



**Universidade do Estado do Rio de Janeiro**

**Centro Biomédico**

**Faculdade de Ciências Médicas**

**Leilane Maria Barcellos Nepomuceno**

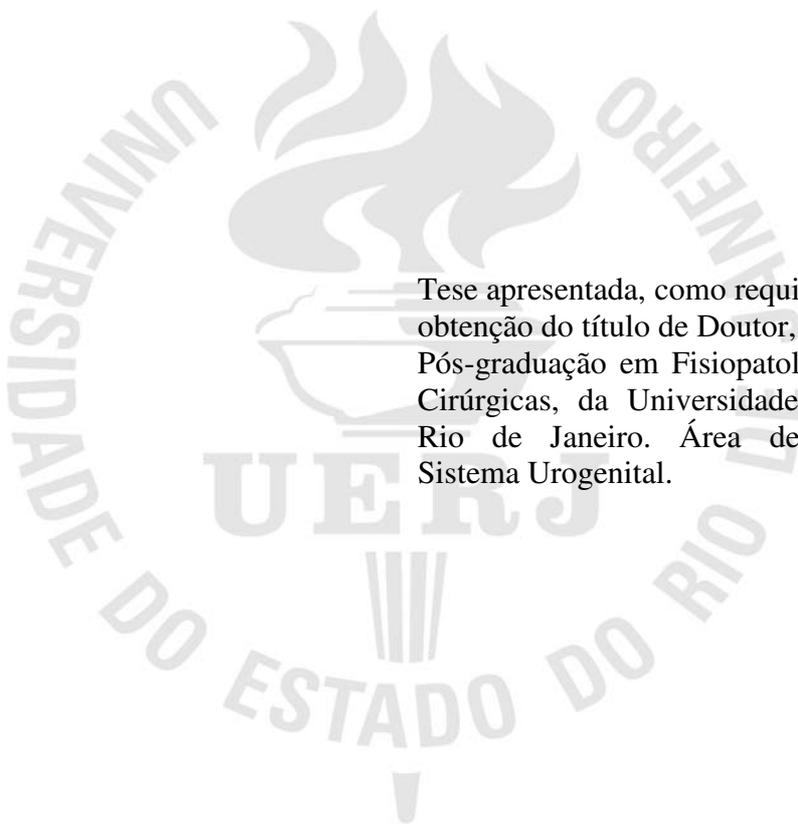
**Efeito radioprotetor da L-Glutamina na parede da bexiga de ratos  
submetidos à irradiação pélvica**

Rio de Janeiro

2013

Leilane Maria Barcellos Nepomuceno

**Efeito radioprotetor da L-Glutamina na parede da bexiga de ratos submetidos à  
irradiação pélvica**



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

Coorientador: Prof. Dr. Waldemar da Silva Costa

Rio de Janeiro

2013

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

N441 Nepomuceno, Leilane Maria Barcellos.  
Efeito radioprotetor da L-Glutamina na parede da bexiga de ratos submetidos a irradiação pélvica. – 2013.  
69 f. : il.

Orientador: Francisco José Barcellos Sampaio  
Coorientador: Waldemar da Silva Costa

Tese (Doutorado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro,  
Faculdade de Ciências Médicas. Pós-graduação em Fisiopatologia e  
Ciências Cirúrgicas.

1. Radioterapia – Teses. 2. Glutamina – Teses. 3. Bexiga – Teses. 4.  
Efeito da radiação – Teses. 5. Miofibroblastos. I. Sampaio, Francisco  
José Barcellos. II. Costa, Waldemar da Silva. Universidade do Estado  
do Rio de Janeiro. Faculdade de Ciências Médicas. III Título.

CDU 615.849:611.96

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

---

Assinatura

---

Data

Leilane Maria Barcellos Nepomuceno

**Efeito radioprotetor da L-Glutamina na parede da bexiga de ratos submetidos à  
irradiação pélvica**

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.

Aprovada em 17 de abril de 2013.

Orientador: Prof. Dr. Francisco José Barcellos Sampaio  
Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

Banca Examinadora:

---

Prof. Dr. Waldemar da Silva Costa (Coorientador)  
Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

---

Prof. Dr. Diogo Benchimol de Souza  
Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

---

Prof. Dr<sup>a</sup>. Ana Luiza Bastos  
Universidade Federal Fluminense

---

Prof. Dr. Mauricio Alves Chagas  
Universidade Federal Fluminense

---

Prof. Dr. Marco Aurelio Pereira Sampaio  
Universidade Federal Fluminense

Rio de Janeiro

2013

## RESUMO

BARCELLOS, Leilane Maria. *Efeito radioprotetor da L-Glutamina na parede da bexiga de ratos submetidos à irradiação pélvica*. 2013. 69 f. Tese (Doutorado em Fisiopatologia e Ciências Cirúrgicas) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2013.

A radioterapia é frequentemente utilizada no tratamento de tumores da próstata, porém durante esse procedimento a bexiga sadia usualmente sofre efeitos colaterais. Através do uso de um modelo animal para irradiação pélvica, avaliamos se a suplementação nutricional com L-glutamina poderia prevenir possíveis danos na parede da bexiga, especialmente em suas camadas mais superficiais. Ratos Wistar adultos machos com idade entre 3 e 4 meses foram separados em grupos de 8 animais: grupo controle que não recebeu a irradiação; grupos somente irradiados que foram mortos 7 (R7) e 15 dias (R15) após a irradiação (dose única de 10 Gy na região pélvico-abdominal); grupos irradiados e suplementados com L-glutamina (0,65g/kg de peso por dia), que foram mortos 7 (RG7) ou 15 após a irradiação. Células e vasos sanguíneos da lâmina própria, bem como o urotélio, foram avaliados com métodos histológicos. No urotélio foram feitas análises da altura e densidade nuclear e na lâmina própria densidade celular, densidade vascular e o número de mastócitos. Os resultados mostraram que em R7, a altura e densidade nuclear do urotélio e a densidade celular da lâmina própria não foram alterados significativamente. Entretanto a densidade dos vasos sanguíneos foi reduzida em 48% ( $p < 0,05$ ) e essa alteração foi evitada pela glutamina ( $p < 0,02$ ). No grupo R15, a densidade celular do epitélio aumentou em 35% ( $p < 0,02$ ). A densidade celular da lâmina própria não apresentou diferença estatística entre os grupos. Os mastócitos na lâmina própria foram reduzidos em R7 e R15. Apesar de ainda reduzidos em RG7 em RG15 houve aumento no número desse tipo celular o que sugere uma ação positiva da glutamina. Células  $\alpha$ -actina positivas na lâmina própria formam uma camada suburotelial e foram identificadas como miofibroblastos. A espessura dessa camada aumentou em R7, mas foi semelhante ao controle em RG7, enquanto alterações em R15 e RG15 foram menos evidentes. Esses resultados mostraram que a utilização da L-glutamina antes e após a radioterapia deve ser considerada para uso humano na proteção da bexiga contra os efeitos da radiação.

Palavras-chave: Bexiga urinária. Glutamina. Miofibroblastos. Radioterapia.

## ABSTRACT

Radiotherapy is often used to treat prostate tumors, but the normal bladder is usually adversely affected. Using an animal model of pelvic radiation, we investigated whether glutamine nutritional supplementation can prevent radiation-induced damage to the bladder, especially in its more superficial layers. Male rats aged 3 to 4 months were divided into groups of 8 animals each: controls, which consisted intact animals; radiated-only rats, which were sacrificed 7 (R7) or 15 (R15) days after a radiation session (10 Gy aimed at the pelvico-abdominal region); and radiated rats receiving L-glutamine supplementation (0.65 g/kg body weight/day), which were sacrificed 7 (RG7) or 15 (RG15) days after the radiation session. Morphological and morphometric analysis of the urothelium were made. Nuclear density, lamina propria cell density and mast cells numbers per area were counted. The results showed that, in R7, epithelial thickness, epithelial cell density, and cell density in the lamina propria were not significantly affected. However, density of blood vessels in R7 was reduced by 48% ( $p < 0.05$ ) and this alteration was mostly prevented by glutamine ( $p < 0.02$ ). In R15, density of blood vessels in the lamina propria was not significantly modified. However, epithelial thickness was reduced by 25% ( $p < 0.05$ ) in R15, and this effect was prevented by glutamine ( $p < 0.01$ ). In R15, epithelial cell density was increased by 35% ( $p < 0.02$ ), but glutamine did not protect against this radiation-induced increase. Cell density in the lamina propria was likewise unaffected in R15. Density of mast cells in the lamina propria was markedly reduced in R7 and R15. The density was still reduced in RG7, but a higher density in RG15 suggested a glutamine-mediated recovery. Alpha-actin positive cells in the lamina propria formed a suburothelial layer and were identified as myofibroblasts. Thickness of this layer was increased in R7, but was similar to controls in RG7, while changes in R15 and RG15 were less evident. In conclusion, pelvic radiation leads to significant acute and post-acute alterations in the composition and structural features of the vesical lamina propria and epithelium. Most of these changes, however, can be prevented by glutamine nutritional supplementation. These results emphasize, therefore, the potential use of this aminoacid as a radioprotective drug.

Keywords: Urinary bladder. Glutamine. Myofibroblasts. Radiotherapy.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Anatomia da bexiga de mamíferos.....	09
Figura 2	Esquema do epitélio da bexiga urinária distendido.....	11
Figura 3	Representação esquemática da interação do urotélio e camadas suburoteliais.....	13
Figura 4	Representação esquemática dos miofibroblastos, células musculares lisas e fibroblastosoblastos.....	15
Figura 5	Localização dos miofibroblastos na lâmina própria da bexiga.....	17
Figura 6	Eletromicrografia do mastócito.....	18
Figura 7	Metabolismo da glutamina.....	22
Figura 8	Animais imobilizados no acelerador linear.....	26
Figura 9	Posicionamento dos animais no acelerador linear.....	27
Figura10	Suplementação dos animais com L-glutamina.....	28
Figura11	Dissecção do sistema urogenital do rato.....	29
Figura12	Utilização do software image J para morfometria do urotélio.....	32
Figura13	Seleção da área do epitélio e o valor da área a ser quantificada.....	33
Figura14	Separação da área do urotélio previamente marcada.....	33
Figura15	Densidade celular e dos vasos sanguíneos da lâmina própria .....	35
Figura16	Análise morfométrica da altura do epitélio.....	38
Figura17	Análise morfométrica da densidade das células do epitélio.....	38
Figura18	Fotomicrografia da mucosa da bexiga .....	39
Figura19	Análise morfométrica das células da lâmina própria.....	40
Figura20	Análise morfométrica da densidade dos vasos sanguíneos da lâmina própria.....	40
Figura21	Imunofluorescência anti $\alpha$ -actina SM.....	41
Figura22	Fotomicrografia da mucosa da bexiga: Miofibroblastos.....	42
Figura23	Imunofluorescência anti CD 31.....	43

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Resultados numéricos dos parâmetros analisados após 7 dias.....	37
Tabela 2	Resultados numéricos dos parâmetros analisados após 15 dias.....	37
Tabela 3	Número de mastócitos da lâmina própria por mm <sup>2</sup> .....	37

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BSA- Albumina sérica bovina

C- Grupo controle

cGy- Centigrays (1 Gy corresponde a 100 centigrays)

DAB- 3,3 diaminobenzidina tetrahydroclorido

DNA- Ácido desoxiribonucleico

Gy- Gray

MeV- Mega elétron volts

R7- Grupo irradiado e morto 7 dias após a irradiação

R15- Grupo irradiado e morto 15 dias após a irradiação

RG7- Grupo irradiado e suplementado com L-glutamina e mortos 7 dias após a irradiação

RG15- Grupo irradiado e suplementado com L-glutamina e mortos 15 dias após a irradiação

$\alpha$ -SM - Alfa actina de músculo liso

## SUMÁRIO

	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	9
1	<b>JUSTIFICATIVA E OBJETIVO</b> .....	24
2	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	25
2.1	<b>Animais</b> .....	25
2.2	<b>Modelo experimental</b> .....	25
2.3	<b>Método de irradiação</b> .....	26
2.4	<b>Suplementação dos animais</b> .....	27
2.5	<b>Morte dos animais</b> .....	28
2.6	<b>Análise estrutural</b> .....	28
2.6.1	<u>Procedimentos histológicos</u> .....	28
2.6.2	<u>Imunofluorescência</u> .....	30
2.7	<b>Análise das imagens e avaliação morfológica</b> .....	30
2.8	<b>Morfometria</b> .....	31
2.8.1	<u>Altura do epitélio</u> .....	31
2.8.2	<u>Densidade nuclear do epitélio</u> .....	32
2.8.3	<u>Densidade nuclear da lâmina própria</u> .....	34
2.8.4	<u>Densidade dos vasos sanguíneos da lâmina própria</u> .....	34
2.9	<b>Análise estatística</b> .....	35
3	<b>RESULTADOS</b> .....	36
4	<b>DISCUSSÃO</b> .....	44
5	<b>CONCLUSÃO</b> .....	47
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	48
	<b>APÊNDICE A</b> – Protective Effects of L-glutamine on the bladder wall of rats submitted to pelvic radiation. ....	58
	<b>APÊNDICE B</b> – Glutamine supplementation prevents collagen expression damage in health urinary bladder caused by radiotherapy.....	62
	<b>ANEXO A</b> - Comissão de ética para o cuidado e uso de animais .....	68
	<b>ANEXO B</b> - Informações Relevantes à Técnica de Radioterapia.....	69

## INTRODUÇÃO

### Bexiga: Anatomia macroscópica:

A bexiga urinária dos mamíferos é um órgão muscular distensível e arredondado que serve como reservatório para armazenamento e liberação periódica da urina. A capacidade de armazenamento da bexiga humana é de 400-500 ml e nos ratos a capacidade é de aproximadamente 1,0 ml. A bexiga do rato, quando cheia assume forma ovóide e atinge um diâmetro máximo de 4mm (REIS, *et al*, 2011).

No rato, a bexiga urinária localiza-se na cavidade abdominal posterior em posição medial, ventral ao colon. Suas regiões anatômicas são: corpo, colo e ápice ou domo e pode ser dividida em regiões ventral, dorsal (FRITH *et al*, 1995). Há três orifícios internos, dois óstios dos ureteres (direito e esquerdo) e o óstio interno da uretra. Esses orifícios limitam a área denominada trígono da bexiga (Figura 1).

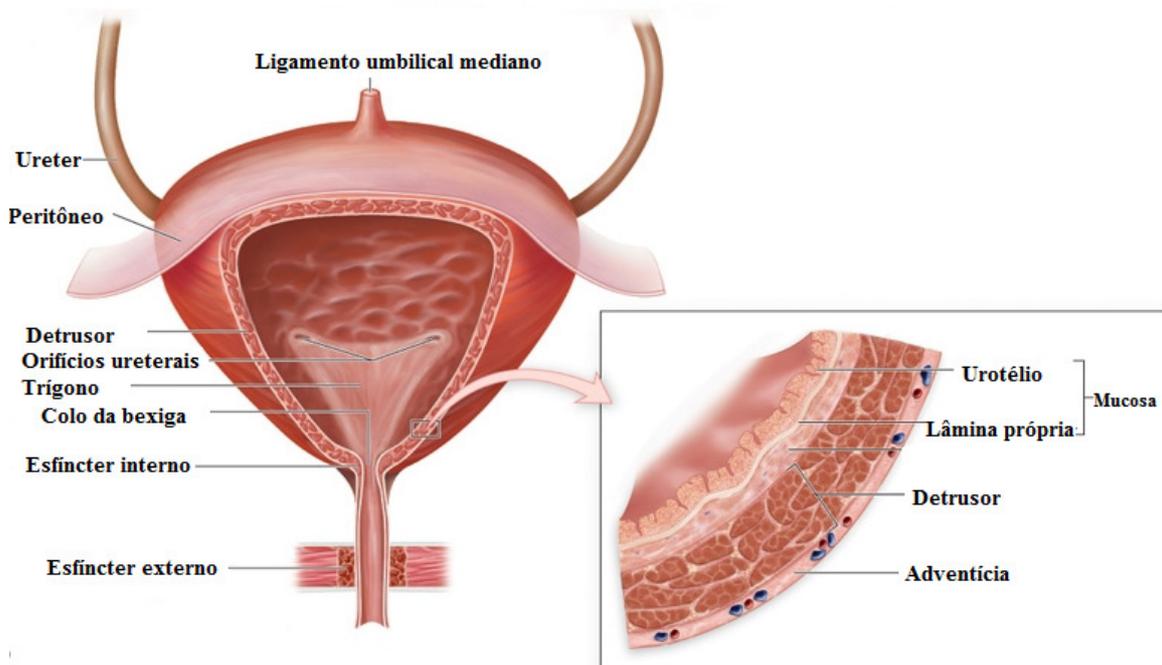


Figura 1- Anatomia da bexiga de mamíferos. Fonte: Retirado e modificado de (MCKINLEY, 2006).

A parede da bexiga deve ser capaz de distender e reorganizar-se de modo a permitir um aumento do volume do órgão, sem aumento significativo na pressão interna, para isso deve ser extremamente complacente. As mudanças do estado vazio para o cheio são acompanhadas pelo urotélio, músculo liso e tecido conjuntivo, importantes para acomodar o aumento do volume pela entrada da urina (CHANCELLOR e YASHIMURA, 2002).

### **Anatomia microscópica da bexiga:**

A camada da bexiga urinária em contato com a luz do órgão é revestida por uma membrana mucosa. Abaixo da mucosa observamos a camada muscular lisa e externamente, a camada adventícia (Figura 1) excetuando-se a área superior da bexiga, que é revestida por uma camada serosa proveniente do peritônio (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2008).

A camada mucosa compreende o epitélio, também denominado urotélio, e o tecido conjuntivo subjacente denominado lâmina própria (STEWART, 1986). O urotélio repousa sobre a membrana basal e uma pequena quantidade de tecido conjuntivo. Segundo Frith, 1995, nos ratos não há camada muscular da mucosa separando a mucosa da submucosa por esse motivo, alguns autores denominam a área de tecido conjuntivo imediatamente abaixo do epitélio de camada suburotelial. Abaixo desse tecido conjuntivo há a camada de músculo liso recoberta externamente pela camada adventícia (FRITH *et al*, 1995).

### **Urotélio:**

O urotélio apoia-se na membrana basal e é usualmente classificado como epitélio de transição. Possui pelo menos três camadas celulares distintas (Figura 2): basal, apoiada à membrana basal, intermediária e a camada de células superficiais volumosas denominadas células globosas (SOLER *et al*, 2008). As células da camada basal proliferam em direção à luz do órgão e em seu processo de maturação, modificam-se aumentando de volume. São as células precursoras das demais camadas do urotélio e normalmente exibem uma baixa taxa de renovação (3-6 meses), entretanto a taxa de proliferação celular pode aumentar em condições patológicas (BIRDER, 2007). As células da camada superficial do urotélio vistas ao

microscópio eletrônico de transmissão possuem membrana plasmática apical assimétrica. O citoplasma dessas células contém inúmeras vesículas discóides, que funcionam como reserva de membrana para adaptação do urotélio à expansão causada pelo aumento do volume de urina (BORN *et al*, 2003; FRITH *et al*, 1995).

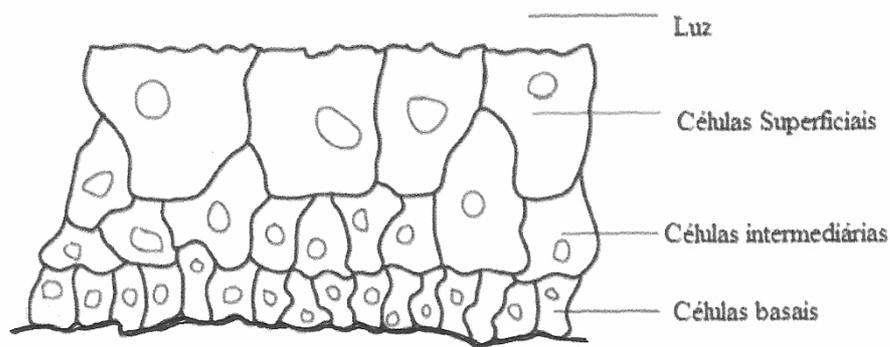


Figura 2: Esquema do epitélio da bexiga urinária distendida. Trata-se de epitélio de transição com 3 camadas distintas. Fonte: Modificado de (LEWIS, 2000).

A integridade estrutural do urotélio é de fundamental importância para que a função de armazenamento da urina seja possível. Para que isso ocorra, o urotélio é capaz de em condições normais, exercer mecanismos de proteção. Um desses mecanismos é a camada de polissacarídeos sulfatados no polo apical das células uroteliais em contato direto com a urina. Esses polissacarídeos atuam como fator não específico de antiaderência e defesa contra infecções, pois evitam a adesão de bactérias, íons e proteínas e permitem alterações mínimas na composição da urina durante seu armazenamento (LAGRANGE, 1997; LEWIS, 2000, BIRDER, 2007).

Outros mecanismos de proteção são as junções intercelulares e as especializações de membrana apical das células globosas superficiais. As junções intercelulares reduzem o movimento de íons e solutos através do espaço intercelular e as uroplaquinas, proteínas

semelhantes a placas hexagonais, reduzem a permeabilidade a pequenas moléculas tais como a água e uréia além de servir com reserva de membrana para o aumento de volume das células globosas necessário, para o estiramento da parede vesical (STEWART 1986; BORN *et al*, 2003; BIRDER, 2004).

Além da função de barreira, o urotélio também atua como uma estrutura capaz de responder e detectar estímulos fisiológicos e químicos relacionados ao início do processo de micção. Nesse reflexo, quando a bexiga está suficientemente cheia ocorre a ativação de nervos aferentes e subsequente ativação de nervos eferentes para contração do músculo detrusor e o esvaziamento vesical (FRY *et al*, 2004). Com o enchimento, toda a parede da bexiga expande, o urotélio sofre estiramento e inicia a liberação de várias moléculas sinalizadoras tais como ATP (Trifosfato de adenosina), óxido nítrico e acetil colina. A liberação desses mediadores químicos sugere propriedades sensoriais e de sinalização do urotélio. Essa comunicação é feita entre células epiteliais adjacentes, entre células epiteliais e nervos e entre células do sistema imune da parede vesical e miofibroblastos (BIRDER, 2005 e 2007). Evidências sugerem que a liberação de ATP (Figura 3) está relacionada a mecanismos reguladores, que iniciam a sensação de plenitude vesical necessária para o início do processo de micção. Há também participação dos miofibroblastos, interpostos entre o urotélio e terminações nervosas. Experimentos com miofibroblastos suburoteliais isolados, demonstraram que essas células respondem ao ATP exógeno através de receptores de superfície celular e também a alterações do pH do meio, fortalecendo a hipótese de sua participação no processo sensorial. (FRY *et al*, 2004; FRY *et al*, 2007).

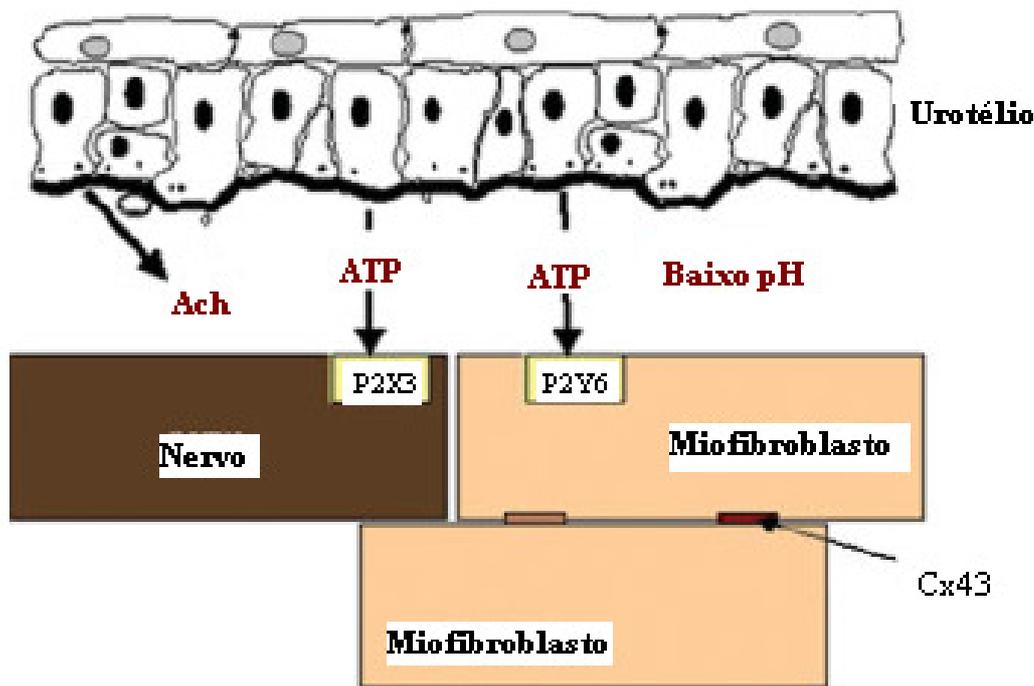


Figura 3- Representação esquemática da interação entre o urotélio e a camada suburotelial. Quando estirado, o urotélio libera ATP e acetilcolina (Ach). O estiramento e outras condições podem alterar o pH nessa região. Direta ou indiretamente, o ATP ativa receptores de miofibroblastos suburoteliais (P2Y<sub>6</sub>) e de terminações nervosas (P2X<sub>3</sub>). No processo há participação de junções comunicantes via conexinas (Cx43). Fonte: Modificado de (FRY *et al*, 2007).

### A lâmina própria:

A lâmina própria da bexiga consiste de tecido conjuntivo fibroelástico e contém axônios, capilares sanguíneos, algumas células musculares lisas e células típicas do tecido conjuntivo tais como fibroblastos, mastócitos e miofibroblastos (SUI *et al*, 2002; WISEMAN *et al*, 2003).

Os fibroblastos são as células mais abundantes da lâmina própria e tem como função principal a produção e manutenção dos componentes da matriz extracelular (MCANULTY, 2007).

Os miofibroblastos foram caracterizados morfológicamente pela primeira vez em 1975 por Gabbiani nos tecido de granulação. Posteriormente foram descritos também em tecidos saudios. Essas células possuem características comuns entre fibroblastos e células musculares lisas (WISEMAN, *et al* 2003).

Quando visualizados ao microscópio óptico, os miofibroblastos são descritos com forma fusiforme ou estrelada, citoplasma fracamente acidófilo e núcleo com pequeno nucléolo (DRAKE *et al*, 2006). Ao microscópio eletrônico de transmissão, o núcleo celular é visto com inúmeras reentrâncias, retículo endoplasmático e complexo de golgi proeminente, característica que os assemelha aos fibroblastos. Filamentos contráteis típicos de células musculares lisas são observados logo abaixo da membrana plasmática Há ainda, em íntimo contato com a superfície celular uma lâmina basal descontínua (EYDEN, 2008).

Os miofibroblastos interconectam-se através de junções comunicantes (SCHMITT-GRAFF *et al*, 1994) e apresentam uma junção célula-matriz extracelular denominada fibronexus. Nessa junção, microfilamentos intracelulares estão conectados a feixes de fibronectina presentes na matriz extracelular (SCHITT-GRAFF *et al*, 1994; DRAKE *et al*, 2006).

O compartilhamento de características com fibroblastos e com células musculares lisas dificulta a caracterização dessas células (Figura 4) e nesse aspecto, proteínas do citoesqueleto são de particular interesse, pois representam bons marcadores de diferenciação celular.

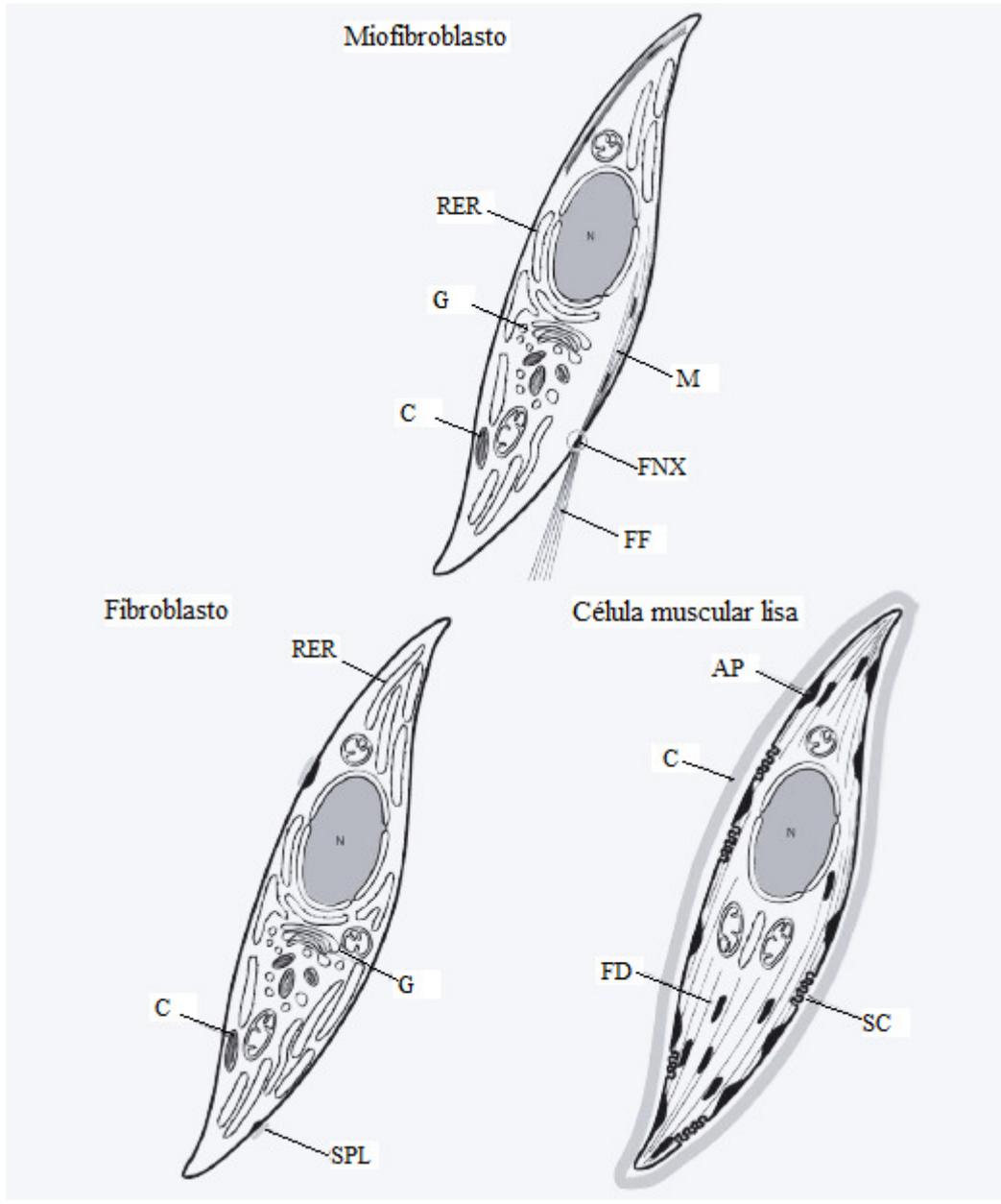


Figura 4- Representação esquemática dos miofibroblastos em comparação com fibroblastos e células musculares lisas . AP- placa de adesão; C- vesícula de secreção de colágeno; FD- densidade focal; FF- fibrilas de fibronectina; FNX- fibronexos; G- Complexo de Golgi; L- lâmina basal; M- miofilamento; N- núcleo;RER- retículo endoplasmático rugoso; SC-cavéolas;SPL- adesão focal. Fonte: Retirado e modificado de (EYDEN,2008).

O citoesqueleto de células eucarióticas é composto por sistemas de filamentos: microfilamentos de actina, miosina, filamentos intermediários e as lâminas presentes no envoltório nuclear. São descritas 6 isoformas de actina produzidas por diferentes genes em tecidos de mamíferos: isoformas  $\beta$  e  $\gamma$  presentes em todos os tipos celulares e as formas  $\alpha$ -cardíaca,  $\alpha$ -esquelética encontradas nas células musculares cardíacas e esquelética respectivamente. Há também as formas  $\alpha$  e  $\gamma$  encontradas em células musculares lisas. Anticorpos monoclonais anti  $\alpha$ -actina de músculo liso ( $\alpha$ -SM) tem sido particularmente úteis na caracterização dos miofibroblastos.

O fenótipo híbrido entre fibroblastos, células musculares lisas e miofibroblastos dificulta e torna indispensável o uso de marcadores celulares para a diferenciação desses tipos celulares. A  $\alpha$ -actina de músculo liso ( $\alpha$ -SM) é um dos marcadores celulares de miofibroblastos mais utilizados em sua identificação (SCHMITT-GRAFF *et al*, 1994; DRAKE *et al*, 2006; EYDEN, 2008), porém desmina, vimentina e conexina-43 também são frequentemente utilizados (EYDEN, 2008; ALEXA *et al*, 2009; ROOSEN *et al*, 2009).

Na bexiga humana, os miofibroblastos localizam-se na camada imediatamente abaixo na camada suburotelial (Figura 5) nas proximidades da lâmina basal e da rede capilar (NEUHAUS *et al*, 2007; HEINRICH *et al*, 2011). Miofibroblastos ativados facilitam a progressão de tumores e estas células tem papel importante no processo inicial do reflexo de micção devido a sua localização entre o urotélio e terminações nervosas (ZEISBERG *et al*, 2007). Tem sido descritos também no estroma de neoplasmas de vários órgãos. Nos carcinomas invasivos de bexiga, distribuem-se em feixes e nos não invasivos, distribuem-se em rede (SHIMASAKI *et al*, 2006).

Evidências apontam que os miofibroblatos são importantes no modo de funcionamento da musculatura lisa, neurotransmissão e regulação da função normal do trato gastrointestinal. O papel potencial dos miofibroblastos suburoteliais na capacidade de sensação de plenitude vesical tem sido alvo de interesse (FRY *et al*, 2004; SUI *et al*, 2008; LIU *et al*, 2009).

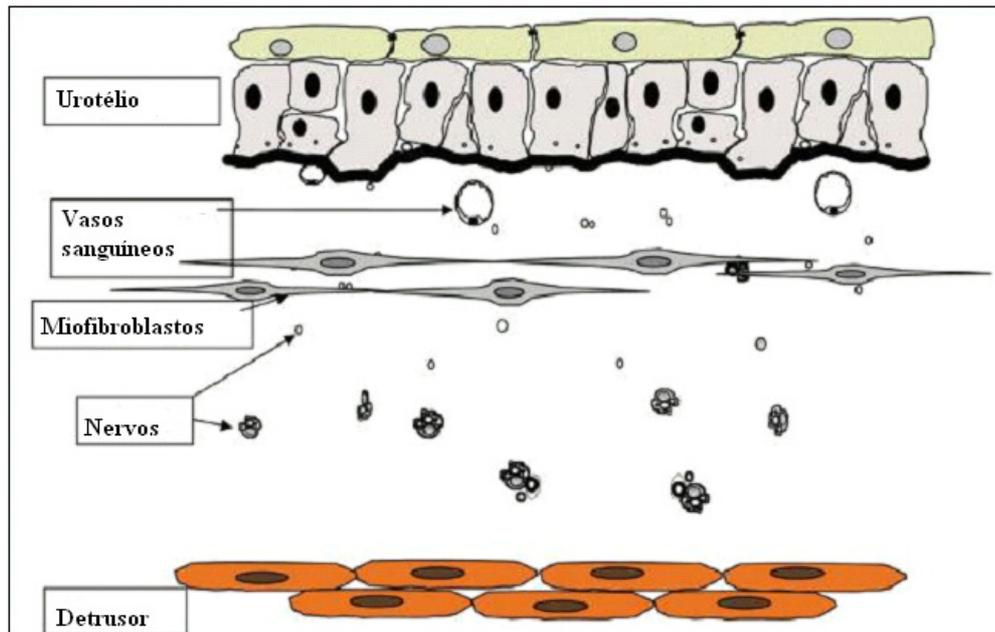


Figura 5- Localização dos miofibroblastos na lâmina própria da bexiga. Fonte: Modificado de (FRY e ROOSEN, 2007).

Os mastócitos são células multifuncionais que se desenvolvem a partir de precursor específico da medula óssea. Após a diferenciação, as células precursoras imaturas circulam no sangue, cruzam a parede endotelial de vênulas e capilares e penetram nos tecidos onde vão se diferenciar e proliferar. São consideradas células residentes do tecido conjuntivo, particularmente associadas a vasos sanguíneos e a nervos (METCALFE *et al*, 1997).

O mastócito maduro é uma célula globosa grande com citoplasma repleto de grânulos que se coram intensamente. O núcleo é pequeno, esférico e central, embora seja de difícil observação por estar frequentemente recoberto por grânulos citoplasmáticos.

Os grânulos secretores elétron-densos são heterogêneos (Figura 6) e contém mediadores químicos como histamina e glicosaminoglicanos. Os grânulos dos mastócitos são metacromáticos devido a alta concentração de radicais ácidos presentes nos glicosaminoglicanos (heparina ou condroitin sulfato). Há outros constituintes nos grânulos dos mastócitos tais como a histamina, que promove a permeabilidade vascular e é importante nos processos inflamatórios, proteases neutras e o fator quimiotático para eosinófilos (ECF-A). Os mastócitos secretam também alguns leucotrienos (C4, D4, E4) ou a substância de reação lenta da anafilaxia (SRS-A). Estas substâncias não existem pré-formadas na célula, são

sintetizadas a partir de fosfolipídios de membrana plasmática e imediatamente liberadas para o meio extracelular (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2008).

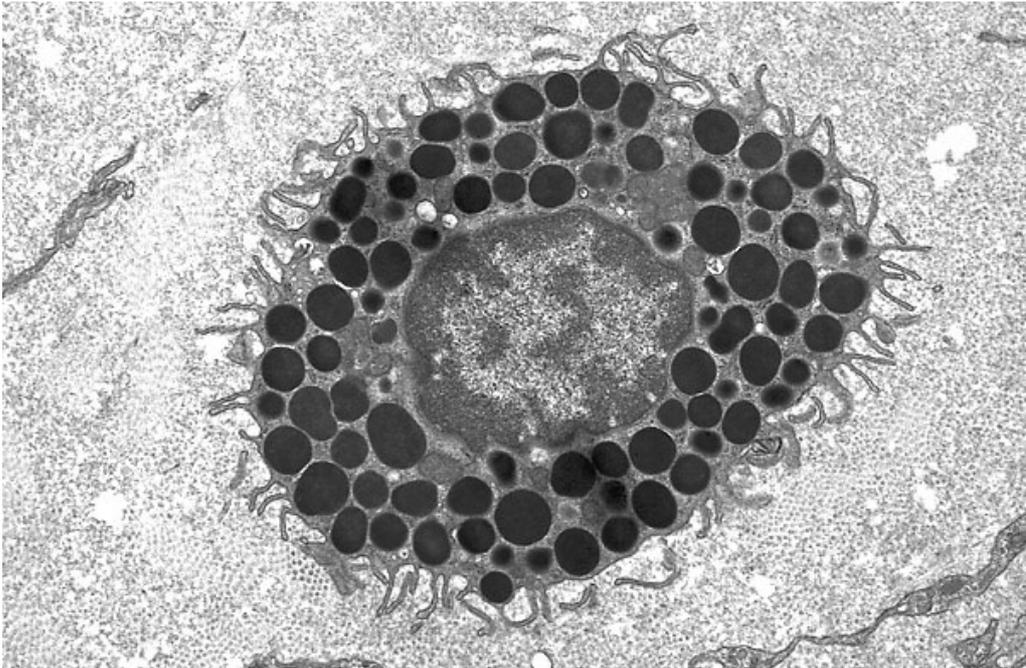


Figura 6- Mastócito com inúmeros grânulos de secreção elétron densos. Microscopia eletrônica de transmissão. Fonte: [http://medcell.med.yale.edu/histology/connective\\_tissue\\_lab/mast\\_cell\\_em.php](http://medcell.med.yale.edu/histology/connective_tissue_lab/mast_cell_em.php)

Os mastócitos estão envolvidos na resposta imune inata, na autoimunidade e em distúrbios neuro inflamatórios tais como asma, artrite reumatoide e cistite intersticial (SANT *et al*, 2007). A ativação dos mastócitos e seu aumento em número tem sido o ponto de correlação dessas células com a evolução da cistite intersticial (RICKARD *et al*, 2005; RANIERI *et al*, 2009). Essa correlação pode estar ligada às substâncias que são liberadas dos grânulos dos mastócitos que causam vasodilatação, contração muscular e estimulação neural (LARSEN *et al*, 2007). Além disso, os mastócitos possuem uma relação espacial de

proximidade com nervos tanto na bexiga normal quanto em bexigas de pacientes com cistite intersticial. Há evidências que os mastócitos podem ser ativados por inúmeros mecanismos na parede da bexiga. O aumento da permeabilidade do urotélio, por exemplo, promove um influxo de íons potássio, o que pode levar a sensibilização de nervos aferentes com consequente ativação de mastócitos, que por sua vez podem ativar nervos aferentes, num ciclo vicioso (SANT *et al*, 2007).

### **Radiação e radioterapia:**

O câncer é um dos principais problemas de saúde pública nos Estados Unidos e em outras partes do mundo. Entre os homens, o câncer de próstata, pulmões, brônquios, colon e reto totalizam 50% dos diagnósticos previstos para 2013. Estima-se que a morbidade do câncer de próstata esteja em torno de 32% (JEMAL *et al*, 2010; 2013).

No Brasil, devido a dimensões territoriais extensas, há uma marcada diferença regional. Estima-se para os anos de 2012 e 2013 a ocorrência de 512.510 novos casos de câncer no sexo masculino com maior incidência para os cânceres de pele não melanoma, próstata, pulmão, colon, reto e estômago. Para o câncer de próstata a estimativa é de 62 novos casos para cada 100 mil habitantes (INCA, 2011).

A radioterapia é o tratamento de câncer através do uso da radiação ionizante. Ao penetrar nas células, a radiação pode causar danos ao DNA. Normalmente, as células tumorais, são mais radiosensíveis que as células sadias devido a sua elevada taxa de divisão celular. O dano provocado pela radiação pode não matar rapidamente células cancerosas ou células sadias (CELADA ALVARES, 2009). O processo patológico da lesão pela radiação inicia-se imediatamente após a exposição, mas alterações clínicas e histológicas podem não ser aparentes por semanas, meses ou anos após o tratamento. Nos pulmões, por exemplo, alterações foram detectadas 6 semanas após a irradiação (STONE, *et al*, 2003).

A radiação ionizante é a energia suficientemente forte para remover um elétron do orbital de energia de um átomo. Essa radiação pode ter formas eletromagnéticas tais como: fótons de alta energia, formas particuladas tais como elétrons, prótons, nêutrons ou partículas alfa. Os fótons de alta energia são as formas mais utilizadas na radioterapia. Fótons criados

eletronicamente, como nos aceleradores lineares, são conhecidos como raios-X (GAZDA, 2004).

O aparelho utilizado para produzir raios-X de alta energia para uso clínico é o acelerador linear. Este aparelho utiliza ondas eletromagnéticas de alta frequência para acelerar partículas carregadas tais como elétrons, até que obtenham alta energia. Essas partículas são aceleradas através de um tubo linear (KHAN,1994).

A dose de radiação absorvida está diretamente relacionada a energia da fonte. Uma medida acurada da dose absorvida é crítica no tratamento com radiação. A deposição de energia nos tecidos resulta em danos no DNA e diminuindo ou erradicando a habilidade da célula se replicar definitivamente. Quando uma pessoa é exposta a radiação, a energia é depositada nos tecidos do corpo. A quantidade de energia depositada por unidade de massa de tecido humano é denominada dose absorvida. A unidade básica da dose absorvida na radiação é denominada Gray (Gy) que substituiu a unidade rad utilizada no passado ( $100 \text{ rads} = 1 \text{ Gy}$ ;  $1 \text{ rad} = 1 \text{ cGy}$ ) (GAZDA, 2004; KHAN,1994).

A radiação ionizante permanece como um das ferramentas mais eficazes no tratamento do câncer. Tem papel importante no controle de doenças malignas abdominais e pélvicas, incluindo próstata, reto, colo do útero, endométrio e bexiga. Apesar dos recentes progressos nos procedimentos radioterápicos, esse tipo de tratamento não resulta apenas em efeitos benéficos. Há dificuldade em restringir a ação da radiação a locais específicos e os efeitos colaterais podem ocorrer em órgãos situados nas proximidades do órgão alvo (REGIMBEAU *et al*, 2001; JAAL e DORR, 2010). A inclusão de estruturas pélvicas normais no campo da irradiação é algumas vezes inevitável, especialmente quando o tumor abrange uma área extensa (JAAL e DORR, 2010).

A radiação pode provocar alterações celulares por ação direta, na qual a radiação interage diretamente com o DNA (ácido desoxirribonucléico) promovendo quebra das fitas o que leva a disfunção celular, ou por ação indireta, através da formação de radicais livres e agentes oxidantes que induzem a resposta celular, causando morte celular (CELADA ALVARES, 2009). A apoptose é uma forma alternativa de morte celular após a irradiação (ROSS, 1999). Estudos com irradiação do sistema nervoso central de roedores mostrou apoptose de 15% das células do endotélio vascular após 24h da dose única de radiação (PENÃ *et al*, 2000).

Segundo Jaal & Door, 2006, os efeitos da radiação em humanos e camundongos compreendem três fases distintas: a) fase aguda reversível que inicia durante o tratamento e desaparece em poucas semanas após o término da radioterapia; b) fase dose dependente,

assintomática com um período de latência de meses a vários anos; c) fase de resposta tardia, progressiva e irreversível (JAAL & DOOR, 2006a).

A bexiga é um dos órgãos mais afetados pelos efeitos colaterais da radioterapia no tratamento de tumores da próstata, útero e reto (POINTREAU *et al*, 2010). Um dos efeitos precoces descritos é a descamação do urotélio, que deixa a mucosa da bexiga vulnerável a traumatismos e infecções. Podem ocorrer também, lesões caracterizadas por edema e inflamação não específica da mucosa, deposição de fibrina, danos vasculares e hemorragia (POINTREAU *et al*, 2010; SOLER *et al*, 2011).

Os sintomas clínicos precoces e tardios provocados pela radiação são causados principalmente pela redução da capacidade de armazenamento do órgão tais como a urgência e aumento da frequência da micção além da cistite provocada pela radiação. (REGIMBEAU *et al*, 2001; JAAL & DOOR, 2010).

No tratamento do câncer de próstata, doses maiores que 70 Gy predizem significativamente complicações no sistema urogenital (HORWITZ, *et al* 2000). Homens que receberam radiação como tratamento do câncer de próstata tiveram um aumento significativo do risco de desenvolvimento do câncer de bexiga quando comparados aos que realizaram prostatectomia radical (NIEDER *et al*, 2008).

Os modelos experimentais que utilizam ratos mostraram que a dose de 1100 cGy na região abdominal foi capaz de produzir alterações consideráveis na parede colônica e enterite, que em sua forma aguda tem grande relevância, pois é um dos fatores que determinam a interrupção do tratamento em humanos (DIESTEL *et al* 2005; 2007). Essa mesma dose foi suficiente também para causar um decréscimo significativo na matriz extracelular e no músculo liso da parede vesical (ROCHA, *et al*, 2011).

### **L-glutamina:**

A L- glutamina é o aminoácido mais abundante do corpo e tem como fonte primária o músculo esquelético, de onde é liberado para a corrente sanguínea e transportado para vários tecidos (NEWSHOLME *et al* 2003; PITHON-CURI, *et al*, 2003; CURI, *et al* 2005). A concentração intracelular da glutamina varia dependendo do tipo celular entre 2 e 20 mM, enquanto sua concentração na matriz extracelular é em média 0,7 mM (NEWSHOLME *et al*, 2003). Embora seja considerado um aminoácido não essencial torna-se condicionalmente

essencial pelo aumento de sua demanda em situações catabólicas (WANG *et al*, 2009). Um aminoácido condicionalmente essencial é aquele que não é essencial em condições de saúde, porém durante certas patologias é necessário em quantidades maiores que a taxa de síntese endógena (LACEY e WILMORE, 1990). A glutamina serve como fonte de energia para o metabolismo celular mantendo normais as funções de células e tecidos. Células de replicação rápida tais como enterócitos e fibroblastos apresentam altas taxas de consumo de glutamina (CURI *et al*, 2005). É precursor essencial na biossíntese de nucleotídeos, glicose, amino açúcares, glutathiona e participa da homeostase e da síntese de proteínas além de ser o mais importante carreador de nitrogênio do organismo (BODE, 2001). A glutamina sintase e a glutaminase são enzimas responsáveis diretas pela síntese e degradação da glutamina respectivamente. O produto imediato do metabolismo da glutamina é o glutamato (Figura 7), que é produzido pela ação da glutaminase (NEWSHOLME *et al*, 2003).

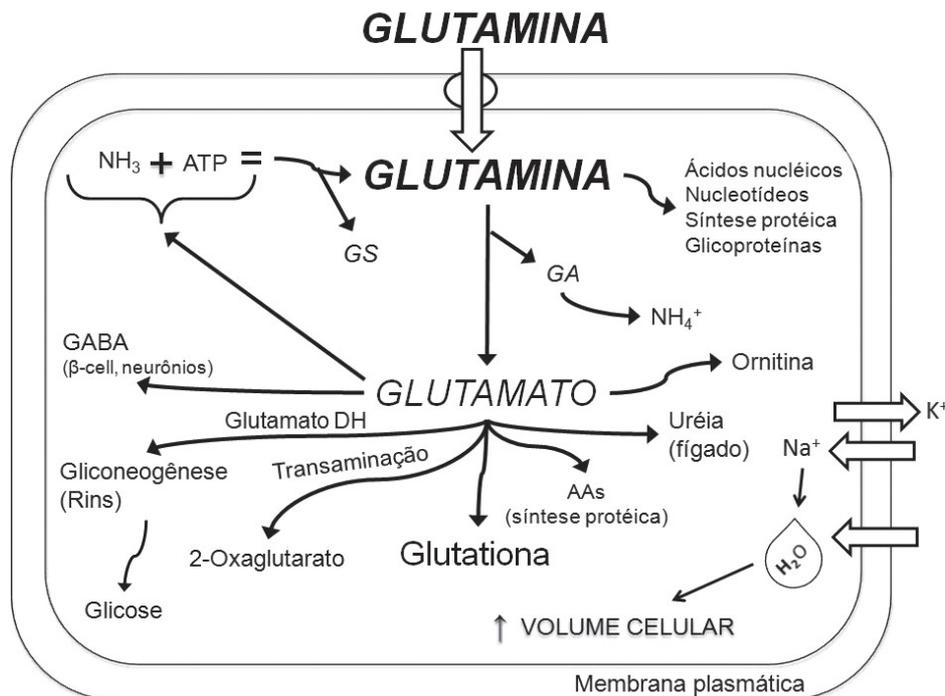


Figura 7- Metabolismo da glutamina. Sob ação da enzima glutaminase (GA) a glutamina forma glutamato. O glutamato pode ser convertido no aminoácido  $\gamma$ -amino butirico (GABA), 2-oxaglutarato, glicose, ornitina, ureia, síntese de outros aminoácidos (AAs) ou glutathiona. Na associação de amônia ( $\text{NH}_3$ ) e trifosfato de adenosina (ATP), sob a ação da enzima glutamina sintetase (GS), ocorre a formação de glutamina.  $\text{NH}_4^+$  = íon amônio,  $\text{Na}^+$  = sódio,  $\text{K}^+$  = potássio. Modificado de NEWSHOLME *et al* (2003). Fonte:Retirado de (CRUZAT, 2009).

Estudos recentes sugerem que glutamina é um substrato chave para o crescimento anabólico de células de mamíferos. Em lesões teciduais, sepse e estados inflamatórios, há um aumento do consumo tecidual da glutamina, que pode estar além da quantidade disponibilizada pelo músculo estriado esquelético (WISE & THOMPSON, 2010; LACEY & WILMORE, 1990).

A suplementação com glutamina pode ser administrada por via oral ou intravenosa (SAVARESE *et al*, 2003). Glutamina em pó é a suplementação de escolha pelo seu baixo custo além de ser segura, bem absorvida e bem tolerada. Não possui odor e pode ser misturada a qualquer bebida ou dissolvida em água (SAVARESE *et al*, 2003; KUHN *et al*, 2010).

A glutamina protege a mucosa intestinal contra efeitos tóxicos da radioterapia combatendo a enterite e diarreia em pacientes que recebem radiação ionizante ou tratamento quimioterápico (SAVARESE, 2003). A suplementação com L-glutamina reduz a morbidade e a mortalidade nas doenças graves (WISCHMEYER, 2008) e seu uso mostrou-se eficaz no reparo da parede colônica de ratos irradiados (DIESTEL *et al*, 2007) e na prevenção de esofagite em pacientes com câncer de pulmão tratados por radioquimioterapia (ALGARA *et al*, 2007; KAUFMANN *et al*, 2008). A administração de dieta rica em glutamina antes da radiação abdominal exerceu efeito radioprotetor na mucosa intestinal de ratos, acelerando a cicatrização além de prevenir a translocação bacteriana e a perda de peso dos animais com efeito benéfico também na proteção do pâncreas (ERSIN *et al*, 2000; ERBIL *et al*, 2005).

O crescimento de tumores produz um estado de estresse fisiológico caracterizado por deficiência relativa de glutamina (ALGARA *et al*, 2007). Algumas linhagens de células cancerosas necessitam de glutamina como substrato primário para a manutenção do potencial de membrana e suporte na produção de NADPH (WISE e THOMPSON, 2010).

Em humanos, doses de até 0,65g/kg de peso mostraram-se seguras e bem toleradas por pacientes com câncer em tratamento quimioterápico, além de não alterar os níveis de amônia plasmática (WARD *et al*, 2003).

A utilização da suplementação com aminoácidos já se mostrou eficaz na proteção de órgãos contra os efeitos da radioterapia e pode ser uma opção de baixo custo (SAVARESE *et al*, 2003).

## **1 JUSTIFICATIA E OBJETIVO**

A justificativa do presente trabalho parte do pressuposto que a radiação, frequentemente utilizada para o tratamento do câncer de próstata, pode afetar de alguma forma a bexiga. A utilização de um agente radioprotetor poderia minimizar esse efeito indesejado. Portanto, nosso objetivo é verificar o possível efeito protetor da L-glutamina no urotélio, células da lâmina própria e vasos sanguíneos da mucosa da bexiga de ratos submetidos à irradiação.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1- Animais:

Foram utilizados 40 ratos Wistar machos com idade entre 3 e 4 meses, provenientes do Biotério do Laboratório de Cirurgia Experimental da Faculdade de Ciências Médicas (UERJ). O experimento foi realizado no Laboratório de Pesquisa Urogenital (UERJ). Os animais foram mantidos em condições ambientais controladas de temperatura ( $23\pm 2^{\circ}\text{C}$ ) e ciclo claro escuro constantes (12 horas cada) e alimentados com ração comercial apropriada para a espécie e água *ad libitum* durante todo o experimento. O modelo experimental foi aprovado pelo comitê de ética da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (Anexo A).

### 2.2- Modelo experimental:

Os animais foram divididos aleatoriamente em 5 grupos.

- Grupo controle (C): Animais não irradiados e gavados com 5ml de água filtrada durante todo o experimento e mortos no 21<sup>o</sup> dia após o início do experimento (n= 8).
- Grupo irradiado 7 dias (R7): Animais gavados com 5ml de água filtrada durante todo o experimento (15 dias). No 7<sup>o</sup> dia após o início do experimento foram irradiados. Os animais foram mortos 7 dias após a irradiação (n=8).
- Grupo irradiado 15 dias (R15): Animais gavados com 5ml de água filtrada durante todo o experimento (21 dias). No 7<sup>o</sup> dia após o início do experimento foram irradiados. Os animais foram mortos 15 dias após a irradiação (n=8).
- Grupo irradiado e suplementado 7 dias (RG7): Animais gavados com L-glutamina diluída em água (0,65/kg de peso) perfazendo volume final de 5ml durante todo o experimento (15 dias). No 7<sup>o</sup> dia após o início do experimento foram irradiados. Os animais foram mortos 15 dias após a irradiação (n=8).
- Grupo irradiado e suplementado 15 dias (RG15): Animais gavados com L-glutamina diluída em água (0,65/kg de peso) perfazendo volume final de 5ml durante todo o experimento (21 dias). No 7<sup>o</sup> dia após o início do experimento foram irradiados. Os animais foram mortos 15 dias após a irradiação (n=8).

### 2.3- Método de irradiação:

Os animais dos grupos irradiados 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 2100, Varian, Palo Alto. EUA). A dose foi liberada a uma distância fonte pele de 100cm, a uma taxa de 2,4 Gy/ minuto para 4,16 minutos e visava à região pélvico-abdominal (anexo B), enquanto outros campos estavam protegidos (Figuras 8 e 9). 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 8- Animais imobilizados em recipientes plásticos cilíndricos e posicionados no acelerador para o recebimento da dose única de 10Gy de irradiação.  
Fonte: Medeiros-Jr, 2010.



Figura 9 – Posicionamento dos animais no acelerador com seleção do campo irradiado. Fonte: Medeiros-Jr, 2010.

#### 2.4- Suplementação dos animais:

Os animais dos grupos RG7 e RG15 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, na dose de 0,65g/kg de peso, diluída em água, perfazendo um volume final de 5ml. A via de administração foi orogástrica com uso de sonda metálica (Figura 10) (ERSIN *et al*, 2000; DIESTEL *et al*, 2007).

Os grupos RC, R7 e R15 não receberam suplementação e foram gavados com 5ml de água filtrada no mesmo período.



Figura 10- Suplementação com L-glutamina por via orogástrica com utilização de sonda metálica. Fonte: Medeiros-Jr, 2010.

## 2.5- Morte dos animais:

Os animais foram mortos no 7º e 15 º dias após a irradiação conforme descrito anteriormente. Foi utilizada sobredose (30-50 mg/ Kg) de tiopental sódico (Tiopentax-Cristália, São Paulo, Brasil) via intraperitoneal.

## 2.6- Análise estrutural:

### 2.6.1- Procedimentos Histológicos

As bexigas foram retiradas (Figura 11), lavadas em solução salina (0,9% NaCl) e parte dela foi fixada por imersão em formalina a 4% em tampão fosfato salino (PBS) pH8,0 para processamento e análise à microscopia de luz.

O material foi processado para inclusão em parafina seguindo as técnicas histológicas de rotina: desidratado em álcool e clarificado em xilol para posterior inclusão em parafina.

Foram feitos cortes histológicos com 5  $\mu\text{m}$  de espessura e corados pela Hematoxilina-Eosina para verificar a integridade tecidual, azul de toluidina para a quantificação dos mastócitos e tricrômico de Masson utilizado para análise da altura e densidade nuclear do urotélio, e análises de componentes da lâmina própria.

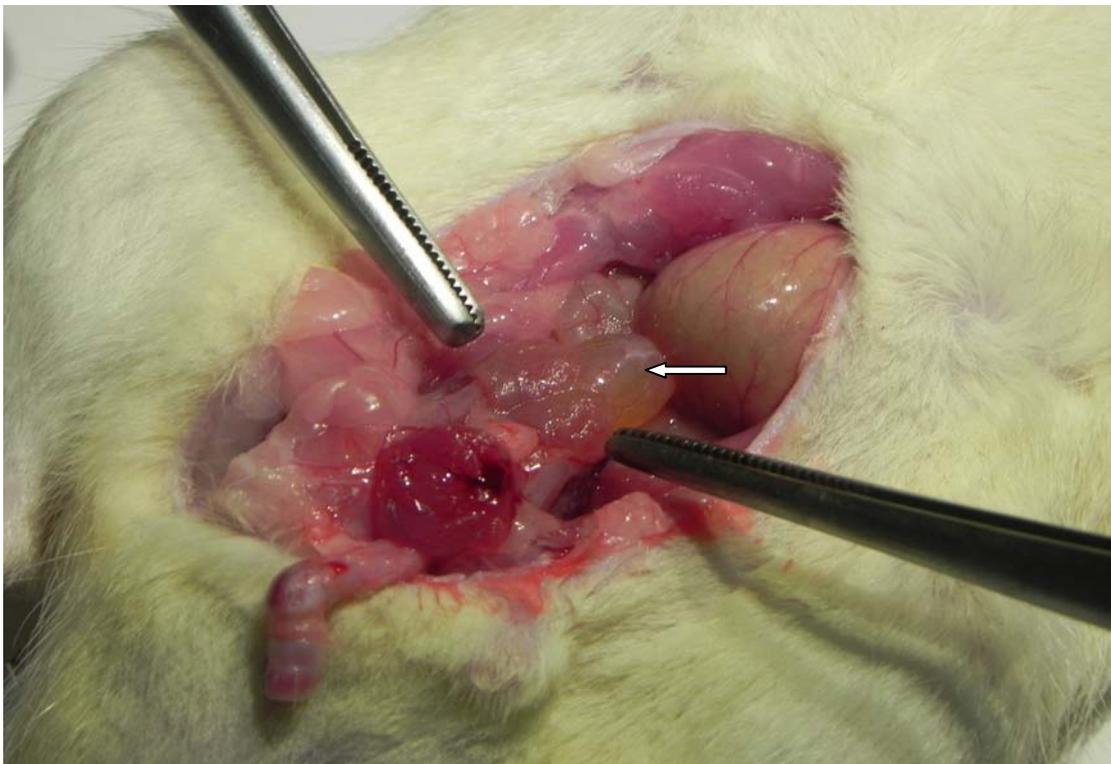


Figura 11- Dissecção do sistema urogenital do rato. A seta aponta para a bexiga urinária.

### 2.6.2- Imunofluorescência

Foi realizada a técnica de imunofluorescência indireta para a identificação e análise das células endoteliais da microvascularização da lâmina própria e dos miofibroblastos com uso dos seguintes anticorpos primários: anticorpo monoclonal anti-mouse anti- $\alpha$  actina de músculo liso pré diluído (Zymed Laboratórios Carlsbad, CA, EUA) e anticorpo policlonal anti-rabbit CD 31 (Abcm ab28364- Cambridge, MA, EUA) em concentração 1:30 .

A recuperação de sítios antigênicos foi feita com Tris EDTA pH 9,0 (em estufa a 60° por 24 horas). Os cortes foram permeabilizados com tween 20 (Roche) e o bloqueio para grupamentos aldeídicos foi feito com soluções de Cloreto de amônio 50mM e glicina a 2% com duração de 30 min cada. Após lavagens com PBS pH 8.0, foram realizados bloqueios para sítios inespecíficos com utilização de PBS albumina sérica bovina (BSA) 3% e leite desnatado a 10%. O anticorpo primário foi incubado *overnight* a 4°C e após esse período os cortes foram lavados em banhos sucessivos de PBS pH 8.0. Posteriormente foi realizado o bloqueio com PBS BSA 3% por 15 minutos e incubação com o anticorpo secundário fluorescente *Alexa Fluor 488* ® goat anti -rabbit IgG (Invitrogen, A-11001 Camarillo, CA, EUA) na concentração de 1:50 por 1 hora em temperatura ambiente. Logo após foram realizados 3 banhos de 5 minutos em PBS pH 8.0 e os núcleo celulares foram evidenciados com DAPI (4'6- diamino-2-phenylindole, dihydrochloride), Invitrogen, número do catálogo D1306 por 15 minutos e lavagem com 3 banhos de 5 minutos de água destilada, azul de Evans por 10 minutos e montagem com utilização Slowfade antifade kit (Invitrogen, S2828, Camarillo, CA, EUA) e observados no microscópio confocal a laser Zeiss S510.

### 2.7- **Análise das imagens e avaliação morfológica**

Todos os cortes de tecidos utilizados para microscopia de luz foram fotografados sob as mesmas condições e as imagens capturadas com a resolução 2040 X 1536 pixels, com câmera digital (Olympus DP70, Tóquio, Japão) acoplada ao microscópio de luz (Olympus BX51, Tóquio, Japão) e transferidas para o computador.

Para cada variável morfométrica foram utilizados 5 cortes histológicos com captura de imagens de 5 campos aleatórios, perfazendo um total de 25 campos por animal.

## **2.8- Morfometria:**

A avaliação morfométrica da altura e densidade nuclear do epitélio da bexiga foram realizadas com um aumento final de 1000X.

### **2.8.1- Altura do epitélio**

Para a avaliação morfométrica da altura do epitélio, foi utilizada a ferramenta “straight line selection” do programa Image J 1.41 (National Institute of Health, Bethesda, MD, USA). Para realizar as medições da altura do epitélio (Figura 12) o parâmetro utilizado foi traçar linhas retas aleatórias do polo basal do epitélio (em contato com a membrana basal), até o polo apical (voltado para a luz do órgão). Foram realizadas 10 medidas lineares para cada corte.

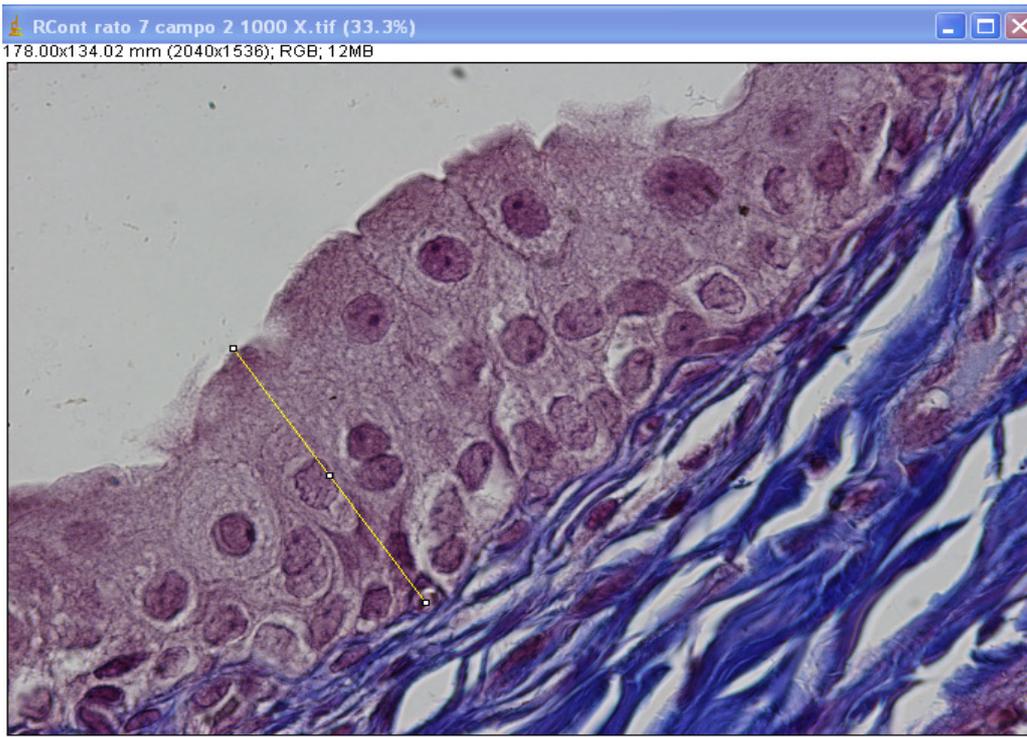


Figura 12- Utilização do software image J para morfometria do urotélio. Tricrômico de Masson. 1000X.

### 2.8.2: Densidade nuclear do epitélio

A densidade nuclear foi realizada através da delimitação de área no urotélio (Figura 13) e contagem de todos os núcleos celulares da mesma (Figura 14), com a ferramenta cell counter do programa Image J 1.41 (NHI, Bethesda, MD, USA). Os resultados foram obtidos a partir do número de núcleos das células epiteliais dividido pela área selecionada e expressa em núcleos por  $\text{mm}^2$ .

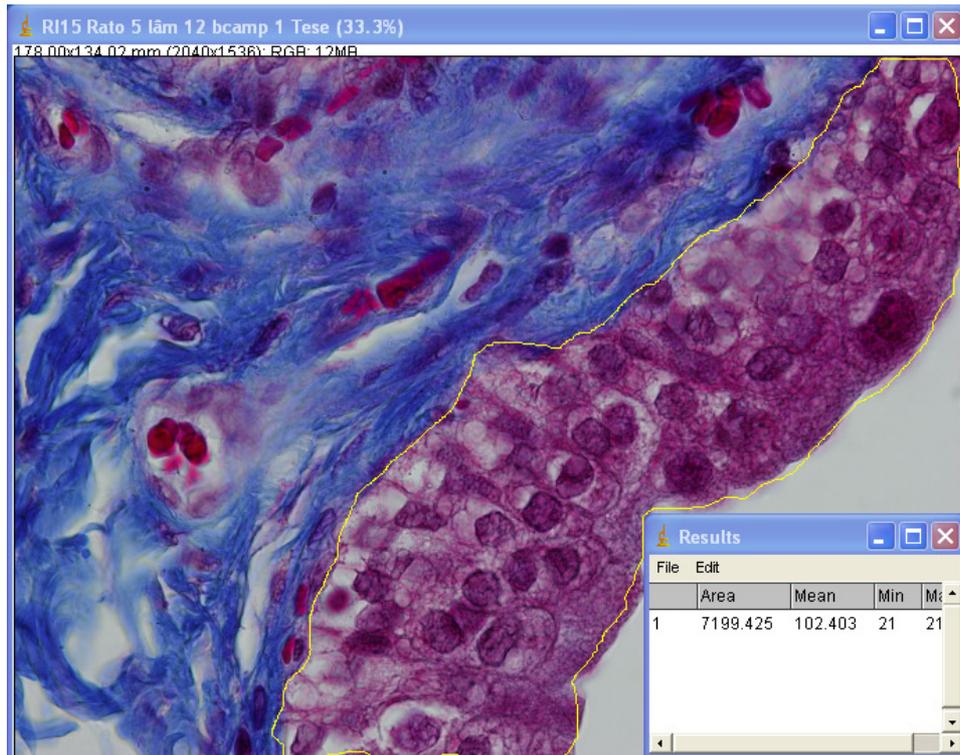


Figura 13- Seleção da área do epitélio e o valor da área a ser quantificada. Tricrômico de Masson. 1000X.

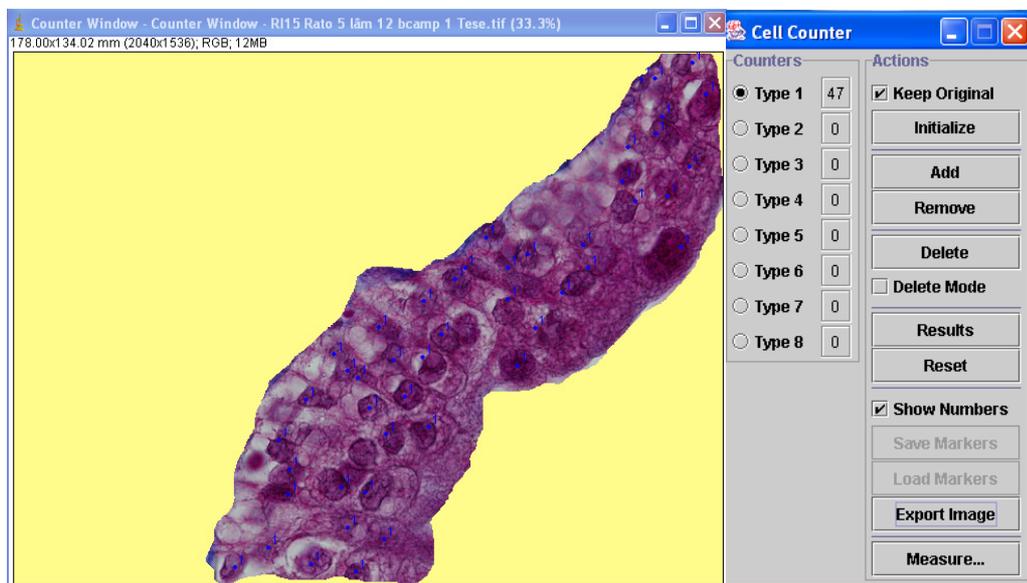


Figura 14- Separação da área previamente marcada e utilização da ferramenta “cell counter”. Tricrômico de Masson. 1000X.

### 2.8.3- Densidade celular da lâmina própria

A densidade celular da lâmina própria foi feita através de fotomicrografias capturadas utilizando o aumento de 1000X. O parâmetro utilizado para a captura de imagens foi o tecido conjuntivo imediatamente abaixo da base do urotélio. As análises foram feitas através do método morfométrico, com a ferramenta cell counter do programa Image J 1.41 (NHI, Bethesda,MD, USA). Todos os núcleos celulares do campo foram contados (Figura 15). Os resultados foram expressos em número de células da lâmina própria por mm<sup>2</sup>.

### 2.8.4- Densidade dos vasos sanguíneos da lâmina própria

A densidade celular dos vasos sanguíneos foi feita através de fotomicrografias capturadas utilizando o aumento de 1000X. A base do urotélio foi utilizada como parâmetro para a captura das imagens. As análises foram feitas através do método morfométrico, com a ferramenta cell counter do programa Image J 1.41 (NHI, Bethesda,MD, USA) com contagem de todos os vasos sanguíneos do campo (Figura 15). Os resultados foram expressos em número vasos sanguíneos por mm<sup>2</sup>.

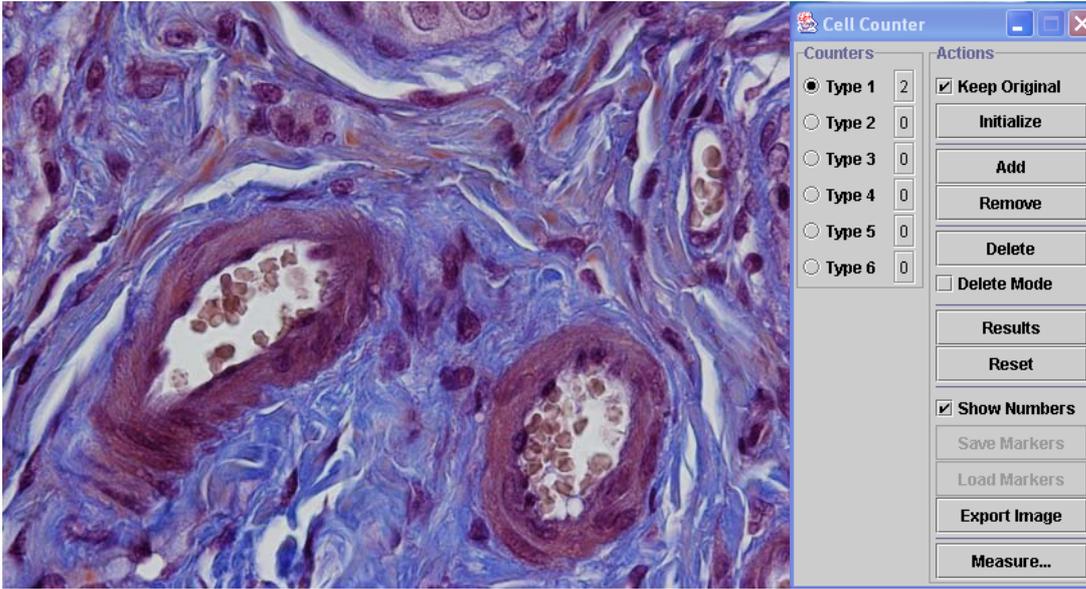


Figura 15- Densidade celular dos vasos sanguíneos e da lâmina própria. Tricrômico de Masson. 1000X.

## 2.9- Análise estatística

A análise estatística foi feita através do software *Grafpad prism 4* (GrafPad software, Inc. CA, EUA) sendo realizado para a comparação das médias entre todos os grupos o teste estatístico one-way (ANOVA) e pós teste de Bonferroni para múltiplas comparações. A significância considerada foi  $p < 0,05$  (SOKAL, 1995).

### 3 RESULTADOS

Nos grupos irradiados e mortos após 7 dias, a radiação não afetou a altura, a densidade celular do epitélio nem a densidade celular da lâmina própria (Tabela 1) e (Figuras 16, 17, 18 e 19). Entretanto, a densidade dos vasos sanguíneos da lâmina própria foi alterada pela radiação ( $p < 0,025$ ). Nos animais irradiados sem suplementação a densidade vascular diminuiu 48% ( $p < 0,05$ ) comparada ao grupo controle. No grupo irradiado e suplementado (RG7) a densidade vascular permaneceu semelhante ao grupo controle (Tabela 1) e (Figura 20). Por outro lado, nos animais mortos 15 dias após a irradiação, a densidade dos vasos sanguíneos da lâmina própria não foi alterada (Tabela 2). A altura e a densidade celular do epitélio foram alteradas significativamente ( $p < 0,01$  e  $p < 0,025$  respectivamente) (Tabela 2) e (Figuras 16e17). No grupo irradiado sem suplementação (R15), a densidade celular do epitélio aumentou 35% ( $p < 0,02$ ). Entretanto, o valor dessa variável no grupo suplementado (RG15) não foi significativamente diferente do grupo irradiado sem suplementação (R15), o que mostra que não houve ação protetora da glutamina na densidade celular do epitélio (Tabela 2) e (Figura 17).

A densidade celular da lâmina própria não apresentou diferença estatística entre os grupos mortos 15 dias após a irradiação (Figura 19). A análise da densidade dos mastócitos teve como base as médias e o número total por grupo (Tabela 3). Os resultados sugerem um efeito protetor no grupo RG15.

A análise da lâmina própria dos cortes marcados por imunofluorescência para a  $\alpha$ -actina de músculo liso mostrou positividade limitada a células alongadas que formavam uma camada de espessura variável localizadas imediatamente abaixo do epitélio e foram identificadas como miofibroblastos subroteliais (Figura 21 e 22). Houve um aumento do número de miofibroblastos no grupo R7 quando comparado ao grupo controle. O grupo RG7 foi semelhante ao grupo controle. No grupo R15 os miofibroblastos apresentaram uma diminuição da marcação e no grupo RG15 foi observada uma semelhança em relação ao controle (Figura 21).

A marcação de vasos sanguíneos pelo CD 31 mostrou que no grupo R 7 ocorreu uma diminuição da fluorescência quando comparada ao grupo controle. Nos grupos RG7 e RG15 a marcação foi semelhante ao grupo controle. No grupo R15 houve recuperação da marcação voltando a ser semelhante ao controle (Figura 23).

Tabela 1- Resultados numéricos dos parâmetros analisados após 7 dias.

	C	R7	RG7	ANOVA
Altura do epitélio (µm)	42,82 ± 10,13	38,66 ± 4,14	38,74 ± 3,10	p> 0,05
Densidade celular do epitélio (núcleos/mm <sup>2</sup> )	5,91 ± 1,51	6,15 ± 0,77	6,32 ± 0,44	p> 0,05
Densidade celular da lâmina própria (núcleos/mm <sup>2</sup> )	52,13 ± 11,32	55,48 ± 9,29	53,04 ± 15,39	p> 0,05
Densidade dos vasos sanguíneos (vasos/mm <sup>2</sup> )	55,20 ± 20,09	29,00 ± 8,28 p< 0,05	50,00 ± 9,43 p< 0,02	p< 0,025

Tabela 2- Resultados numéricos dos parâmetros analisados após 15 dias.

	C	R15	RG15	ANOVA
Altura do epitélio (µm)	42,82 ± 10,13	32,03 ± 7,85 p< 0,05	51,31 ± 9,74 p< 0,01	p< 0,01
Densidade celular do Epitélio (núcleos/mm <sup>2</sup> )	5,91 ± 1,51	7,99 ± 1,11 p< 0,02	6,84 ± 1,45	p< 0,025
Densidade celular da lâmina própria (núcleos/mm <sup>2</sup> )	52,13 ± 11,32	50,60 ± 8,61	50,62 ± 14,26	p> 0,05
Densidade dos vasos sanguíneos (vasos/mm <sup>2</sup> )	55,20 ± 20,09	59,20 ± 13,61	64,60 ± 6,91	p> 0,05

Tabela 3- Número de mastócitos da lâmina própria por mm<sup>2</sup>

	C	R7	RG7	R15	RG15
Média ± SD	5,2±3,3	1,4±1,1	1,4±1,9	1,0±1,0	3,8±2,9
Total	26,0	7,0	7,0	5,0	19,0

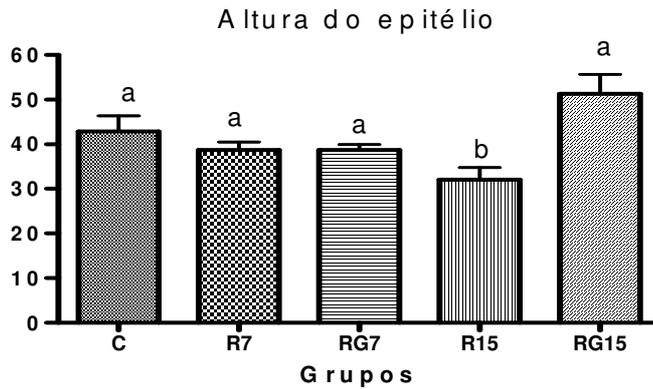


Figura 16- Análise morfométrica da altura do epitélio.  $p < 0,05$ . C- Grupo Controle; R7- Grupo 7 dias após a irradiação; RG 7- Grupo suplementado e irradiado 7 dias; R15- Grupo 15 dias após a irradiação; RG15- Grupo suplementado e irradiado 15 dias. Os gráficos representam as médias e SD. Os dados foram analisados pelo método one-way ANOVA seguida de pós teste de Bonferroni. Letras diferentes indicam diferença estatística.

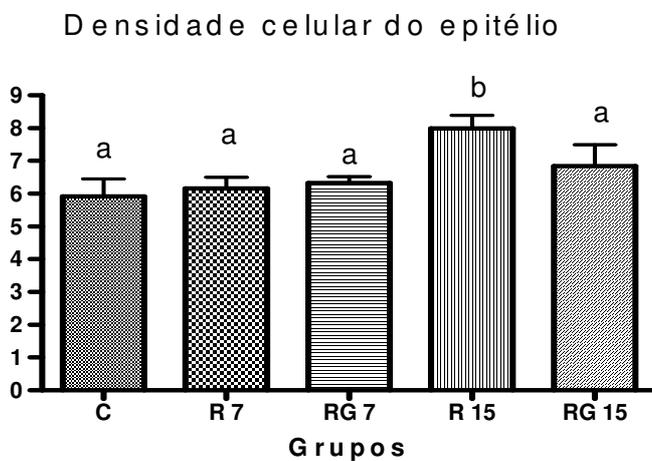


Figura 17- Análise morfométrica da densidade das células do epitélio.  $P < 0,05$ . C- Grupo Controle; R7- Grupo 7 dias após a irradiação; RG 7- Grupo suplementado e irradiado 7 dias; R15- Grupo 15 dias após a irradiação; RG15- Grupo suplementado e irradiado 15 dias. Os gráficos representam as médias e SD. Os dados foram analisados pelo método one-way ANOVA seguida de pós teste de Bonferroni. Letras diferentes indicam diferença estatística.

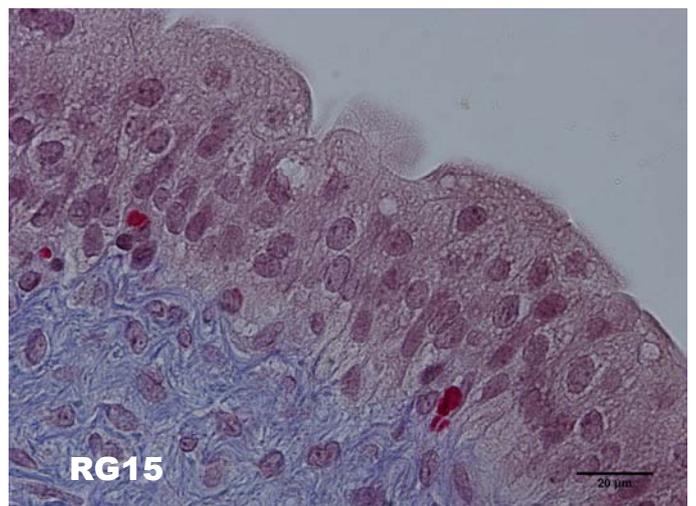
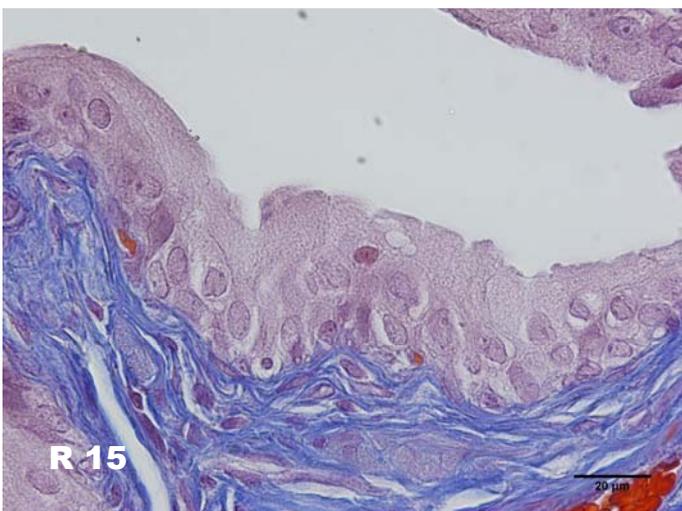
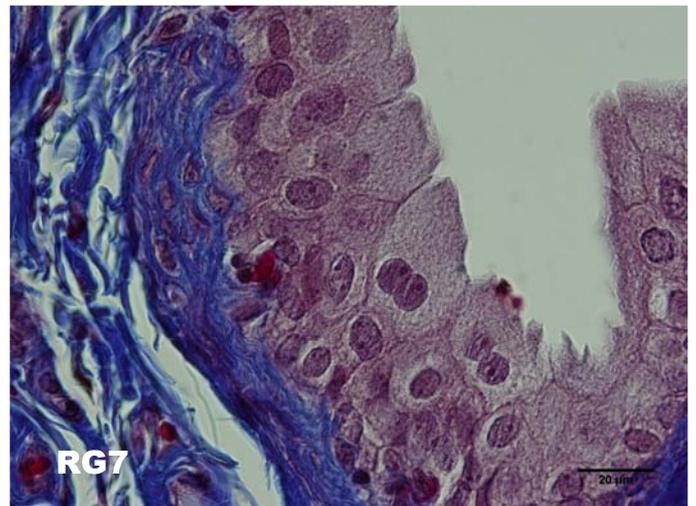
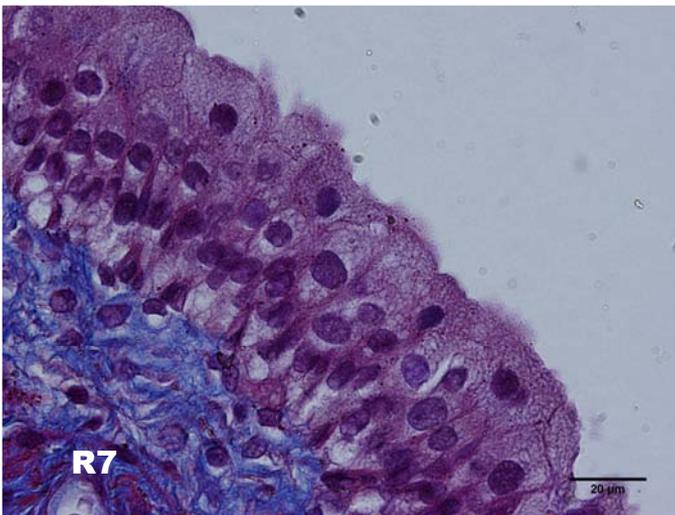
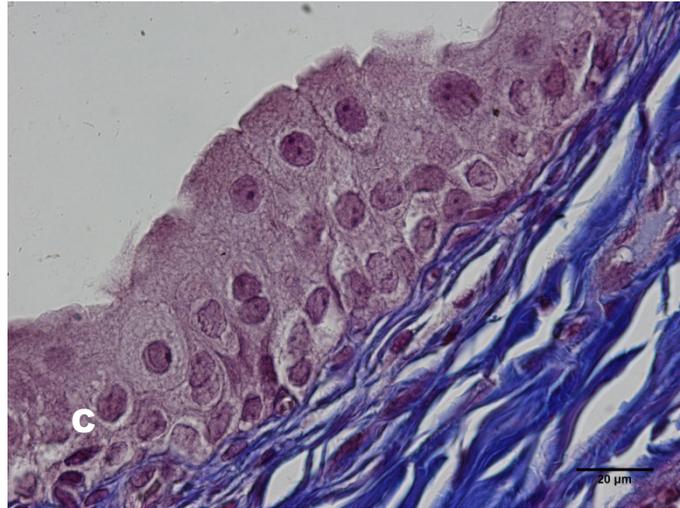


Figura 18- Fotomicrografias da mucosa da bexiga representando a altura do epitélio nos diferentes grupos C- Grupo Controle; R7- Grupo 7 dias após a irradiação; RG 7- Grupo suplementado e irradiado 7 dias; R15- Grupo 15 dias após a irradiação; RG15- Grupo suplementado e irradiado 15 dias. Tricrômico de Masson. Aumento 1000X.

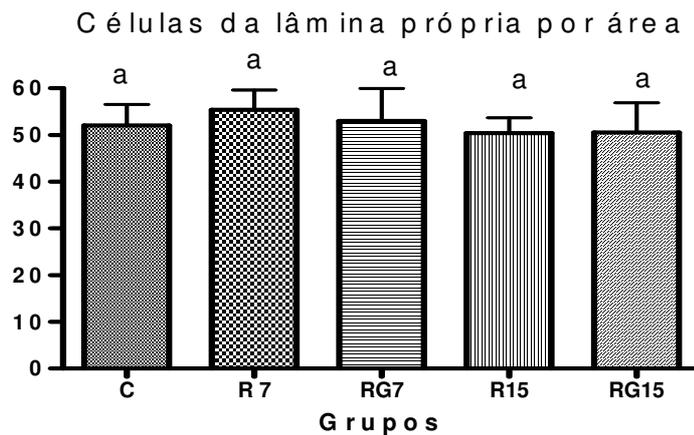


Figura 19- Análise morfométrica das células da lâmina própria.  $P < 0,05$ . C- Grupo Controle; R7- Grupo 7 dias após a irradiação; RG 7- Grupo suplementado e irradiado 7 dias; R15- Grupo 15 dias após a irradiação; RG15- Grupo suplementado e irradiado 15 dias. Os gráficos representam as médias e SD. Os dados foram analisados pelo método one-way ANOVA seguida de pós teste de Bonferroni. Letras diferentes indicam diferença estatística.

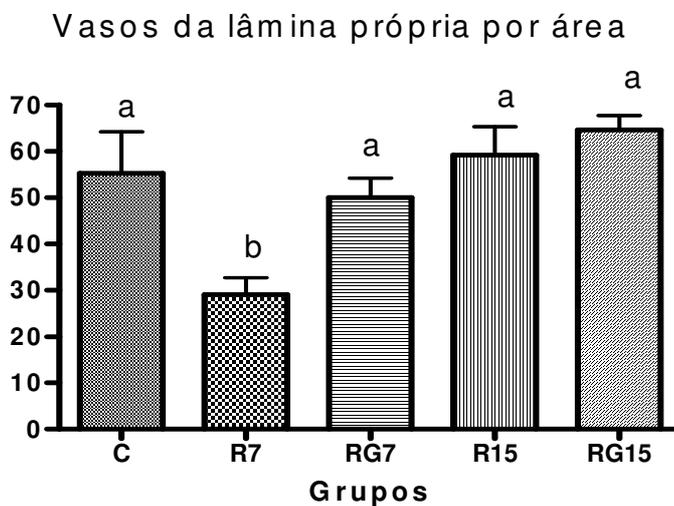


Figura 20- Análise morfométrica da densidade dos vasos sanguíneos da lâmina própria.  $p < 0,05$ . C- Grupo Controle; R7- Grupo 7 dias após a irradiação; RG 7- Grupo suplementado e irradiado 7 dias; R15- Grupo 15 dias após a irradiação; RG15- Grupo suplementado e irradiado 15 dias. Os gráficos representam as médias e SD. Os dados foram analisados pelo método one-way ANOVA seguida de pós-teste de Bonferroni.

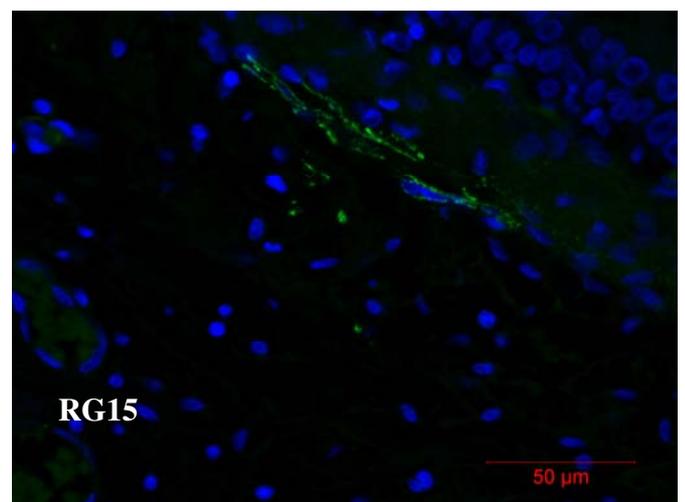
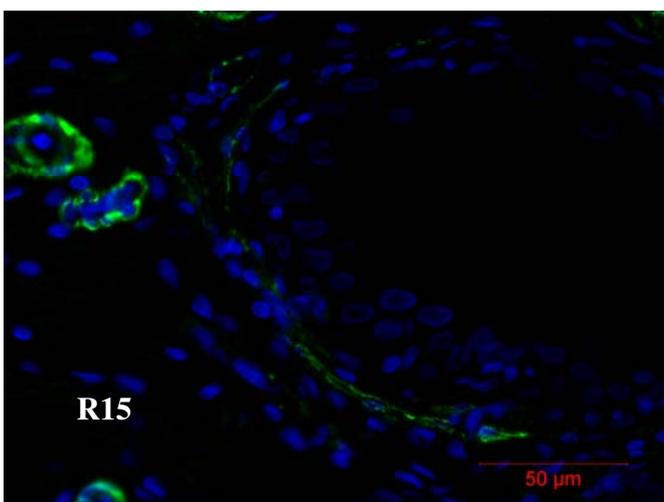
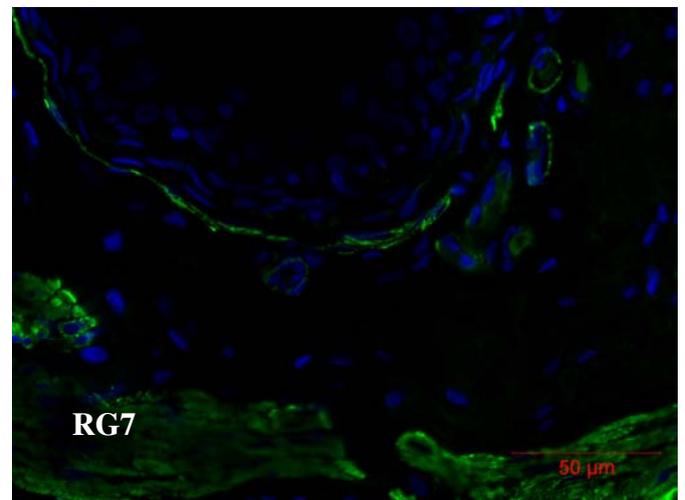
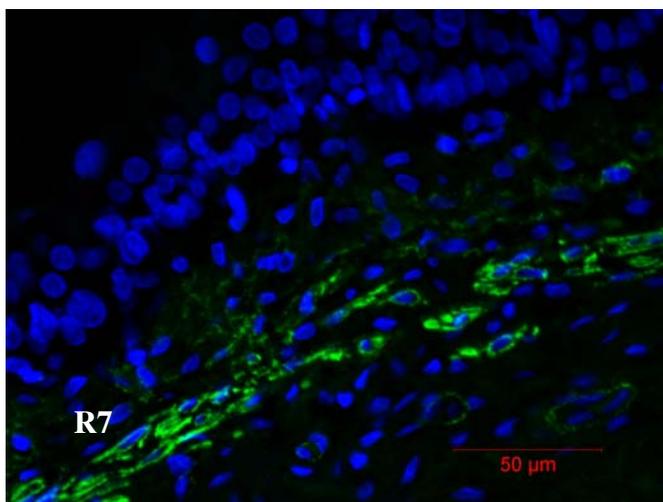
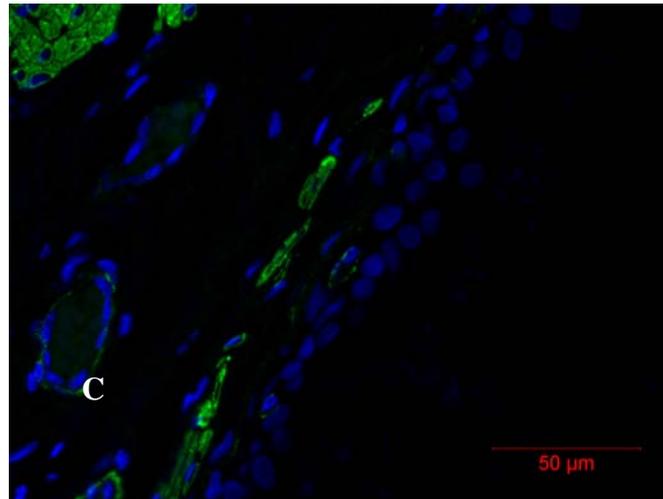


Figura 21- Imunofluorescência anti  $\alpha$ -actina SM. Miofibroblastos da lâmina própria marcados (verde). Grupo R7 com marcação bem mais acentuada que os demais grupos. C- Grupo Controle; R7- Grupo 7 dias após a irradiação; RG 7- Grupo suplementado e irradiado 7 dias; R15- Grupo 15 dias após a irradiação; RG15- Grupo suplementado e irradiado 15 dias. Microscópio confocal. Aumento 400X.

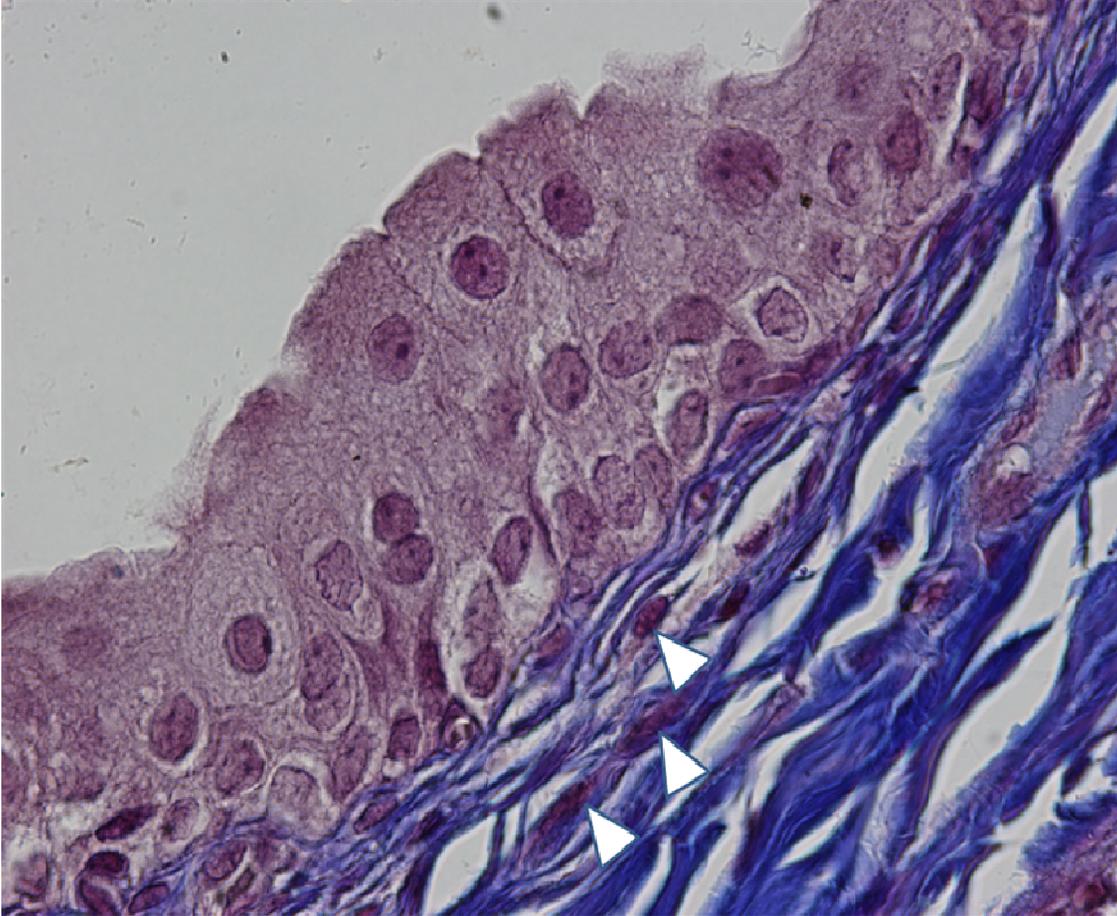


Figura 22- Fotomicrografia da mucosa da bexiga: Grupo R7 .Observamos o epitélio e a lâmina própria com os miofibroblastos suburoteliais marcados (cabeças de setas). Tricrômico de Masson. Aumento1000X.

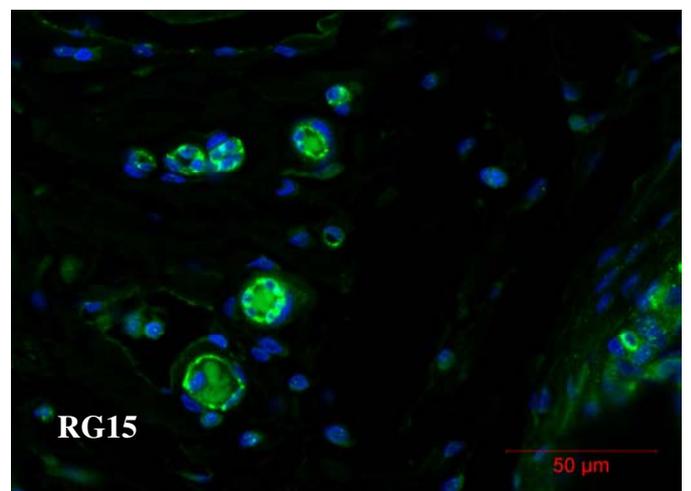
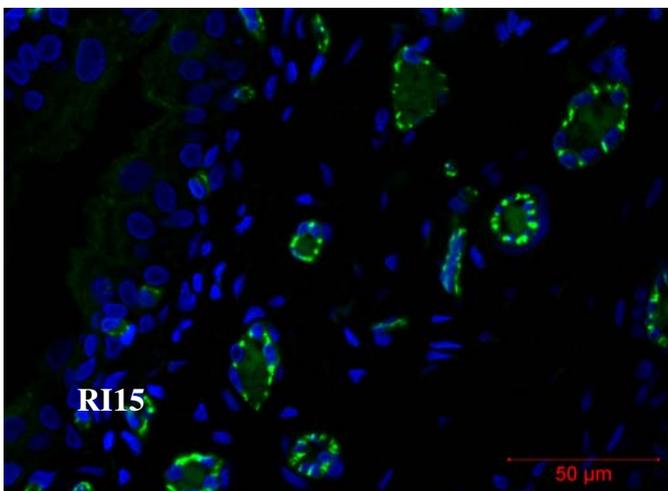
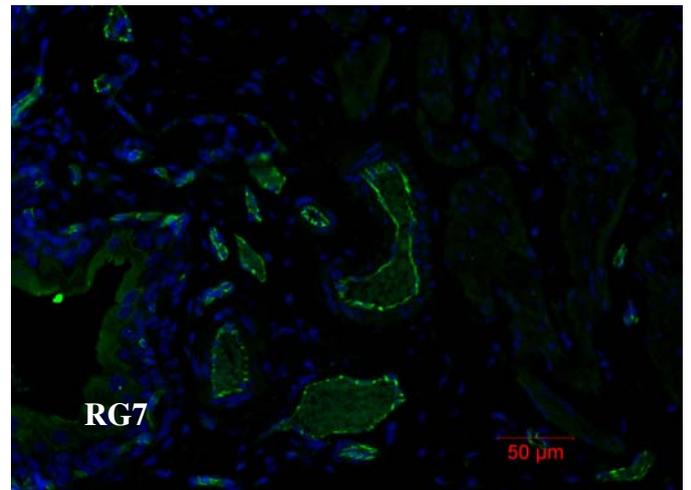
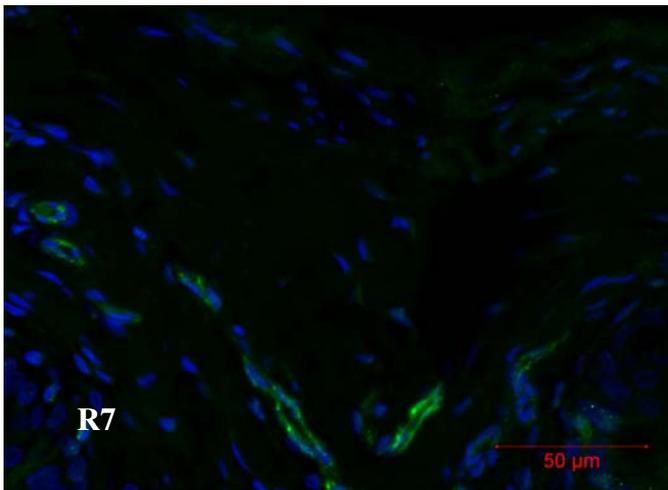
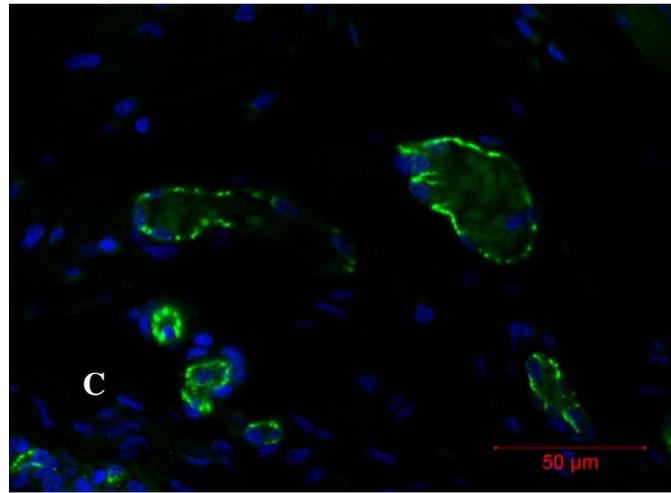


Figura 23- Imunofluorescência anti CD 31. Endotélio dos vasos sanguíneos da lâmina própria marcados (verde). Grupo R7 com marcação bem menos acentuada que os demais grupos. C- Grupo Controle; R7- Grupo 7 dias após a irradiação; RG 7- Grupo suplementado e irradiado 7 dias; R15- Grupo 15 dias após a irradiação; RG15- Grupo suplementado e irradiado 15 dias. Microscópio confocal. Aumento 400X.

## 4 DISCUSSÃO

A radiação ionizante é uma das ferramentas mais utilizadas na terapia contra o câncer. No entanto a radiosensibilidade celular é variável e os mecanismos envolvidos ainda são alvos de estudos (ROSS, 1999). Antonakopoulos, 1982 mostrou que o urotélio de bexigas de ratas submetidas a 20 Gy de radiação mostraram após um mês, aparência normal exceto pelo aumento do número de lisossomos e de algumas células binucleadas da camada basal (ANTONAKOPOULOS *et al*, 1982). Segundo Jaal e Door, 2010, camundongos submetidos a 20 Gy de radiação tiveram um decréscimo no número total de células uroteliais no 13º dia com ligeira recuperação no 22º dia e diminuição do número de células em todas as camadas do urotélio principalmente nas células globosas superficiais (JAAL e DORR, 2006 b; 2010). Esses resultados indicaram que o urotélio da bexiga apresentou resultados diferentes de acordo com o tempo pós-irradiação no experimento. Nossos resultados mostraram também que as alterações estão na dependência do tempo uma vez que o urotélio sofreu uma diminuição significativa de sua altura no grupo R15 e não sofreu alteração no grupo R7 o que caracteriza uma resposta um pouco mais tardia do epitélio à radiação. A dose de 10 Gy, utilizada em nosso trabalho (CHUN *et al*, 1997), pode ser considerada uma dose intermediária entre baixas doses que variam de 0,015 a 2 Gy (KIM *et al*, 2007) e doses altas de 30 a 45 Gy (LEROUXEL *et al*, 2009).

A L- glutamina foi relacionada com diferentes efeitos biológicos atuando na expressão gênica e induzindo alterações no volume celular (HAUSSINGER *et al*, 2001; CURI *et al*, 2005). Em algumas células a glutamina promove um aumento de volume, pois é co-transportada com o Na<sup>+</sup> para o interior das células com saída concomitantemente de K<sup>+</sup> criando um gradiente osmótico intracelular (HAUSSINGER, 1996). Como o grupo RG15 manteve a altura do urotélio semelhante ao grupo controle uma das possibilidades é que isto tenha ocorrido graças a ação da L- glutamina exercendo a hidratação das células uroteliais com consequente manutenção do volume celular manutenção do mesmo padrão do grupo controle.

A lâmina própria da bexiga possui uma área rica em pequenos vasos sanguíneos tais como arteríolas, vênulas e capilares. Alterações dos vasos sanguíneos são uns dos efeitos colaterais da radiação e podem estar relacionados à evolução de sintomas desenvolvidos ao longo do tempo (LAGRANGE, 1997). A apoptose do endotélio vascular de órgãos do sistema nervoso central de camundongos apresentou um decréscimo significativo após dose única de 50Gy de

radiação (PEÑA ET AL, 2000). A cistite causada pela radiação é uma das patologias relacionadas com danos vasculares na bexiga e a forma crônica dessa patologia pode aparecer em humanos de 6 meses a 20 anos após a radioterapia (SOLER *et al*, 2011). O CD31 é utilizado em estudos de angiogênese (TACHEZY *et al*, 2010) e quantificação da microvascularização (SZYMANSKI *et al*, 2002; CAGRI SAGAS *et al*, 2010). A observação dos cortes por imunofluorescência mostrou uma diminuição acentuada da marcação das células endoteliais no grupo R7. Em RG7 a marcação é semelhante a do grupo controle sinalizando a ação da L-glutamina na manutenção dos vasos sanguíneos na fase aguda do processo. No grupo R15 observou-se marcação semelhante ao grupo controle ocorrendo uma recuperação espontânea da vascularização.

A densidade celular da lâmina própria não sofreu alterações nos grupo R7 e RG7. Os grupos R15 e RG15 tiveram um aumento significativo da densidade celular quando comparado ao grupo controle. Os resultados mostraram que o efeito da radiação se da, nesse caso, a longo prazo e não foi observado ação da L-glutamina. Trabalho anterior de nosso grupo mostrou que a suplementação com L-glutamina mantém a densidade volumétrica e a expressão gênica do colágeno da parede de bexigas irradiadas quando comparado ao grupo não suplementado (ROCHA *et al*, 2010) mostrando que a L-glutamina atua de forma positiva nos mecanismos de regulação da síntese do colágeno, mas não nos mecanismos de multiplicação e/ou migração celular.

A radiação ionizante promove a liberação dos grânulos com liberação de triptase, histamina e fatores pró angiogênicos (MÜLLER e MEINEKE, 2011) além de fatores que promovem a proliferação de fibroblastos e células endoteliais (FAJARDO e PEJLER, 2003; SANT, *et al* 2007; RIBATTI *et al*, 2010). A avaliação dos mastócitos mostrou que o número deles nos grupos suplementados não variou em relação ao grupo controle. Nos grupos radiados houve decréscimos significativo o que pode ser explicado alta sensibilidade dessas células à radiação (NORRBY *et al*, 1984; FORGREN *et al*, 2001). A manutenção do número de mastócitos nos grupos suplementados pode estar relacionada a proteção dessas células por ação da L-glutamina, efeito já descrito na mucosa gástrica de ratos (MITRA e PAL, 1977).

O aumento dos miofibroblastos está associado ao aumento da atividade de contração espontânea da bexiga e na síndrome da bexiga hiperativa em humanos (IKEDA *et al*, 2007; SUI *et al*, 2008; ROOSEN *et al*, 2009; HAAB *et al*, 2010). Nos grupos somente irradiados foi observado um aumento do número de miofibroblastos. A manutenção do numero de miofibroblastos mostrou uma ação importante da L-glutamina que pode ser uma opção interessante a ser avaliada para atenuar esse efeito sobre os miofibroblastos.

Em resumo os resultados obtidos mostraram que a L-glutamina teve ação positiva no urotélio, nos miofibroblastos e mastócitos da lamina própria assim como na vascularização da mucosa vesical. Esses resultados são relevantes, pois os parâmetros analisados são pontos críticos na evolução dos efeitos adversos da radioterapia (LAGRANGE, 1997; ELLIOT, 2011). Portanto a utilização da L-glutamina antes e após a radioterapia deve ser avaliada e considerada para uso humano na proteção das estruturas vesicais.

## **5 CONCLUSÃO**

Nossos resultados mostraram que a L-glutamina desempenhou uma ação radioprotetora no urotélio, nos miofibroblastos da lâmina própria e na preservação da vascularização da bexiga de ratos submetidos a irradiação.

## REFERÊNCIAS

ALEXA, A; BADERCA, F ;LIGHEZAN, R, et al. Myofibroblasts reaction in urothelial carcinomas. *Rom J Morphol Embryol*, v.50, n. 4, p. 639-643, 2009.

ALGARA, M; RODRIGUEZ, N; VINALS, P; et al. Prevention of radiochemotherapy-induced esophagitis with glutamine: results of a pilot study. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* v.69, n.2 p. 342-9, 2007.

ANTONAKOPOULOS, GN; HICKS, RM; HAMILTON, E; et al. Early and late morphological changes (including carcinoma of the urothelium) induced by irradiation of the rat urinary bladder. *Br J Cancer* v.46 n.3, p. 403-16, 1982.

BIRDER, L. Role of the urothelium in bladder function. *Scand J Urol Nephrol Suppl* n.215, p. 48-53, 2004.

BIRDER, L. More than just a barrier: urothelium as a drug target for urinary bladder pain. *Am J Physiol Renal Physiol*, n.289, v.3, p. 489-95, 2005.

BIRDER, LA. AND GROAT, WC. Mechanisms of disease: involvement of the urothelium in bladder dysfunction. *Nat Clin Pract Urol* v. 4,n.1, p. 46-54, 2007.

BODE, BP. Recent molecular advances in mammalian glutamine transport. *J Nutr* 131(9 Suppl): 2475S-85S; discussion 2486S-7S, 2001.

BORN, M; PAHNER, I; AHNERT-HILGER, G; et al . The maintenance of the permeability barrier of bladder facet cells requires a continuous fusion of discoid vesicles with the apical plasma membrane. *Eur J Cell Biol* v.82, n.7, p. 343-50, 2003.

CAGRI SAVAS, M; KAPUCUOGLU, N; GURSOY, K; et al. The microvessel density of the hypospadiac prepuce in children. *J Pediatr Urol* v.7, n.2, p. 162-5, 2010.

CELADA ALVAREZ, FJ. Urinary incontinence, prostate câncer and external beam radiotherapy. *Arch Esp Urol* v.62, n.10, p. 819-25, 2009.

CHANCELLOR, MB & YASHIMURA, N. Physiology and pharmacology of the bladder and urethra. *Campbell's Urology*. A. B. R. Patrick C. Walsh, E. Darracott Vaughan Jr. Philadelphia, PA: 831-886 , 2002.

CHUN, H; SASAKI, M; FUJIYAMA, Y; et al. Effect of enteral glutamine on intestinal permeability and bacterial translocation after abdominal radiation injury in rats. *J Gastroenterol* v.32, n.2, p. 189-95, 1997.

CRUZAT, VF; PETRI, ER; TIRAPEGUI, J. Glutamine: Biochemical, Metabolic, Molecular Aspects and Supplementation. *Rev Bras Med Esporte* v.15, n.5, p. 392-397, 2009.

CURI, R; LAGRANHA, CJ; DOI, SQ; et al. Molecular mechanisms of glutamine action. *J Cell Physiol* v.204, n. 2, p. 392-401, 2005.

DIESTEL, CF; LOPES-PAULO, F; MARQUES, RG; et al. Effect of oral supplement of l-glutamine in colonic wall of rats subjected to abdominal irradiation. *Acta Cirúrgica Brasileira* v. 20 - Supl n.1, p. 139-45, 2005.

DIESTEL, CF; MARQUES, RG; LOPES-PAULO, F; et al. Role of L: -glutamine and glycine supplementation on irradiated colonic wall. *Int J Colorectal Dis* v.22, n.12, p. 1523-9, 2007.

DRAKE, MJ; FRY, CH; EYDEN, B. Structural characterization of myofibroblasts in the bladder. *BJU Int* v.97, n.1, p. 29-32, 2006.

ELLIOTT, SP & MALAEB, BS. Long-term urinary adverse effects of pelvic radiotherapy. *World J Urol* v.29, n.1, p. 35-41, 2011.

ERBIL, Y; OZTEZCAN, S; GIRIS, M; et al. The effect of glutamine on radiation-induced organ damage. *Life Sci* v.78, n.4, p. 376-82, 2005.

- ERSIN, S; TUNCYUREK, P; ESASSOLAK, M; et al. The prophylactic and therapeutic effects of glutamine- and arginine-enriched diets on radiation-induced enteritis in rats. *J Surg Res* v.89, n.2, p.121-5, 2000.
- EYDEN, B. The myofibroblast: phenotypic characterization as a prerequisite to understanding its functions in translational medicine. *J Cell Mol Med* v.12, n.1, p. 22-37, 2008.
- FAJARDO, I. & PEJLER, G. Human mast cell beta-tryptase is a gelatinase. *J Immunol* v.171, n.3, p. 1493-9, 2003.
- FORSGREN, KS; HANSSON, MC; LARSSON, FH; et al. Irradiation-induced effects on mast cells, neuropeptides, and atrial natriuretic peptide in the rat heart and lung: bases for further studies. *Cancer Detect Prev* v.25, n.1, p. 80-92, 2001.
- FRITH, CH, EIGHMY, J; FUKUSHIMA, S; et al. Proliferative lesions of the lower urinary tract in rats. *Guide for Toxicologic Pathology*. Washington DC, STP/ARP/AFIP, 1995.
- FRY, CH; IKEDA, Y; HARVEY, R; et al. Control of bladder function by peripheral nerves: avenues for novel drug targets. *Urology* v. 63, n.3 Suppl 1, p.24-31, 2004.
- FRY, CH; SUI, GP; KANAI, AJ; et al. The function of suburothelial myofibroblasts in the bladder. *Neurourol Urodyn* v.26, n.6 Suppl, p.914-9, 2007.
- FRY, C. & ROOSEN, A. Urothelial Targets in the Overactive bladder. *Journal Urol Urogynakol* v.14, n.1, p. 20-23, 2007.
- GAZDA, M.J. Principles of radiation therapy In: PAZDUR, R; COIA, L.; HOSKINS, W.J. et al. *Cancer Management: A multidisciplinary Approach: Medical, Surgical and Radiation Oncology*. Cap 2:. Philadelphia, PA. Ed Oncology Group. 1030 pp. 2004.
- HAAB, F, BELEY, S; CORNU, JN; et al. Urinary and sexual disorders following localized prostate cancer management. *Bull Cancer* v.97, n.12, p. 1537-49, 2010.

HAUSSINGER, D. The role of cellular hydration in the regulation of cell function. *Biochem J* v.313 ( Pt 3), p. 697-710, 1996.

HAUSSINGER, D; GRAF, D; WEIERGRABER, OH. Glutamine and cell signaling in liver. *J Nutr* v.131(9 Suppl): 2509S-14S, 2001.

HEINRICH, M; OBERBACH, A; SCHLICHTING, N; et al . Cytokine effects on gap junction communication and connexin expression in human bladder smooth muscle cells and suburothelial myofibroblasts." *PLoS One* v.6, n.6, e20792, 2011.

HORWITZ, E.M.; HANKS, G.E. External beam radiation therapy for prostate cancer. *Cancer J Clin* v. 50, p. 349-75, 2000.

IKEDA, Y; FRY, C; HAYASHI, F; et al. Role of gap junctions in spontaneous activity of the rat bladder. *Am J Physiol Renal Physiol* v.293, n.4,p. F1018-25, 2007.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. Estimativa 2012: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA, 2011. 118p. Disponível em: < <http://www1.inca.gov.br/estimativa/2012/> >.

JAAL,J; DOOR, W. Radiation induced inflammatory changes in the mouse bladder: the role of cyclooxygenase-2. *J Urol* v. 175, n.4, p. 1529-33, 2006a.

\_\_\_\_\_. Radiation-induced damage to mouse urothelial barrier. *Radiother Oncol* v.80, n.2, p. 250-6, 2006b.

\_\_\_\_\_. Radiation effects on cellularity, proliferation and EGFR expression in mouse bladder urothelium. *Radiat Res* v.173, n. 4, p. 479-85, 2010.

JEMAL, A.; SIEGEL,R.; XU, J.;WARD, E. Cancer statistics, 2010. *CA Cancer J. Clin* v.60, n. 5, p. 277-300. 2010.

JUNQUEIRA, L & CARNEIRO, J. *Histologia Básica. Texto e Atlas.*, 11. ed. Ed. Rio de Janeiro, RJ :Guanabara Koogan S.A, 524p., 2008.

KHAN, F.M. *The Fisics of Radiation Therapy*. Philadelphia, PA USA 3<sup>a</sup> ed. Lippincott Williams & Wilkins, 2003. 156 pp.

KAUFMANN, Y; SPRING, P; KLIMBERG, VS. Oral glutamine prevents DMBA-induced mammary carcinogenesis via upregulation of glutathione production. *Nutrition* v.24, n.5, p. 462-9, 2008.

KIM, CS; KIM, JK; NAM, SY; et al. Low-dose radiation stimulates the proliferation of normal human lung fibroblasts via a transient activation of Raf and Akt. *Mol Cells* v.24, n.3, p. 424-30 2007.

KUHN, KS; MUSCARITOLI, M; WISCHMEYER, P; et al. Glutamine as indispensable nutrient in oncology: experimental and clinical evidence. *Eur J Nutr* v.49, n4,p. 197-210, 2010.

LACEY, JM AND WILMORE, DW. Is glutamine a conditionally essential amino acid? *Nutr Rev* v.48, p.297-309,1990.

LAGRANGE, JL. Late effects of radiations on the bladder. *Cancer Radiother* v.1, n.6, p.764-9, 1997.

LARSEN, M.S.; MORTENSEN, S. NORDLING, J. Quantifying mast cells in bladder pain syndrome by immunohistochemical analysis. *BJU Int*, v.102, n.2, p.204-7, 2008.

LEROUXEL, E; MOREAU, A; BOULER, JM; et al. Effects of high doses of ionising radiation on bone in rats: a new model for evaluation of bone engineering. *Br J Oral Maxillofac Surg* v.47, n.8, p.602-7, 2009.

LEWIS, SA. Everything you wanted to know about the bladder epithelium but were afraid to ask. *Am J Physiol Renal Physiol* v.278, n.6, F867-74, 2000.

LIU, F; TAKAHASHI, N; YAMAGUCHI, O. Expression of P2X3 purinoceptors in suburothelial myofibroblasts of the normal human urinary bladder. *Int J Urol* v.16, n.6, p. 570-5, 2009.

MCANULTY, RJ. Fibroblasts and myofibroblasts: their source, function and role in disease. *Int J Biochem Cell Biol* v.39,n.4, p. 666-71, 2007.

MCKINLEY, M AND O'LOUGHLIN, VD. *Human Anatomy*. G.C. College and I. University, McGraw-Hill's, 2006.

MEDEIROS-JR, J.L. Efeito protetor da L-arginina e L-glutamina no pênis de ratos submetidos à irradiação pélvica. Dissertação de mestrado. UERJ. 2010.

METCALFE, D; BARAM, D; MEKORI, YA. Mast cells. *Physiol Rev* v.77, n.4,p.1033-79, 1997.

MITRA, R AND PAL, SP. Inhibition of mast cell population by L-glutamine in aspirin-induced ulceration in rat stomach. *Indian J Physiol Pharmacol* v.21, n.4, p. 374-8, 1977.

MÜLLER, K AND MEINEKE, V. Radiation-induced mast cell mediators differentially modulate chemokine release from dermal fibroblasts. *J Dermatol Sci* v.61, n.3, p. 199-205, 2011.

NEUHAUS, J; HEINRICH, M; SCHLICHTING, N; et al. Structure and function of suburothelial myofibroblasts in the human urinary bladder under normal and pathological conditions. *Urologe A* v.46, n.9, p. 1197-1202, 2007.

NEWSHOLME, P; PROCOPIO, J; LIMA, M.; et al "Glutamine and glutamate-their central role in cell metabolism and function."  
*Cell Biochem Funct* v.21, n.1, p. 1-9, 2003.

NIEDER, A; PORTER, MP; SOLOWAY, MS. Radiation therapy for prostate cancer increases subsequent risk of bladder and rectal cancer: a population based cohort

study. *J Urol* v.180, n.5, p. 2005-9, 2008.

NORRBY, K; ABOK, K; ADAMSON, P; et al. Radiation effects on mast cells: secretory ability, histamine release and recovery, and cell number. *Acta Pathol Microbiol Immunol Scand A* v. 92, n.6, p. 417-27,1984.

PENÃ, LA; FUKS,Z; KOLESNICK, RN. Radiation-induced apoptosis of endothelial cells in the murine central nervous system: protection by fibroblast growth factor and sphingomyelinase deficiency. *Cancer Res* v.60, n.2,p.321-7, 2000.

PITHON-CURI, TC; SCHUMACHER, RI; FREITAS, J; et al. Glutamine delays spontaneous apoptosis in neutrophils. *Am J Physiol Cell Physiol* v.284, n.6, C1355-61, 2003.

POINTREAU, Y; ATEAN, I; DURDUX, C. Normal tissue tolerance to external beam radiation therapy: bladder. *Cancer Radiother* v.14, n(4-5), p. 363-8, 2010.

RANIERI, G; AMMENDOLA, M; PATRUNO, R; et al . Tryptase-positive mast cells correlate with angiogenesis in early breast cancer patients. *Int J Oncol* v.35, n.1,p. 115-20, 2009.

REGIMBEAU, JM; PANIS, Y; GOUZI, JL; et al . Operative and long term results after surgery for chronic radiation enteritis. *Am J Surg* v.182, n.3,p. 237-42, 2001.

REIS, LO; SOPENA, JM; FAVARO, WJ; et al.Anatomical features of the urethra and urinary bladder catheterization in female mice and rats. An essential translational tool. *Acta Cir Bras* v.26 Suppl 2, p. 106-10, 2011.

RIBATTI, D; GUIDOLIN, D; MARZULLO, A; et al. Mast cells and angiogenesis in gastric carcinoma. *Int J Exp Pathol* v.91, n.4, p. 350-6, 2010.

RICKARD, A; PORTELL, C; KELL, PJ; VINSON, SM; et al. Protease-activated receptor stimulation activates a Ca<sup>2+</sup>-independent phospholipase A<sub>2</sub> in bladder microvascular endothelial cells." *Am J Physiol Renal Physiol* v.288, n.4, F714-21, 2005.

ROCHA, BR; GOMBAR, FM; BARCELLOS, LM; et al. Glutamine supplementation prevents collagen expression damage in healthy urinary bladder caused by radiotherapy. *Nutrition* v.27, n.7, p. 809-15, 2010.

ROOSEN, A; DATTA, SN; CHOWDHURY, RA; et al. Suburothelial myofibroblasts in the human overactive bladder and the effect of botulinum neurotoxin type A treatment. *Eur Urol* v.55, n.6, p. 1440-8, 2009 .

ROSS, GM. Induction of cell death by radiotherapy. *Endocr Relat Cancer* v.6, n.1, p. 41-4, 1999.

SANT, GR; KEMPURAJ, D; MARCHAND, JE; et al. The mast cell in interstitial cystitis: role in pathophysiology and pathogenesis. *Urology* v.69, n.4 Suppl, p. 34-40, 2007.

SAVARESE, DM; SAVY, G; VAHDAT, L; et al. Prevention of chemotherapy and radiation toxicity with glutamine. *Cancer Treat Rev* v.29, n.6, p. 501-13, 2003.

SCHMITT-GRAFF, A; DESMOULIERE, A; GABBIANI, G. Heterogeneity of myofibroblast phenotypic features: an example of fibroblastic cell plasticity. *Virchows Arch* v.425, n.1, p. 3-24, 1994.

SHIMASAKI, N; KURODA, N; MIYAZAKI, E; et al. The distribution pattern of myofibroblasts in the stroma of human bladder carcinoma depends on their invasiveness. *Histol Histopathol* v.21, n.4, p. 349-53, 2006.

SIEGEL, R.; NAISHADHAM, D.; JEMAL, A. Cancer statistics, 2013. *CA Cancer J. Clin* v.63, p. 11-30 2013.

SOKAL RR; ROLF FJ. *Biometry*. W. H. Freeman and Company, New York, 1995.

SOLER, RH; BRUSCHINI, H; FREIRE, MP; et al. Urine is necessary to provoke bladder inflammation in protamine sulfate induced urothelial injury. *J Urol* v.180, n.4, p. 1527-31, 2008.

SOLER, R; VIANELLO, A; FULLHASE, C; et al. Vascular therapy for radiation cystitis. *Neurourol Urodyn* v.30, n.3, p. 428-34, 2011.

STEWART, FA. Mechanism of bladder damage and repair after treatment with radiation and cytostatic drugs. *Br J Cancer Suppl* 7, p. 280-91, 1986.

STONE, H.B.; COLEMAN, M.; ANSCHER, M.S.; et al. Effects of radiation on normal tissue: Consequences and mechanisms. *The Lancet Oncology* v. 4, p. 529-36, 2003.

SUI, GP; ROTHERY, S; DUPONT, E et al . Gap junctions and connexin expression in human suburothelial interstitial cells. *BJU Int* v.90, n.1,p. 118-29, 2002.

SUI, GP; WU, C; ROOSEN, A; et al. Modulation of bladder myofibroblast activity: implications for bladder function. *Am J Physiol Renal Physiol* v.295,n.3, F688-97, 2008.

SZYMANSKI, W; FORMANIAK, J; SZYMANSKI, M; et al. Microvessel density index as a prognostic factor in a low histological differentiation stage of endometrial carcinoma. *Ginekol Pol* v.73, n.11, p. 951-5, 2002.

TACHEZY, M; REICHEL, U; MELENBERG, T; et al .Angiogenesis index CD105 (endoglin)/CD31 (PECAM-1) as a predictive factor for invasion and proliferation in intraductal papillary mucinous neoplasm (IPMN) of the pancreas. *Histol Histopathol* v.25, n.10,p. 1239-46, 2010.

WANG, W; QIAO, SY; LI, DF. Amino acids and gut function. *Amino Acids* v.37, n.1, p. 105-10, 2009.

WARD, E; PICTON, S; REID, U; et all. Oral glutamine in paediatric oncology patients: a dose finding study. *Eur J Clin Nutr* v.57,n.1,p. 31-6, 2003.

WISCHMEYER, P.E.Glutamine: Role in critical illness and ongoing clinical trials. *Curr Opin. Gastroenterol*, v.24, n. 2, p.190-7 , 2008.

WISE, DR AND THOMPSON CB. Glutamine addiction: a new therapeutic target in cancer. *Trends Biochem Sci* v.35, n.8, p. 427-33, 2010.

WISEMAN, OJ; FOWLER, CJ; LANDON, DN. The role of the human bladder lamina propria myofibroblast. *BJU Int* v.91,n.1, p. 89-93, 2003.

ZEISBERG, EM; POTENTA, S; XIE, L; ZEISBERG, M; KALLURI, R. Discovery of endothelial to mesenchymal transition as a source for carcinoma-associated fibroblasts. *Cancer Res* v.67,n.21, p. 10123-8, 2007.

## Apêndice A: Artigo.

Micron 47 (2013) 18–23



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Micron

Journal homepage: [www.elsevier.com/locate/micron](http://www.elsevier.com/locate/micron)

## Protective effects of L-glutamine on the bladder wall of rats submitted to pelvic radiation

Leilane M. Barcellos, Waldemar S. Costa, Jorge L. Medeiros Jr., Beatriz R. Rocha, Francisco J.B. Sampaio, Luiz E.M. Cardoso\*

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

### ARTICLE INFO

*Article history:*  
Received 3 April 2012  
Received in revised form  
24 December 2012  
Accepted 5 January 2013

*Keywords:*  
Urinary bladder  
Glutamine  
Urothelium  
Radiotherapy

### ABSTRACT

Radiotherapy is often used to treat prostate tumors, but the normal bladder is usually adversely affected. Using an animal model of pelvic radiation, we investigated whether glutamine nutritional supplementation can prevent radiation-induced damage to the bladder, especially in its more superficial layers. Male rats aged 3–4 months were divided into groups of 8 animals each: controls, which consisted intact animals; radiated-only rats, which were sacrificed 7 (R7) or 15 (R15) days after a radiation session (10 Gy aimed at the pelvico-abdominal region); and radiated rats receiving L-glutamine supplementation (0.65 g/kg body weight/day), which were sacrificed 7 (RG7) or 15 (RG15) days after the radiation session. Cells and blood vessels in the vesical lamina propria, as well as the urothelium, were then measured using histological methods. The effects of radiation were evaluated by comparing controls vs. either R7 or R15, while a protective effect of glutamine was assessed by comparing R7 vs. RG7 and R15 vs. RG15. The results showed that, in R7, epithelial thickness, epithelial cell density, and cell density in the lamina propria were not significantly affected. However, density of blood vessels in R7 was reduced by 48% ( $p < 0.05$ ) and this alteration was mostly prevented by glutamine ( $p < 0.02$ ). In R15, density of blood vessels in the lamina propria was not significantly modified. However, epithelial thickness was reduced by 25% ( $p < 0.05$ ) in R15, and this effect was prevented by glutamine ( $p < 0.01$ ). In R15, epithelial cell density was increased by 35% ( $p < 0.02$ ), but glutamine did not protect against this radiation-induced increase. Cell density in the lamina propria was likewise unaffected in R15. Density of mast cells in the lamina propria was markedly reduced in R7 and R15. The density was still reduced in RG7, but a higher density in RG15 suggested a glutamine-mediated recovery. Alpha-actin positive cells in the lamina propria formed a suburothelial layer and were identified as myofibroblasts. Thickness of this layer was increased in R7, but was similar to controls in RG7, while changes in R15 and RG15 were less evident. In conclusion, pelvic radiation leads to significant acute and post-acute alterations in the composition and structural features of the vesical lamina propria and epithelium. Most of these changes, however, can be prevented by glutamine nutritional supplementation. These results emphasize, therefore, the potential use of this aminoacid as a radioprotective drug.

© 2013 Elsevier Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

Radiotherapy is often used in the treatment of different pelvic tumors, including those of the prostate, rectum, cervix, and endometrium. However, radiation-induced adverse effects may occur in normal tissues that are close to the target organ. For example, the urinary bladder usually undergoes injuries when radiotherapy is aimed at the pelvic region to treat tumors in other

organs (Jaal and Dorr, 2010). Indeed, patients receiving radiotherapy for prostate cancer are at a higher risk of bladder cancer when compared to those who underwent radical prostatectomy (Nieder et al., 2008).

In experimental models of radiotherapy, mice receiving a radiation dose of 20 Gy show a decrease in the number of cells of the urothelium in the early (0–31 days) and late stages (90–120 days) (Jaal and Dorr, 2006a). Submitting mice to this same dose of radiation also leads to inflammatory changes in the bladder, in which other cells are involved (Jaal and Dorr, 2006b). The bladder lamina propria has several cell types such as fibroblasts, myofibroblasts, and fibrocytes. These cells are implicated in the synthesis of extracellular matrix and stromal remodeling associated with inflammation and tumors (Nimphius et al., 2007). Myofibroblasts

\* Corresponding author at: Urogenital Research Unit – UERJ, Av. 28 de Setembro, 87, fundos-FCM-terreo, 20551-030 Rio de Janeiro, RJ, Brazil. Tel.: +55 21 2587 6499; fax: +55 21 2587 6121.  
E-mail address: [luizemcardoso@gmail.com](mailto:luizemcardoso@gmail.com) (L.E.M. Cardoso).

exhibit a hybrid phenotype between fibroblasts and smooth muscle cells. They are characterized by the expression of  $\alpha$ -actin and other intracellular filaments and have a central role in the formation of fibrotic tissue (Gan et al., 2007). In the human bladder, they are located in the suburothelial layer near the capillary network (Paner et al., 2009). Myofibroblasts play an important role in the initial reflex of voiding due to its position between the urothelium and nerve endings (Fry et al., 2007), and their increase in number is associated with enhanced spontaneous contraction of the bladder (Sui et al., 2008). Experimental data have shown that myofibroblasts are activated immediately after a radiation session (Devalia and Mansfield, 2008). Mast cells are also present in the vesical lamina propria, and they release a series of chemical mediators related to inflammation and angiogenesis (Ranieri et al., 2009; Rickard et al., 2005).

Nutritional supplementation with L-glutamine has been shown to reduce the morbidity and mortality of severe diseases, and it has important effects against radiation-induced tissue lesions (Savaresi et al., 2003). For example, several experimental evidences indicate that glutamine is effective in the protection and repair of the intestinal wall of rats submitted to pelvic radiation (Chun et al., 1997; Ersin et al., 2000; Diestel et al., 2007) or to chemotherapy (Tazuke et al., 2011; Owari et al., 2012). In humans, it has been shown that glutamine prevents post-radiotherapy esophagitis (Algara et al., 2007). Additionally, glutamine has antitumorogenic effects, which is thought to be mediated by glutathione, of which it is a precursor (Kaufmann et al., 2008).

In spite of what has been discussed above, there is little data about the effects of radiation on the bladder when it is not the target organ in pelvic radiotherapy. As already mentioned, this is a common outcome during treatment for prostate cancer (Nieder et al., 2008). Likewise, little is known about the use of oral supplements to protect the bladder against the adverse effects of radiation. A previous work by our group (Rocha et al., 2011) used a rat model of pelvic radiation and concentrated the analysis on the gene expression of collagen in the whole bladder tissue. The results showed that there were changes following radiation, and that they could be prevented by treating the animals with glutamine. However, there is no data yet about the possible radioprotective effects of glutamine on the cellular and vascular components of the bladder wall.

The aim of the present study was thus to investigate whether glutamine supplementation protects these structural components of the rat bladder wall against radiation-induced damage. We focused the analysis on the more superficial layers of the bladder wall, such as the urothelium and the lamina propria, and used quantitative histochemical and immunohistochemical methods.

## 2. Materials and methods

The present experimental protocol was reviewed and approved (approval number CEA/224/2009) by the Animal Care Committee of the State University of Rio de Janeiro, Brazil.

### 2.1. Animals and treatments

Male Wistar rats aged from three to four months and weighing from 270 to 310 g were randomly assigned to one of the following five groups of eight animals each: controls, which consisted of non-radiated, non-treated animals; radiated-only rats, which were sacrificed seven (R7) or 15 (R15) days after the radiation session; and radiated rats receiving L-glutamine supplementation, which were also sacrificed seven (RG7) or 15 (RG15) days after the radiation session. Animal housing and maintenance conditions were as described elsewhere (Diestel et al., 2007).

Previous investigations have characterized a rat model of single-dose, pelvico-abdominal radiation that causes extensive short-term morphological and functional damage to the intestinal tissue (Ersin et al., 2000; Diestel et al., 2007). These established experimental protocols of radiation and treatment were thus used herein to ascertain whether the urinary bladder is also affected. Briefly, immobilized animals were exposed in one session to a total dose of 10 Gy using a 10 MeV photon beam generated by a linear accelerator (Clinac 2100C, Varian, Palo Alto, USA). The dose was delivered at a source-to-skin distance of 100 cm, at a rate of 2.4 Gy/min for 4.16 min, and was aimed at the pelvico-abdominal region, while other fields were shielded off. L-Glutamine (Resource Glutamine, Novartis, Rio de Janeiro, Brazil) was prepared as a 4% aqueous solution and was administered once a day by gavage at a dose of 0.65 g per kg of body weight, starting seven days before radiation and continuing until sacrifice. A dose similar to this one has been shown to have protective effects against changes in the colon using the same rat radiation model (Diestel et al., 2007). The groups that were not under L-glutamine supplementation received, also by gavage, a corresponding volume of water for the same period. All animals were sacrificed by an overdose of thiopental.

### 2.2. Histological methods

Immediately after sacrifice, the lower half of the urinary bladder was removed, fixed in 10% formalin prepared in PBS, and routinely processed for paraffin embedding. Five- $\mu$ m thick sections were obtained and then stained with hematoxylin–eosin, 1% toluidine blue, and Masson's trichrome.

Indirect immunofluorescence was used for labeling smooth muscle and related cells in the lamina propria using as primary antibody an anti-smooth muscle alpha-actin (product code 454863A, monoclonal, predilute, Zymed, Carlsbad, CA, USA). Endothelial cells were also detected by immunofluorescence, using as primary antibody an anti-CD31 (product code ab28364, polyclonal, Abcam, Cambridge, MA, USA) at a dilution of 1:30. The secondary antibody for these two immunofluorescence reactions was an Alexa Fluor 488 Goat anti-rabbit IgG (antibody no. 2, product code A11001, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) at a dilution of 1:50, which was used according to the manufacturer's instructions.

Bright-field histological images were captured on a digital camera (DP71, Olympus, Tokyo, Japan) coupled to a light microscope (BX51, Olympus). Immunofluorescence labelings were observed and photographed on a Zeiss LSM 510 confocal laser microscope (Zeiss, Jena, Germany).

### 2.3. Morphometric methods

Epithelial thickness, epithelial cell density, and cell density in the lamina propria were evaluated on Masson's trichrome-stained sections captured at a magnification of 1000 $\times$ . For epithelial thickness, ten linear measurements ( $\mu$ m), taken from the basement membrane to the luminal surface of the epithelium, were carried out per field for each tissue section using the software ImageJ version 1.45 (National Institute of Health, Bethesda, MD, USA) and a total of five sections per animal. From these 50 measurements, a mean epithelial thickness was calculated for each animal.

Epithelial cell density was determined by counting the number of nuclei in an outlined area of epithelium using the "Cell Counter" plugin of ImageJ. This number was then divided by the surface area of the outlined region, and the results were expressed as number of nuclei per mm<sup>2</sup>. Five outlined regions were counted per section, and five sections were analyzed per animal. Cell density in the lamina propria was also assessed with "Cell Counter" plugin. In an outlined region of lamina propria, all nuclei were counted, with the exception of those of mast cells and of blood vessels, and the

**Table 1**

Morphometric data obtained from bladders of the control (CONTR), radiated-only (R7), and radiated plus glutamine supplementation (RG7) groups. All animals were sacrificed seven days after the radiation session.

Variables	Animal groups			ANOVA
	CONTR	R7	RG7	
Epithelial thickness ( $\mu\text{m}$ )	42.82 $\pm$ 10.13	38.66 $\pm$ 4.14	38.74 $\pm$ 3.10	$p > 0.05$
Epithelial cell density (nuclei/ $\text{mm}^2$ )	5.91 $\pm$ 1.51	6.15 $\pm$ 0.77	6.32 $\pm$ 0.44	$p > 0.05$
Cell density in lamina propria (nuclei/ $\text{mm}^2$ )	52.13 $\pm$ 11.32	55.48 $\pm$ 9.29	53.04 $\pm$ 15.39	$p > 0.05$
Density of blood vessels in lamina propria (number of vessels/ $\text{mm}^2$ )	55.20 $\pm$ 20.09	29.00 $\pm$ 8.28 $p < 0.05$	50.00 $\pm$ 9.43 $p < 0.02$	$p < 0.025$

For each variable, means of the three groups were first analyzed by one-way ANOVA ( $p$  values under the ANOVA heading), and when significance was found, pairwise comparisons were carried out using the Bonferroni method. Pairs consisted of R7 vs. CONTR, and RG7 vs. R7, and statistical significance is indicated by a  $p$ -value under R7 or RG7, respectively.

count was then divided by the surface area of the outlined region. A total of 25 determinations were carried out per animal, and cell density in the lamina propria was expressed as number of nuclei per  $\text{mm}^2$ . Using these same procedures that were employed for cell density determination, the density of mast cells in the lamina propria was evaluated by counting metachromatic cells on toluidine blue-stained sections, using a total of 25 areas per animal. Similarly, CD31-positive blood vessels were counted in images of the lamina propria captured at a magnification of 1000 $\times$  and using 25 areas per animal. Blood vessel density was then expressed as number of vessels per  $\text{mm}^2$ .

#### 2.4. Statistical analysis

Statistical procedures were carried out according to Sokal and Rohlf (1995). Experiments terminated at 7 and 15 days after the radiation session were analyzed separately, and for each morphometric variable, means from the three groups were first compared by one-way ANOVA. When significance was found, planned, pairwise comparisons using the Bonferroni multiple comparisons test were performed to determine: (a) if the variable was affected by radiation; and (b) if glutamine supplementation had a protective effect against eventual changes as detected in the previous comparison. All results are reported as mean  $\pm$  standard deviation, and statistical significance was considered when  $p < 0.05$ .

### 3. Results

In the present study, the basic metabolic responses of animals were quite similar to those that have been described in detail in a previous investigation (Diestel et al., 2007), as in both cases animal strains and experimental conditions were the same. Briefly, after the radiation session aimed at the pelvico-abdominal region, all animals had diarrhea, which started around the third day post-radiation and lasted about two days. Compared with the control group, food intake decreased by about 33% during this short period, after which it gradually returned to near normal values. Body

weight loss at the end of the experiments was of about 15% on average in the animal groups submitted to radiation. However, this reduction in body weight did not differ significantly among these groups (data not shown).

In the groups that were sacrificed seven days after the single-dose radiotherapy session, radiation did not affect, in the bladder wall, epithelial thickness, epithelial cell density, and cell density in the lamina propria (Table 1). However, density of blood vessels in the lamina propria was altered by the treatments ( $p < 0.025$ ), and in radiated-only animals this density was reduced by 48% ( $p < 0.05$ ) compared with the control group. Notably, this alteration was mostly prevented by glutamine, because in radiated animals receiving this supplement, blood vessel density was significantly ( $p < 0.02$ ) increased with regard to radiated-only animals. Thus, and as shown in Table 1, in the radiated group treated with glutamine, density of blood vessels in the lamina propria was close to that of control animals.

In contrast, in animals sacrificed at the 15-day time point, density of blood vessels in the lamina propria was not modified by the different experimental conditions (Table 2), while epithelial thickness and epithelial cell density were all significantly affected ( $p < 0.01$  and  $p < 0.025$ , respectively) (Table 2 and Fig. 1A–C). Compared with controls, epithelial thickness was reduced by 25% ( $p < 0.05$ ) after radiation, and this effect was also prevented by glutamine supplementation ( $p < 0.01$ ). In the radiated-only group, epithelial cell density was increased by 35% ( $p < 0.02$ ). However, the value for this variable in the supplemented group was not significantly different from that of radiated-only animals, which implies that glutamine did not protect epithelial cell density against the aforementioned radiation-induced increase. As in the previous time point, cell density in the lamina propria was likewise unaffected in animals sacrificed 15 days after radiation.

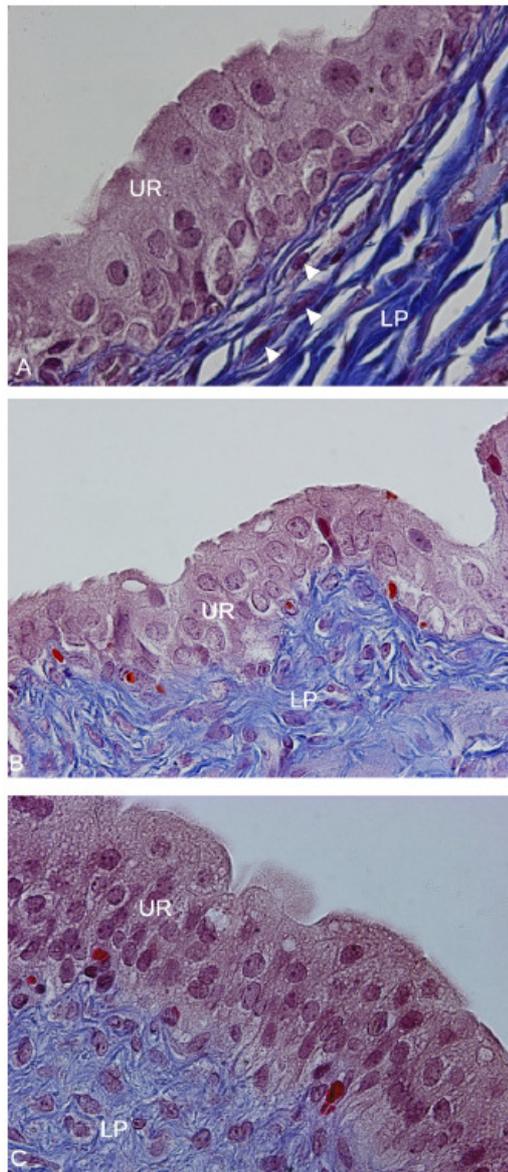
Because the density of mast cells in the lamina propria was rather variable, data analysis was restricted to calculating means and the full range. Nevertheless, the results showed a noticeable and consistent trend. Thus, the density was markedly reduced seven (mean 1.4; full range 0–3) and 15 (1.0; 0–2) days after

**Table 2**

Morphometric data obtained from bladders of the control (CONTR), radiated-only (R15), and radiated plus glutamine supplementation (RG15) groups. All animals were sacrificed 15 days after the radiation session.

Variables	Animal groups			ANOVA
	CONTR	R15	RG15	
Epithelial thickness ( $\mu\text{m}$ )	42.82 $\pm$ 10.13	32.03 $\pm$ 7.85 $p < 0.05$	51.31 $\pm$ 9.74 $p < 0.01$	$p < 0.01$
Epithelial cell density (nuclei/ $\text{mm}^2$ )	5.91 $\pm$ 1.51	7.99 $\pm$ 1.11 $p < 0.02$	6.84 $\pm$ 1.45	$p < 0.025$
Cell density in lamina propria (nuclei/ $\text{mm}^2$ )	52.13 $\pm$ 11.32	50.60 $\pm$ 8.61	50.62 $\pm$ 14.26	$p > 0.05$
Density of blood vessels in lamina propria (number of vessels/ $\text{mm}^2$ )	55.20 $\pm$ 20.09	59.20 $\pm$ 13.61	64.60 $\pm$ 6.91	$p > 0.05$

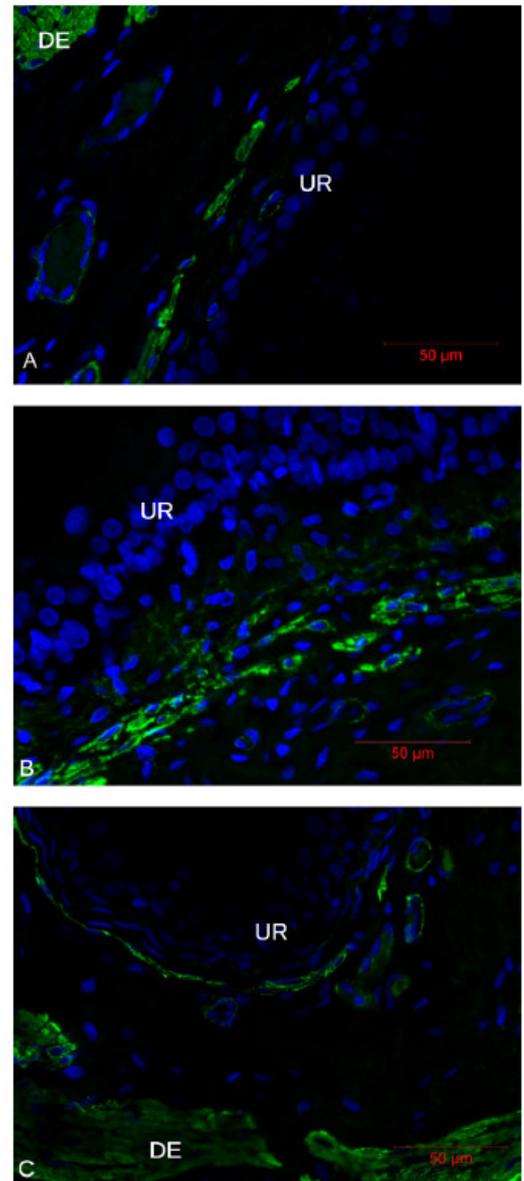
For each variable, means of the three groups were first analyzed by one-way ANOVA ( $p$  values under the ANOVA heading), and when significance was found, pairwise comparisons were carried out using the Bonferroni method. Pairs consisted of R15 vs. CONTR, and RG15 vs. R15, and statistical significance is indicated by a  $p$ -value under R15 or RG15, respectively.



**Fig. 1.** Superficial layers of the bladder wall from animals sacrificed 15 days after radiation. In radiated-only animals (B) there is a decrease in the thickness of the urothelium (UR), and an increase in its cell density, as compared to the control group (A). In the radiated plus glutamine supplementation group (C), the urothelium is more similar to that of controls (A). In A, note a layer of longitudinally sectioned, elongated cells (arrowheads) in the lamina propria (LP), just under the urothelium. In B and C, these cells are more transversely sectioned. Representative images of each group stained with Masson's trichrome and captured at a final magnification of 1000 $\times$ .

radiation, compared with controls (5.2; 0–9). In the supplemented groups, the density was still reduced seven days after radiation (1.4; 0–4), but at the 15-day time point, the higher density (3.8; 1–7) suggests a glutamine-mediated recovery.

A semi-quantitative analysis of smooth muscle and related cells was also carried out in the lamina propria by labeling bladder samples with an anti-smooth muscle alpha-actin antibody. The results showed that, in all groups, antibody positivity was limited to



**Fig. 2.** Immunohistochemical analysis of the bladder lamina propria from animals sacrificed seven days after radiation using an anti-smooth muscle alpha-actin antibody. In this preparation, alpha-actin labeling is shown as a green fluorescence, whereas all nuclei stain blue. Smooth muscle alpha-actin-positive cells include myofibroblasts, which are elongated cells just under the urothelium (UR) (see also Fig. 1A), and the smooth muscle cell bundles of the detrusor layer (DE), which is located deeper in the bladder wall. Myofibroblasts are seen in variable amounts in the control (A), radiated-only (B), and radiated plus glutamine supplementation (C) groups. All images were captured at a 400 $\times$  magnification, and are representative of each group.

elongated cells, which formed a single layer of varying thickness located just under the urothelium (Fig. 2A–C). This layer should therefore correspond to a similar structure as seen in bright-field images (Fig. 1A). In controls, this layer was mostly one cell deep (Fig. 2A). In the groups sacrificed at the seven-day time point, however, this thickness was noticeably increased in the radiated-only group, and the layer was two to four cells deep (Fig. 2B). On



Basic nutritional investigation

## Glutamine supplementation prevents collagen expression damage in healthy urinary bladder caused by radiotherapy

Beatriz Rodrigues Rocha M.D., Flavia Meirelles Gombar U.S., Leilane Maria Barcellos M.D., Waldemar Silva Costa Ph.D., Francisco Jose Barcellos Sampaio Ph.D., Cristiane Fonte Ramos Ph.D. \*

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

### ARTICLE INFO

**Article history:**  
Received 11 March 2010  
Accepted 30 July 2010

**Keywords:**  
Urinary bladder  
Glutamine  
Collagen  
Radiotherapy

### ABSTRACT

**Objective:** Patients who have had pelvic radiotherapy as part of their cancer therapy may develop subsequent urinary bladder effects such as hyperactive bladder, incontinence, and dysuria. Therefore, the goal of this study was to evaluate whether glutamine supplementation could prevent collagen expression damage in healthy urinary bladder caused by radiotherapy.

**Methods:** Fifteen adult Wistar rats were separated into a control group that received food and water ad libitum (C group), an irradiated group that received a single pelvic radiation dose of 1164 cGy (I group), and an irradiated group supplemented with L-glutamine every day during the entire experimental period (0.65 g/kg of body weight; I + G group). All animals were sacrificed 15 d after irradiation. The extracellular matrix and muscle were quantified by a morphometric method. Picro Sirius Red was used to visualize the different collagen types. Reverse transcription–polymerase chain reaction and immunohistochemistry were used to determine collagen type I and III expressions.

**Results:** The extracellular matrix (C group  $36.84 \pm 4.37$ , I group  $31.64 \pm 5.00$ , I + G group  $35.53 \pm 2.60$ ,  $P = 0.0001$ ), muscle (C group  $36.43 \pm 6.15$ , I group  $29.39 \pm 7.08$ , I + G group  $31.38 \pm 3.14$ ,  $P = 0.0001$ ), and gene expressions of collagen type I (C group  $1.067 \pm 0.31$ , I group  $0.579 \pm 0.17$ , I + G group  $1.816 \pm 0.66$ ,  $P = 0.0009$ ) and type III (C group  $0.99 \pm 0.28$ , I group  $0.54 \pm 0.13$ , I + G group  $1.07 \pm 0.28$ ,  $P = 0.0080$ ) were decreased in the I group. Apart from muscle, glutamine supplementation prevented these alterations. Immunohistochemistry and Picro Sirius Red showed similar results.

**Conclusion:** Supplementation with L-glutamine seems to prevent bladder wall damage in relation to extracellular matrix volumetric density and collagen expression. These results suggest that glutamine supplementation could be efficient in protecting healthy tissues from the adverse effects of radiotherapy.

© 2011 Published by Elsevier Inc.

### Introduction

The mammalian urinary bladder is a hollow, muscular organ that collects urine produced by the kidneys and functions as a temporary reservoir for urine. The inner surface of the urinary bladder is covered by urothelium that consists of three to seven layers of transitional cells resting on a basement membrane composed of an extracellular matrix (collagen,

adhesive glycoproteins). Beyond the basement membrane exists the lamina propria, which is composed of loose connective tissue with occasional smooth muscle fibers. The muscle wall of the bladder (detrusor muscle) is composed of smooth muscle bundles running in various directions in the body of the bladder [1].

Collagen types I and III are the major collagenous proteins of the urinary bladder and are localized to 1) the connective tissue-rich lamina propria beneath the urothelial layer, 2) the perimysial regions surrounding the detrusor smooth muscle fascicles, and 3) the serosal layer. The urinary bladder is an organ that slowly expands upon filling and rapidly contracts at micturition. As the bladder slowly fills, the coiled collagen fibers in the lamina propria gradually expand as the intravesical

This study was supported by grants from the National Council of Scientific and Technological Development, the Foundation for Research Support of Rio de Janeiro, and the Coordination for Improvement of Postgraduate Students, Brazil.

\* Corresponding author. Tel.: +55-21-2587-6499; fax: +55-21-2587-6121.  
E-mail address: [cristiane@pesquisador.com.br](mailto:cristiane@pesquisador.com.br) (C. F. Ramos).

0899-9007/\$ – see front matter © 2011 Published by Elsevier Inc.  
doi:10.1016/j.nut.2010.07.020

pressure remains low, resulting in thinning of the lamina propria and vesical expansion. Once volume capacity has been reached, the collagen fibers between muscle fascicles become taut and intravesical pressure increases rapidly and the micturition response is then initiated [2–4].

Radiotherapy and concomitant chemotherapy are inevitably associated with normal tissue side effects. During and after treatment for pelvic tumors, these side effects are frequently seen in the small bowel, rectum, and bladder. The time course of radiation effects in the human and in the mouse bladder consists of three distinct phases, namely 1) a reversible acute phase that usually starts during treatment and resolves within a few weeks after the end of radiotherapy, 2) a dose-dependent, symptom-free latency time of several months to many years, and 3) a progressive and irreversible late response phase [5].

The side effects caused by incidental irradiation of normal structures can occur within days to weeks or months to years after exposure [6,7]. The urinary bladder late effects frequently seen after pelvic radiotherapy include hyperactive bladder, incontinence, and dysuria [8]. All these effects can be related to alterations of any component of the bladder wall such as the urothelium, extracellular matrix, or cellular cytoskeleton.

Some studies have shown that glutamine supplementation may be a good and inexpensive option to decrease the radiation side effects [9]. Glutamine is the most abundant free amino acid in the body and has its primary source in skeletal muscle, from which it is released into the bloodstream and transported to a variety of tissues [10,11]. Glutamine plays an essential role in promoting and maintaining the function of various organs and cells, where it is an important precursor of peptides and proteins and of amino sugars, purines, and pyrimidines, thus participating in the synthesis of nucleotides and nucleic acids [12,13]. Glutamine metabolism also provides precursors for the synthesis of key molecules such as glutathione [14,15].

Several studies have used irradiated rats to evaluate the therapeutic use of glutamine. Nutritional supplementation with L-glutamine amino acid has been shown to be effective in maintaining the colon wall mucosa structure in irradiated rats [16]. Also, glutamine seems to prevent acute radiation-induced esophagitis in patients with lung carcinoma [17].

The pathologic progression of radiation toxicity in many normal tissues seems to be a consequence of an early inflammatory phase followed by late stromal alterations. The purpose of this study was not to evaluate fibrosis, the late consequence of radiation [18]; instead, we intended to analyze the early inflammatory phase. To reach this goal, we evaluated whether glutamine supplementation could prevent the bladder complications after radiation in terms of the extracellular matrix and muscle.

## Materials and methods

### Animals

Wistar rats were kept in a room with controlled temperature ( $25 \pm 1^\circ\text{C}$ ) and a light/darkness cycle (lights on from 07:00 to 19:00 h). Handling of the animals was approved by the animal care and use committee of the Biology Institute of State University of Rio de Janeiro, which based their analysis on the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals [19], and the study design was approved by the local ethical committee for the care and use of laboratory animals.

### Experimental design

Fifteen adult rats weighting 270 to 310 g were separated into a control group (C group), and irradiated group (I group), and an irradiated supplemented with glutamine group (I + G group). At day 8 after the beginning of the experiment, the I and I + G groups received a single dose of abdominal irradiation (1164 cGy); all

animals in the I and I + G groups were maintained in a dorsal position inside small plastic cages at the moment of abdominal irradiation so they could not move. A linear acceleration of 06 MeV (Clinac 2100, Varian, Palo Alto, USA) liberated the radiation at a speed of 240 cGy/min, in a front-skin distance of 100 cm, in a  $6 \times 4$ -cm field over the abdomen. The head, thorax, and limbs were out of the radiation field. The animals in I + G group received oral supplementation with glutamine (0.65g/kg of body weight per day) every day during the entire experimental period, and the C and I groups received the same volume of water. The daily dose of glutamine was prepared in an aqueous solution (4%) in a total volume of 5 ml, administered with an orogastric catheter at the same time once a day, every day. All animals had free access to water and a standard diet (Nuvilab, Colombo, Parana, Brazil) during the entire experimental period. All animals were sacrificed at day 15 with a lethal dose of pentobarbital. At this moment the bladder was excised, dissected out, and divided into two parts. The superior part of the bladder was separated and stored at  $-80^\circ\text{C}$  for further RNA extraction. The inferior part was fixed in formalin and processed by routine histologic procedures.

### Histologic procedures

The tissue was fixed in formalin (pH 7.2) for at least 24 h followed by dehydration in a series of increasing alcohol concentrations. After dehydration, the tissues were cleared in xylol and then embedded in paraffin. Sections  $5 \mu\text{m}$  thick were stained by the three following methods: 1) Hematoxylin and eosin were used for the analysis of the integrity of the specimens and exclusion of samples with artifacts. Hematoxylin stains the nuclear components of cells a dark blue and eosin stains the cytoplasmic organelles in shades of pink. 2) Masson's trichrome was used for the morphometric analysis of the extracellular matrix and muscle. The collagen fibers, components of the extracellular matrix, are stained blue, the nuclei are stained black, and the background, muscle, is stained red. 3) Picro Sirius Red was used in polarization microscopy to show the different possible types of collagen in the samples. The larger collagen fibers, type I collagen, are bright orange or red and the thinner ones, type III collagen including reticular fibers, are green.

### Image acquisition and analysis

Five different sections were selected from five fragments. Then, five random fields were evaluated from each section. Therefore, there were 25 test areas from each bladder. Images were digitized using an Olympus DP70 (12.5 megapixels) video camera coupled to a BX51 Olympus light microscope, (Center Valley, PA, USA) which transferred all captured images to a microcomputer.

### Morphometric quantification

The quantitative analysis of the extracellular matrix and muscle was performed using paraffin sections stained with Masson's trichrome. After image digitalization, the wall of the bladder was analyzed using a 100-point grade tool from Image J (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA), with previous calibrations. Quantification was performed at a final magnification of  $200\times$ .

### Immunohistochemistry

Deparaffinized sections were hydrated, treated with Tris-ethylenediamine-tetra-acetic acid buffer (pH 9.0) overnight at  $60^\circ\text{C}$  for antigen retrieval, and then treated with 3% hydrogen peroxide solution in methanol for 10 min to block endogenous peroxidase activity. These steps were followed by washing the sections in phosphate buffered saline (PBS) and subsequently incubating the section for 10 min at room temperature with 10% goat serum to block unspecific binding. The sections were then incubated overnight at  $4^\circ\text{C}$  with specific primary antibodies (collagen type I ABCAM ab3308-100 and collagen III ABCAM ab3310-100; Cambridge, UK) diluted in PBS with 1% bovine serum albumin, collagen type I 1:400, and collagen type III 1:500. Sections were then washed in PBS and incubated at room temperature for 30 min with a specific secondary antibody (Zymed Laboratories, Inc., San Francisco, CA, USA). Sections were washed in PBS, treated with liquid diaminobenzidine (Zymed Laboratories), and then counterstained with hematoxylin. The negative controls were processed by replacing the primary antibody with PBS and no indication of staining was observed.

### RNA extractions

Total RNA from bladder tissue was extracted using TRIzol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) according to the manufacturer's protocol. Briefly, bladders were homogenized in 1 ml of TRIzol reagent per 50 to 100 mg of tissue. Then, RNA was extracted by a phenol/chloroform solution and precipitated by isopropyl alcohol. After washing with 75% ethanol, the RNA was dried and dissolved with diethyl pyrocarbonate-treated water. The quality of RNA samples was verified by the determination of the ratio 260/280 nm and by electrophoresis on a 1% agarose gel. The samples were stored at  $-80^\circ\text{C}$  until use.

#### Semiquantitative reverse transcription–polymerase chain reaction

All RNA samples were rid of contaminating DNA by using DNA-free reagents (Invitrogen) according to the manufacturer's protocol. Then, 1 µg of RNA sample was used in a 20-µL cDNA reaction using oligo(dT) and the Superscript cDNA synthesis system (Invitrogen) according to the manufacturer's protocol. Polymerase chain reaction (PCR) products were prepared using the equivalent of 2 µL of cDNA per 50-µL reaction (triplicate) for each respective primer set using PCR reagents and Platinum Taq polymerase (Invitrogen). To quantify glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and collagen type I and III transcripts, we determined the optimal number of amplification cycles for each gene. The applied PCR primers and the cycle profiles used are listed in Table 1. All amplified cDNA fragments were run on a 1.5% agarose gel stained with ethidium bromide, visualized under ultraviolet transillumination, and analyzed with Image J software. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase was used as an internal control.

#### Statistical analysis

The statistical significance of the experimental observations was determined by one-way analysis of variance followed by Newman-Keuls test. All results are presented as mean ± standard error of the mean, with statistical significance set at  $P < 0.05$  [20].

#### Results

Figure 1 shows the percentages of extracellular matrix and muscle in the bladder wall evaluated by morphometric methods. Compared with the C group, abdominal irradiation caused significant decreases in the percentages of extracellular matrix and muscle. In contrast, the percentage of extracellular matrix was unchanged, whereas the muscle percentage was significantly decreased in the I + G group. The histologic sections stained with Masson's trichrome are shown in Figure 2.

Picro Sirius Red in polarization microscopy showed a predominance of red color in the C and I + G groups and a green color in the I group, suggesting that the C and I + G groups had a predominance of type I collagen, whereas in the I group type III collagen seemed to be the most abundant (Fig. 3). The immunohistochemistry for type I and III collagen showed a more evident stain in the C and I + G groups compared with the I group (Fig. 4).

Figure 5 shows the expression of collagen type I and III mRNAs in the bladder wall. Compared with the C group, abdominal irradiation caused a significant decrease in type I and III collagen mRNA. Conversely, glutamine supplementation prevented these alterations.

#### Discussion

The pathologic progression of radiation toxicity in many normal tissues seems to be a consequence of an early inflammatory phase followed by late stromal alterations. For this reason, in this study we analyzed whether glutamine supplementation could prevent the effects of radiation on the healthy urinary bladder 15 d after irradiation, in the early inflammatory

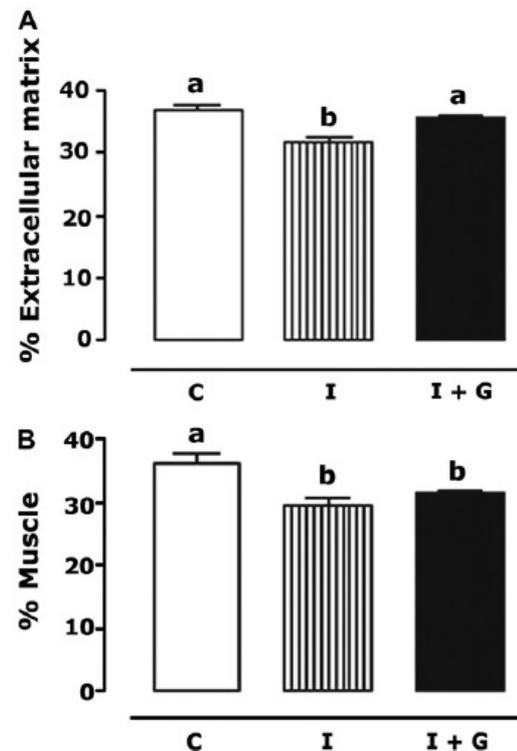


Fig. 1. Percentages of extracellular matrix (A) and muscle (B) of the bladder in the C, I, and I + G groups. The results are presented as mean ± SEM of five animals. Different letters indicate statistical significance. C, control group; I, irradiated group; I + G, irradiated group supplemented with glutamine.

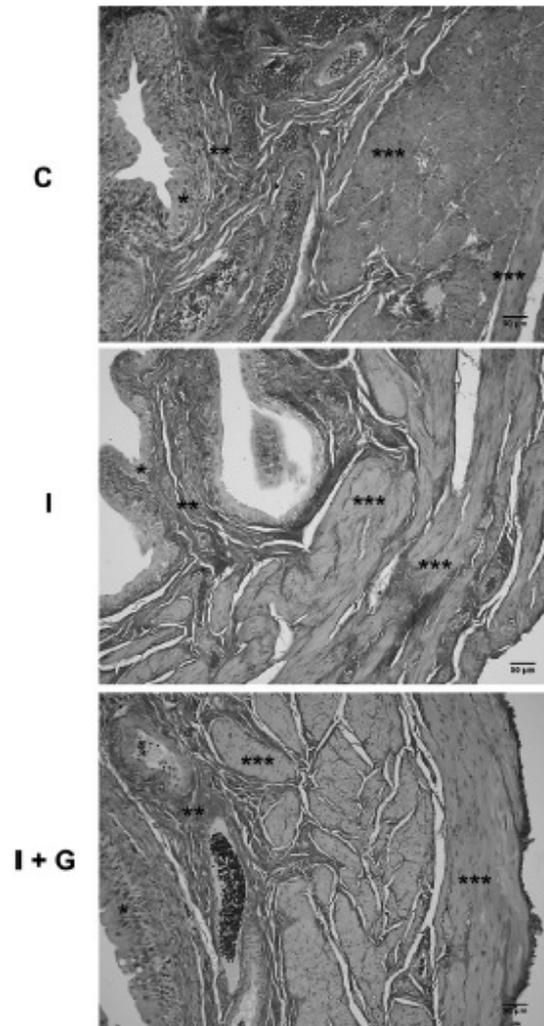
phase. Incidental irradiation of surrounding normal structures during radiotherapy is usually unavoidable. However, the results presented in this report suggest that the adverse effects of radiotherapy on the bladder extracellular matrix can be avoided by glutamine supplementation.

Collagenous proteins are the major tension-bearing structural elements in the urinary bladder. These proteins and their arrangement within the extracellular matrix mediate bladder function by allowing expansion of the bladder wall at low pressures upon filling and, at the same time, preventing over-expansion at volume capacity. The abnormal arrangement and content of collagen fibers can alter organ function, resulting in a stiff-walled bladder with decreased functional compliance properties [21–23].

Table 1  
Oligonucleotide sequences used for amplification of reverse transcription–polymerase chain reaction and cycling conditions for different sets of pairs

Gene	Sequence	Cycle profile	No. of cycles
GAPDH	5'-accacagtcctatgcacac-3'	94°C/3 min, 94°C/30 s	30
	5'-tccaccaccctgttctgta-3'	58°C/2 min, 72°C/2 min	
Collagen I	5'-aggcataaagggtcatcgtg-3'	94°C/2 min, 94°C/1 min	35
	5'-accgttgagtcctcttgc-3'	60°C/1 min, 72°C/1 min, 72°C/15 min	
Collagen III	5'-gtccacgaggtgacaaggt-3'	94°C/2 min, 94°C/1 min	36
	5'-catcttttcaggaggtcca-3'	60°C/1 min, 72°C/1 min, 72°C/15 min	

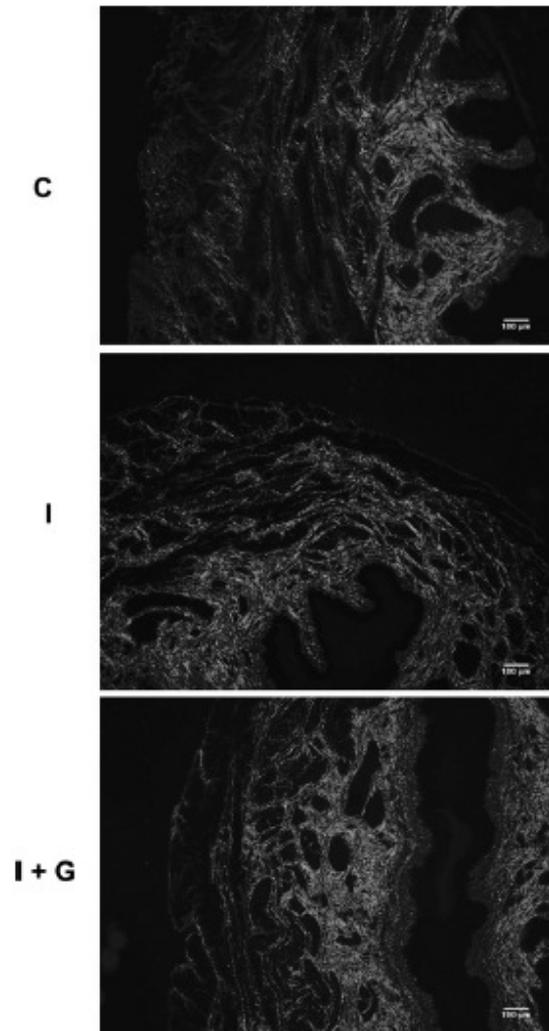
GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase



**Fig. 2.** Histologic sections of bladder in the C, I, and I + G groups. Staining was done with Masson's trichrome. Final magnification 200 $\times$ . \*, Urothelium; \*\*, lamina propria; \*\*\*, detrusor muscle; C, control group; I, irradiated group; I + G, irradiated group supplemented with glutamine.

The quantitative analysis of the extracellular matrix and muscle was performed using paraffin sections stained with Masson's trichrome, which stains the smooth muscle red and the extracellular matrix blue. This analysis shows that irradiation caused decreases in the extracellular matrix and smooth muscle percentages. The urinary bladder late effects frequently seen after pelvic radiotherapy include hyperactive bladder, incontinence, and dysuria [8]. All these effects could be related to the alterations in the extracellular matrix and smooth muscle. The fact that glutamine supplementation prevented those alterations raises the possibility that this amino acid could be used as a radioprotective drug.

As showed by Junqueira et al. [24], one outcome of the Sirius Red-polarization method is the observation that sites that contain collagen type I, when studied with polarization



**Fig. 3.** Histologic sections of bladder in the C, I, and I + G groups. Staining with Picro Sirius Red under polarization microscopy. Final magnification 100 $\times$ . C, control group; I, irradiated group; I + G, irradiated group supplemented with glutamine.

microscopy, show a different color when compared with regions that present collagen type III. Although this stain may not be reliable to determine all the different types of collagen, it is possible to suppose that the difference in color among groups is indicative of the predominance of a specific type of collagen over another. Using this tool, we showed that the C and I groups presented a different type of collagen, with a predominance of type I collagen in the C and I + G groups, whereas in the irradiated group type III collagen seemed to be the most abundant.

The immunohistochemistry information obtained through collagen staining in the present study was a qualitative description of collagen distribution and content in these tissues. These comparisons are justified because all tissues were handled in the same way, stains were used on the same day while

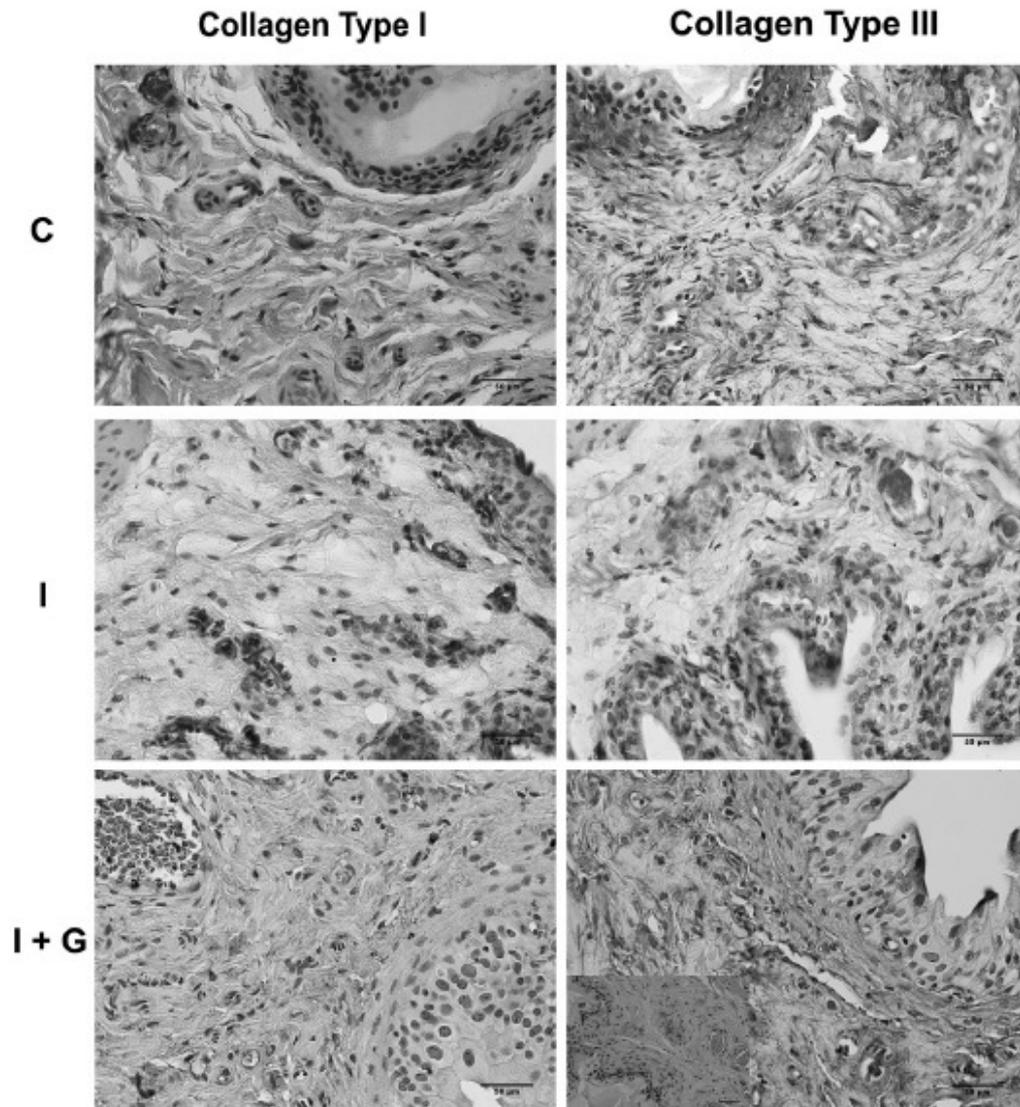


Fig. 4. Photomicrographs showing immunohistochemistry for type I and III collagen in the bladder of the C, I, and I + G groups. Final magnification 400 $\times$ . (Insert) Negative control. C, control group; I, irradiated group; I + G, irradiated group supplemented with glutamine.

unaware of the treatment group, and the same reagents were used and read by more than one investigator unaware of the group. Reverse transcription-PCR, despite being semi-quantitative, is a very sensitive technique. In this study we showed that abdominal irradiation decreases the collagen expression in mRNA (reverse transcription-PCR) and protein (immunohistochemistry) levels. Once again, glutamine supplementation was effective in preventing those alterations, reinforcing the possibility that this amino acid could be used as a radioprotective drug.

The decrease observed in the extracellular matrix and collagen expression is an interesting finding because it is known that irradiation causes fibrosis. However, in this study we evaluated the acute effects of radiation that include cell death and apoptosis [25]. We can assume that cell death explains these early alterations. Accumulation of postmitotic fibrocytes after connective tissue remodeling results in the pronounced elevation of synthesis and extracellular deposition of collagen, characteristic of fibrotic tissue alteration that occur late in the process.

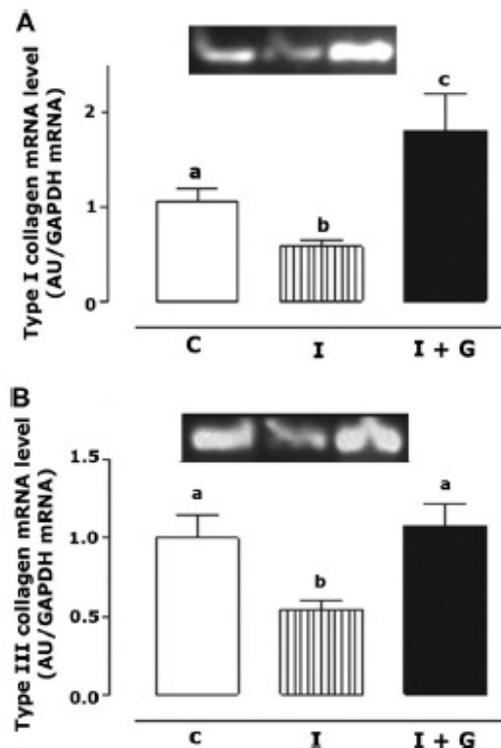


Fig. 5. Expression of type I (A) and III (B) collagen genes in the bladder of the C, I, and I + G groups. After reverse transcription-polymerase chain reactions, the amplified fragments were run on a 1.5% agarose gel and visualized by ultraviolet transillumination. Bands representative of ethidium bromide-stained gel depicting products for expression of collagen I and III are shown above the graphs. GAPDH was used as an internal control. The ratios between the signal intensities (AU) of type I and III collagen are presented as mean  $\pm$  SEM of five animals. Different letters indicate statistical significance. AU, arbitrary units; C, control group; GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; I, irradiated group; I + G, irradiated groups supplemented with glutamine.

Glutamine is the most abundant free amino acid in the body and is known to play a regulatory role at the gene and protein levels in several cell-specific processes including metabolism (e.g., oxidative fuel, gluconeogenic precursor, and lipogenic precursor), cell integrity (survival, cell proliferation), protein synthesis and degradation, redox potential, respiratory burst, insulin resistance, insulin secretion, and extracellular matrix synthesis [26]. The goal of this study was to evaluate whether glutamine would be effective in preventing the side effects of radiotherapy.

Future studies are necessary to establish the way this amino acid acts in the cell to achieve a positive effect on collagen preservation. Several studies have shown that glutamine is related to collagen synthesis by different mechanisms. It has been shown that glutamine is an important precursor for de novo synthesis of arginine in animals [27] and humans [28]. Arginine is then hydrolyzed to ornithine, which can serve as a precursor for the synthesis of proline, which can also be derived from glutamine. Then, proline can support the production of proline-rich proteins such as collagen [29]. Glutamine metabolism also provides precursors for the synthesis of key

molecules, such as glutathione [14,15], that could protect collagen from damage.

Results of the therapeutic use of glutamine in humans at non-physiologic doses indicate limited efficacy. However, the results of this study raise the possibility that glutamine supplementation is effective even in humans to decrease the side effects of pelvic radiation on the urinary bladder. Nutritional supplementation with L-glutamine amino acid has been shown effective in maintaining the colonic wall mucosa structure in irradiated rats [16]. Also, glutamine seems to prevent acute radiation-induced esophagitis in patients with lung carcinoma [17].

Because glutamine has an important function in cell proliferation [26] and its metabolism can generate arginine, which is known as a potent angiogenic stimulator [30], further studies in experimental animals are necessary before treatment possibilities in human patients can be suggested. It is important to ensure that glutamine supplementation will not interfere with the radiotherapy effects in the tumor area by increasing proliferation and angiogenesis.

All the techniques described in this report showed that glutamine supplementation can prevent or normalize the alteration on the extracellular matrix and collagen expression. This results corroborate previous findings that showed that glutamine stimulates collagen synthesis [31,32]. The smaller percentage of muscle was the only parameter analyzed that was not normalized by glutamine supplementation, probably because muscle metabolism is slower compared with the fibroblast. We believe that the muscle percentage would have been normalized in the I + G group at some later point.

Based on the present results, we can conclude that glutamine supplementation avoids the late effects frequently seen after pelvic radiotherapy. By preventing the acute effects of radiation on the extracellular matrix and collagen expression on the urinary bladder, glutamine supplementation may prevent the symptoms usually associated with these components after pelvic radiation. These results emphasize, therefore, the potential use of this amino acid as a radioprotective drug.

#### Acknowledgments

The authors thank Carla B. M. Gallo for processing the images for this report.

#### References

- [1] Walsh PC, Retik AB, Vaughan D. Campbell's urology. Physiology and pharmacology of the bladder and uretra. Philadelphia, PA: Saunders; 2002.
- [2] Chang SL, Chung JS, Yeung MK, Howard PS, Macarak EJ. Roles of the lamina propria and the detrusor in tension transfer during bladder filling. *Scand J Urol Nephrol* 1999;201:38–45.
- [3] Chang SL, Howard PS, Koo HP, Macarak EJ. Role of type III collagen in bladder filling. *Neuro Urodynam* 1998;17:135–45.
- [4] Macarak EJ, Howard PS. The collagens and their urologic significance. *Scand J Urol Nephrol* 1997;184:25–36.
- [5] Van der Kogel AJ, Joiner M. Basic Clinical Radiobiology. Quantifying cell kill and cell survival. Great Britain, UK: Edward Arnold; 2009.
- [6] Bentzen SM. Potential clinical impact of normal-tissue intrinsic radiosensitivity testing. *Radiother Oncol* 1997;43:121–31.
- [7] Kiltie AE, Ryan AJ, Swindell R, Barber JB, West CM, Magee B, Hendry JH. A correlation between residual radiation-induced DNA double-strand breaks in cultured fibroblasts and late radiotherapy reactions in breast cancer patients. *Radiother Oncol* 1999;51:55–65.
- [8] Blaivas JG, Weiss JP, Jones M. The pathophysiology of lower urinary tract symptoms after brachytherapy for prostate cancer. *BJU Int* 2006;98:1233–7.
- [9] Savarese DM, Savy G, Vahdat L, Wischmeyer PE, Corey B. Prevention of chemotherapy and radiation toxicity with glutamine. *Cancer Treat Rev* 2003;29:501–13.

## Anexo A: Comissão de ética para o cuidado e uso de animais experimentais



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:** Informações Relevantes à Técnica de Radioterapia:

- Distância “Fonte-Pele” = 100 cm.
- Campo de exposição = 531 cm<sup>2</sup>
- 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 – <sup>60</sup>Co- $\gamma$  – 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.