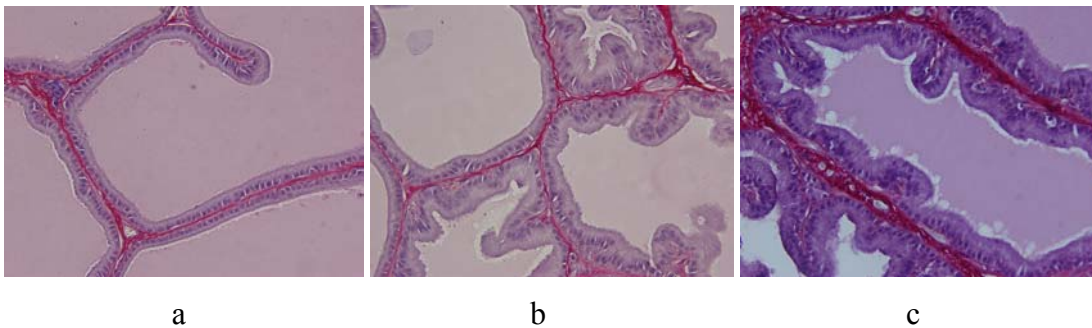
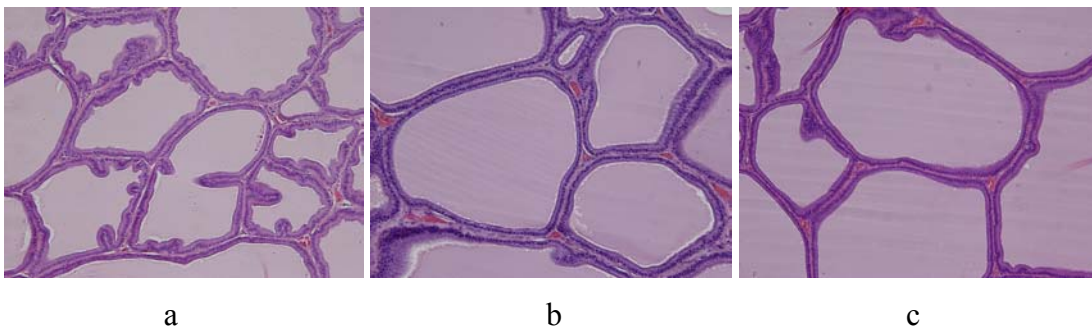


Figure 2 - Collagen distribution in the ventral prostate. a:Control; b:Irradiated ; c:Irradiated + L-glutamine. Picro Sirius. X 400.



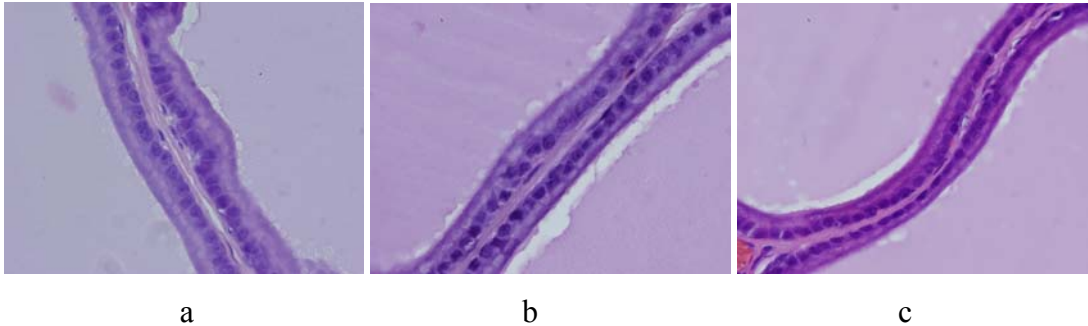
Collagen distribution in the ventral prostate. a:Control; b:Irradiated ; c:Irradiated + L-glutamine. Picro Sirius. X 400.

Figure 3 - Acini area in the ventral prostate a:Control; b:Irradiated ; c:Irradiated + L-glutamine. HE. X 200.



Acini área in the ventral prostate a:Control; b:Irradiated ; c:Irradiated + L-glutamine. HE. X 200.

Figure 4 - Epithelial height in the ventral prostate. a:Control; b:Irradiated ; c:Irradiated + L-glutamine. HE. X 1000.



Epithelial height in the ventral prostate. a:Control; b:Irradiated ; c:Irradiated + L-glutamine. HE. X 1000.

Table 1: Collagen distribution of the ventral prostate.

Groups	Collagen Distribution (%)
Control	8.14 ± 4.2
Radiated	7.00 ± 3.8
Radiated + L-glutamine	9.13 ± 3.4

Table 2: Acini area and epithelial height of the ventral prostate.

Groups	Acini area (μm^2)	Epithelial height (μm)
Control	78 374.2	18.31± 2.0
Radiated	78 588.0	11.59 ± 0.8
Radiated + L-glutamine	64 122.1	13.14 ± 1.4