

ANNA CAROLINA TEIXEIRA DE SIQUEIRA MAC DOWELL COIMBRA

**AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA DE EFEITOS ATRIAIS RADIOINDUZIDOS EM RATOS
WISTAR**

**Rio de Janeiro - RJ
Junho de 2007**

ANNA CAROLINA TEIXEIRA DE SIQUEIRA MAC DOWELL COIMBRA

**AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA DE EFEITOS ATRIAIS RADIOINDUZIDOS EM RATOS
WISTAR**

Monografia submetida como requisito parcial à obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas – Modalidade Médica pela Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro (UNIRIO).

Orientadores: Prof. Dr. Carlos Eduardo de Almeida
Prof. Dra. Ana Lúcia de Brito Rodrigues

**Rio de Janeiro – RJ
2007**

FICHA CATALOGRÁFICA

COIMBRA, Anna Carolina Teixeira de Siqueira Mac Dowell

Avaliação morfológica de efeitos atriais radioinduzidos em ratos Wistar / Anna Carolina Teixeira de Siqueira Mac Dowell Coimbra; orientação Prof. Dr. Carlos Eduardo de Almeida, Prof. Dra. Ana Lúcia de Brito Rodrigues. Rio de Janeiro, 2007. 42f.

Monografia de Bacharelado apresentado ao curso de Graduação em Ciências Biológicas – Modalidade Médica – Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, UNIRIO.

1. Câncer de mama. 2. Radiação. 3. Complicações cardíacas.

TÍTULO DA MONOGRAFIA

**AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA DE EFEITOS ATRIAIS RADIOINDUZIDOS EM RATOS
WISTAR**

AUTOR

Anna Carolina Teixeira de Siqueira Mac Dowell Coimbra

MONOGRAFIA APROVADA EM: ___/___/___

Prof^a. Gilda Maria Martins Santos _____

Prof^a. Ana Lúcia de Brito Rodrigues _____

Prof. Sérgio de Osório Machado _____

Rio de janeiro – RJ

Junho de 2007

DEDICATÓRIA

A memória de Antônio Maria Mac
Dowell Coimbra, pela força e
inspiração responsáveis por
minha formação profissional.

AGRADECIMENTOS

À professora ANA LÚCIA DE BRITO RODRIGUES pelo carinho, amizade, paciência e dedicação durante a realização deste trabalho.

Ao professor CARLOS EDUARDO DE ALMEIDA do Laboratório de Ciências Radiológicas – LCR (IBRAG / UERJ) pela oportunidade e toda a ajuda durante todo o processo.

Ao professor CARLOS ALBERTO BASÍLIO DE OLIVEIRA do Hospital Universitário Gaffrée e Guinle (HUGG / UNIRIO) pela solidariedade e auxílio com algumas colorações pertencentes a este estudo.

Ao técnico RODRIGO PINHEIRO do laboratório O ALEPH pela contribuição com algumas lâminas de tricrômico de Gomori.

À doutoranda SAMARA CRISTINA FERREIRA MACHADO do Laboratório de Ciências Radiológicas – LCR (IBRAG / UERJ). Sempre prestativa, solidária e preocupada com o desenvolvimento da pesquisa.

Ao professor ANTÔNIO AUGUSTO DE FREITAS PEREGRINO do Laboratório de Ciências Radiológicas – LCR (IBRAG/UERJ). Apresentou-me a este projeto e esteve presente em todos os momentos, sempre prestativo e atencioso.

À doutora NAZARETH DE NOVAES ROCHA do laboratório de Cardiologia Celular e Molecular da Universidade Federal do Rio de Janeiro (LCCM / UFRJ) pelo auxílio na interpretação dos resultados dessa pesquisa.

Ao ALFONSO VARELA MENÉNDEZ do Laboratório de Ciências Radiológicas – LCR (IBRAG / UERJ) pelas fotos cedidas.

Ao BRUNO COSTA DA SILVA pelo imprescindível auxílio quanto à captação e exibição das imagens e, pelo suporte técnico à confecção deste trabalho.

Às minhas amigas VANESSA BUARQUE DE MACEDO PAULA DE MENEZES e YASMINE RANGEL VIEIRA por me apoiarem e compartilharem todos esses anos de faculdade. Sempre presentes em todos os momentos.

Aos meus avós WILSON ANTUNES SIQUEIRA e NEUZA RODRIGUES TEIXEIRA DE SIQUEIRA pelo incentivo à minha formação em todas as etapas da minha vida. Simplesmente os melhores avós do mundo.

À minha mãe MARCIA TEIXEIRA DE SIQUEIRA pela atenção, conselhos e paciência dados em toda a minha vida.

Aos meus irmãos LEONARDO AUGUSTO TEIXEIRA DE SIQUEIRA MAC DOWELL COIMBRA e CESAR AUGUSTO TEIXEIRA DE SIQUEIRA MAC DOWELL COIMBRA por estarem sempre dispostos a ajudar e sempre presentes, mesmo com alguns desentendimentos.

À minha tia NADIA TEIXEIRA DE SIQUEIRA por acreditar em mim.

Ao meu namorado LEONARDO ALVES pela paciência nessa reta final da faculdade e por todo amor, atenção e conselhos.

RESUMO

A principal neoplasia que atinge mulheres no mundo é o câncer de mama. A radioterapia representa uma importante ferramenta, sendo a opção de escolha em grande parte dos casos. A radiação ionizante utilizada pode causar injúrias nas células normais adjacentes à massa tumoral. A absorção desta pelos tecidos vivos estimula reações físico-químicas que produzem radicais livres, responsáveis por reações que resultam na perda da integridade e função celular.

O coração é o principal órgão atingido no campo de irradiação. Como consequência tardia dessa opção de tratamento, alguns autores relatam o aparecimento de doenças cardiovasculares.

Com o objetivo de verificar alterações morfológicas e funcionais atriais radioinduzidas em modelo animal, foram utilizados ratos Wistar (*Rattus norvegicus*), de ambos os sexos e com idade aproximada de três meses, anestesiados e irradiados. Foram administradas doses de 500, 1000 e 1500 cGy no volume cardíaco, predefinido através de tomografia. Os animais foram sacrificados após 2 dias, 15 dias e 12 meses. Átrios foram fragmentados e fixados para o processamento para microscopia ótica. O material foi submetido a diferentes colorações e imunohistoquímica. Os ecocardiogramas foram feitos nos ratos nos tempos de 4, 8 e 12 meses após a irradiação.

As alterações histopatológicas mais evidentes verificadas foram fibrose intersticial, presença de infiltrado inflamatório e espessamento do endocárdio. Com relação às alterações morfológicas, verificou-se hipertrofia, déficit diastólico e pericardite.

A radioterapia para câncer de mama, apesar de ser efetiva no controle local do tumor, está associada a complicações cardíacas. O átrio funciona basicamente como uma câmara de passagem do sangue, porém tem papel essencial no funcionamento cardíaco normal, especialmente nas doenças cardíacas.

Palavras-chave: Câncer de mama. Radiação. Complicações cardíacas

SUMMARY

Breast cancer is the most common malignant tumor in women. It is well established that adjuvant radiotherapy reduces loco-regional recurrence in breast cancer. During this treatment frequently the entire heart or part of the heart is included in the treatment field and this may lead to cardiovascular complications.

The generation of reactive oxygen species (ROS) plays an important role in the pathogenesis of a variety of cardiac diseases. ROS elicit an array of damages to the cell, resulting in the impairment of cellular integrity and function.

In attempts to study radiation-induced atrial morphological changes in animal model, female and male Wistar rats 3 months old were used. The animals were anaesthetized with thiopentone and the hearts irradiated with doses of 5, 10 and 15Gy. Previously were performed tomography of the hearts. The rats were then sacrificed in three different times, 2 days, 15 days and 12 months, the atrias were prepared for study in optic microscopy and tissue sections were prepared with different colorations. Besides that immunohistochemistry and echocardiogram 4, 8 and 12 months after irradiation were performed.

The morphological alterations were interstitial fibrosis, inflammatory infiltrate and increase in endocardial thickness. The functional injuries were hypertrophy, pericarditis and dysfunctional diastolic deficit.

Adjuvant breast radiotherapy, although effective in improving local control and breast cancer-specific survival, is associated with detrimental cardiovascular complications. The atria are relatively thin walled and function mainly as collection chambers but play a pivotal role in maintaining normal cardiac status especially in cardiac disease.

Key-words: Breast cancer. Radiation. Cardiac complications

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1	Macho 15Gy, 2 dias – Área de fibrose intersticial (Coloração por Hematoxilina-eosina)	30
FIGURA 2	Macho 10Gy, 12 meses – Discreto infiltrado inflamatório intersticial e hipertrofia das fibras (Coloração por Hematoxilina-eosina)	30
FIGURA 3	Fêmea 5Gy, 12 meses – Fibrose (Coloração por Hematoxilina-eosina)	31
FIGURA 4	Macho 15Gy, 2 dias – Área de fibrose intersticial (Coloração por Tricrômico de Gomori)	31
FIGURA 5	Fêmea 15Gy, 2 dias – Endocárdio espessado (Coloração por Tricrômico de Gomori)	31
FIGURA 6	Fêmea 15Gy, 2 dias – Pequena fibrose (Coloração por Tricrômico de Gomori)	32
FIGURA 7	Fêmea 5Gy, 12 meses – Fibrose (Coloração por Tricrômico de Gomori)	32
FIGURA 8	Macho 15Gy, 2 dias – Área de fibrose intersticial (Coloração por Picro Sirius, através de luz polarizada)	32
FIGURA 9	Fêmea 15Gy, 15 dias – Área de fibrose focal (Coloração por Picro Sirius, através de luz polarizada)	33

ÍNDICE DE QUADROS

Quadro 1	Relação entre diâmetros da aorta e átrio esquerdo com relação ao sexo, tempo de sacrifício e dose de irradiação.	34
Quadro 2	Espessura do pericárdio de acordo com o sexo, tempo de sacrifício e dose de irradiação.	34

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	11
2.	OBJETIVOS	21
2.1.	GERAL	21
2.2.	ESPECÍFICOS	21
3.	MATERIAIS E MÉTODOS	22
3.1.	TOMOGRAFIA	22
3.2.	IRRADIAÇÃO	23
3.3.	ANÁLISE FUNCIONAL	23
3.3.1.	Ecocardiograma	23
3.4.	ANÁLISE MORFOLÓGICA	24
3.4.1.	Processamento da amostra para a microscopia ótica	25
3.4.2.	Coloração	25
3.4.2.1.	Hematoxilina-eosina	25
3.4.2.2.	Resorcina–fucsina de Weigert	26
3.4.2.3.	Vermelho de picrosírius	26
3.4.2.4.	Tricrômico de Gomori	27
3.4.3.	Imunohistoquímica	28
3.4.3.1.	Alfa-actina	28
4.	RESULTADOS	30
5.	DISCUSSÃO	35
6.	CONCLUSÃO	38
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	39

1. INTRODUÇÃO

Atualmente, o câncer representa uma das principais causas de morte no mundo. Nesta patologia, as células apresentam um crescimento desordenado, agressivo e incontrolável, determinando um acúmulo de células atípicas, conhecido como tumor. As células, dependendo do grau de diferenciação da neoplasia, podem ser mais ou menos parecidas com as células que lhe deram origem, permitindo a classificação dos tumores em bem, moderadamente ou pouco diferenciados [WONDERGEM, 2001].

Células geneticamente anormais são freqüentemente geradas por fatores ambientais ou por erro na replicação. Ocasionalmente uma parte destas escapa dos controles normais do organismo e aumenta em número. Mutações adicionais são geradas e as células mais agressivas são selecionadas para se proliferarem, caracterizando o câncer [KRUSE *et al*, 2001].

Dentre os diferentes tipos de neoplasia, o câncer de mama representa nos países ocidentais uma das principais causas de morte em mulheres. As estatísticas indicam um aumento rápido e progressivo da sua incidência tanto nos países desenvolvidos quanto nos países em desenvolvimento. No Brasil, segundo o Instituto Nacional de Câncer, foram previstos para 2006 aproximadamente 49 mil novos casos, dos quais 28.640 apenas na região Sudeste [WONDERGEM, 2001].

A mama de mulheres adultas é composta de ductos epiteliais lactíferos que terminam em um alvéolo secretor, embebidos em gordura. O crescimento e desenvolvimento normal desta são regulados pela interação entre os hormônios e fatores de crescimento, sendo que alguns são secretados pelas células mamárias e apresentam função autócrina, e outros são produzidos pelas células do estroma e apresentam função parácrina [KUFÉ *et al*, 2003].

A interação entre fatores de crescimento, citocinas e hormônios com seus receptores de membrana específicos ativa uma cascata de sinalização intracelular, resultando em ativação ou repressão de genes. Uma vez que os hormônios e receptores regulam o tecido mamário normal, não é surpreendente que as células

malignas também expressem os receptores para muitos destes hormônios [KUFÉ *et al*, 2003].

As formas mais eficazes para detecção precoce do câncer de mama são o exame clínico da mama (ECM), a mamografia e o ultra-som, para mamas muito densas. Ultimamente também a ressonância magnética tem detectado tumores precoces, embora não tenha muita especificidade [INCA].

O exame clínico, quando realizado por profissionais treinados, pode detectar tumores de até um centímetro, se forem superficiais, não devendo funcionar como estratégia isolada para a detecção do câncer precoce. A mamografia, por sua vez, é capaz de detectar lesões em fase inicial, de apenas alguns milímetros, permitindo, assim, a detecção precoce do câncer [INCA].

Hoje em dia, a mamografia é a mais eficiente técnica de diagnóstico para mulheres acima de 35 anos, cuja efetividade está associada ao ECM como exame adicional [INCA]. Esta consiste em uma radiografia, onde a imagem produzida ajuda a observação de alterações na mama, e sua necessidade vai depender da idade, dos sintomas e da história médica do paciente [CIP].

É realizada em um aparelho de raios-X apropriado, chamado mamógrafo. Nele, a mama é comprimida de forma a fornecer melhores imagens, e, portanto, melhor capacidade de diagnóstico [CIP].

A sensibilidade varia de 46% a 88% e depende de fatores tais como: tamanho e localização da lesão, densidade do tecido mamário (mulheres mais jovens apresentam mamas mais densas), qualidade dos recursos técnicos e habilidade de interpretação do radiologista. A especificidade varia entre 82% e 99%, e é igualmente dependente da qualidade do exame [CIP].

O tratamento do câncer pode ser feito através de cirurgia, quimioterapia, hormonioterapia, imuno-terapia ou radioterapia [PRORAD]. Fatores como o estágio e o subtipo histológico do tumor, em adição aos fatores do paciente, incluindo idade e menopausa, são indispensáveis para a determinação deste [VIOLET & HARMER, 2004].

A cirurgia é o tratamento definitivo do câncer de mama, compreendendo tanto a mastectomia quanto a segmentectomia (operação de conservação da mama). Em ambas é feito o esvaziamento axilar ou, dependendo do tamanho do tumor, a retirada do linfonodo sentinela. Uma vez que o linfonodo esteja livre de neoplasia, não é necessário o esvaziamento axilar. A radioterapia é recomendada após ambos os procedimentos [VIOLET & HARMER, 2004].

A quimioterapia é um tratamento que utiliza medicamentos para destruir as células doentes que formam um tumor. Dentro do corpo humano, cada medicamento age de uma maneira diferente. Por este motivo são utilizados vários tipos a cada vez que o paciente recebe o tratamento [INCA].

Estes medicamentos se misturam com o sangue e são levados a todas as partes do corpo, destruindo as células doentes que estão formando o tumor e impedindo, também, que elas se espalhem pelo corpo [INCA].

Já a hormonioterapia oferece um benefício potencial para a maioria das mulheres na pós-menopausa com câncer de mama. Esta se baseia na presença dos receptores hormonais de estrogênio e/ou de progesterona no tumor [INGLE, 2005].

A supressão do crescimento do tumor pode ser obtida por: a) Redução dos níveis de estrogênio através de cirurgia, radiação ou ablação química ovariana em mulheres na pré-menopausa, ou através de inibidores da aromatase em mulheres na pós-menopausa; b) Bloqueio da interação entre o estrogênio e seus receptores através de moduladores destes últimos; c) Destruição dos receptores de estrogênio através reguladores [COLOZZA *et al*, 2007].

Se as células cancerígenas da mama são suscetíveis ao controle do sistema imune, o sucesso do câncer de mama depende, então, das estratégias utilizadas na imuno-terapia que levem em conta os mecanismos de escape do tumor [STOFF-KHALILI *et al*, 2006].

A imuno-terapia é geralmente dividida em passiva e ativa. A primeira é realizada através da administração de elementos do sistema imune pré-formados, como anticorpos e citocinas anti-tumorais, ou células efetoras, com a intenção direta de matar as células cancerígenas. A segunda, por sua vez, é feita através da estimulação da

resposta imune do próprio paciente, com o objetivo de gerar uma imunidade anti-tumoral, utilizando vacinas e citocinas estimulatórias [STOFF-KHALILI *et al*, 2006].

A radioterapia, entretanto, representa a modalidade mais utilizada, principalmente nos casos mais avançados, podendo ser aplicada de forma exclusiva ou associada aos outros métodos terapêuticos, como a cirurgia e a quimioterapia [PRORAD].

Através de feixe de radiações ionizantes, a radioterapia é capaz de destruir células tumorais, impedindo sua disseminação. Uma dose pré-calculada de radiação é aplicada, em um determinado tempo, a um volume de tecido que engloba o tumor, buscando erradicar todas as células tumorais, com o menor dano possível às células normais circunvizinhas [INCA].

Um índice terapêutico favorável é obtido quando as células malignas perdem sua clonogenicidade ao mesmo em tempo que se preservam ao máximo os tecidos normais [PRORAD].

A precisão do volume a ser irradiado é o ponto crucial do planejamento radioterápico. Para isso, aplicativos computacionais para tratamento de imagens, como tomografia computadorizada e ressonância magnética, vêm sendo empregados [PRORAD].

A tomografia computadorizada tri-dimensional provê a informação anatômica completa. O volume de tecido normal ao redor do alvo na mama, que normalmente acomete coração e pulmão, pode ser substancialmente diminuído com a utilização desta [MUREN *et al*, 2002].

A irradiação tangencial da mama com menos de 1cm do coração e 2-2.5cm de pulmão incluídos no campo de tratamento causa um risco de mortalidade/morbidade cardíaca e pulmonar de 1% [MUREN *et al*, 20020].

A escolha do tamanho do campo, ou seja, da área da superfície do paciente que se pretende irradiar depende da dimensão do tumor e do volume a ser irradiado. O volume alvo, então, é o volume de tecido que engloba o tumor com uma certa margem de segurança definida pelo médico [PRORAD].

De acordo com a localização e tipo do tumor, a radioterapia é feita de duas formas: com os aparelhos afastados do paciente, chamada teleterapia ou

radioterapia externa; e com os aparelhos em contato com o organismo do paciente, chamada braquiterapia ou radioterapia interna [INCA].

A Braquiterapia é uma modalidade de Radioterapia na qual o elemento radioativo é colocado em proximidade ou dentro do órgão a ser tratado. Para isto são utilizados elementos radioativos específicos, de pequeno tamanho e formas variadas, que são colocados na posição de tratamento através de guias chamados cateteres ou sondas [PRORAD].

Com esta é possível irradiar volumes-alvo muito pequenos com uma alta dose, pois conforme o distanciamento do elemento radioativo a dose decai rapidamente, poupando-se, portanto as estruturas normais vizinhas de receberem a dose total prescrita [PRORAD].

A braquiterapia pode ser utilizada como um acréscimo de dose local após um curso de radioterapia externa ou como um tratamento exclusivo, dependendo da doença [PRORAD].

Apesar do grande progresso na tecnologia dos geradores de raio X, a braquiterapia continua sendo vigorosamente utilizada, pois provê um bom controle local do tumor, com relativamente baixa incidência de seqüelas [PIERQUIN *et al*, 2007].

A teleterapia é a modalidade mais freqüentemente utilizada, na qual a fonte de radiação é externa ao paciente, posicionada a no mínimo 20 cm de sua superfície. Os raios produzidos por fontes, conhecidas, como aceleradores lineares, aparelhos de raios- γ ou aparelhos de raios-X, são direcionados para o corpo do paciente, atingindo o tumor e regiões circunvizinhas. Essa modalidade de terapia permite o tratamento de tumores profundos [PRORAD].

A mais recente técnica de irradiação é a Radioterapia com Feixe de Intensidade Modulada. Por esse método, no qual pequenos colimadores dinâmicos se abrem e fecham de acordo com a necessidade de intensidade da radiação, molda-se o feixe radioativo das composições de campo de um acelerador de tal forma a irradiar o tumor exatamente na sua forma, ou próximo a isso [PRORAD].

A resposta dos tecidos às radiações depende da sensibilidade do tumor à radiação, sua localização e oxigenação, assim como a qualidade e a quantidade da radiação e o tempo total em que ela é administrada [INCA].

A dose terapêutica total para câncer de mama é de 50 *Gray* (Gy) ¹, sendo 2Gy por fração ². Este valor, entretanto, pode variar de paciente para paciente, dependendo de parâmetros clínicos e biológicos, como a extensão do tumor e forma pela qual ele se manifesta [GAGLIARD *et al*, 2000]. Estudos também revelam que as doses únicas são mais prejudiciais que as doses fracionadas [SIME & O'REILLY, 2001]. Entretanto, ainda não é possível quantificar a relação entre dose e complicação [RUTQVIST *et al*, 1992].

Segundo Collis *et al* (2004), baixas taxas de dose de irradiação (1mGy/min) podem danificar o DNA sem a ativação do sistema de reparo, acarretando a morte das células lesadas e explicando o efeito reverso da taxa de dose.

Porém baixas taxas de dose ativam mais a morte celular em algumas linhagens do que em outras, o que explica a efetividade do método no combate ao câncer e a relativamente boa tolerância dos tecidos normais [COLLIS *et al*, 2004].

Os efeitos biológicos das radiações ionizantes são classificados em estocásticos e não estocásticos (determinísticos). Os efeitos estocásticos são aqueles para os quais a probabilidade de ocorrência é função da dose, não apresentando dose limiar. Por sua vez, os efeitos não estocásticos são aqueles cuja gravidade aumenta com o aumento da dose e para os quais existe um limiar de dose [IPEN].

A radiação pode provocar efeitos somáticos, os quais podem ser classificados como imediatos e tardios. Os eventos imediatos são consequência de uma exposição aguda à radiação em um curto intervalo de tempo. Os eventos tardios, por sua vez, são aqueles que apresentam um período de latência relativamente longo após exposição aguda ou crônica [IPEN].

De acordo com a lei de Bergonie e Tribondeau, “a radiosensibilidade é diretamente proporcional à capacidade reprodutora de um tecido e inversamente proporcional ao seu grau de diferenciação”. Essa lei sugere que nem todos os tipos celulares irão responder da mesma forma a uma mesma dose de irradiação [IPEN].

A absorção da radiação ionizante pelos tecidos vivos estimula reações físico-químicas que produzem radicais livres [RODEMANN, 1995]. Espécies reativas de oxigênio induzem a apoptose através de uma gama de danos às células, como

¹ Unidade de energia absorvida (J / Kg), que relaciona a energia depositada (J) e a massa do tecido (Kg).

peroxidação dos lipídios de membrana, degradação de proteínas e quebra do DNA, resultando na perda da integridade e função celular [VON HARSDORF *et al*, 1999].

Um dos mecanismos através do qual a radioterapia causa a regressão tumoral é a destruição da vascularização do tumor. A apoptose das células endoteliais é determinante na resposta do tumor à radiação [ABDULKARIM & DEUTSCH, 2004].

A angiogênese tumoral é regulada localmente pelo balanço entre fatores pró e anti-angiogênicos. O fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) é o fator chave de sobrevivência para as células endoteliais, uma vez que as protege contra os efeitos pró-apoptóticos da irradiação [KUMAR *et al*, 2004].

Radioterapia adjuvante para câncer de mama, apesar de ser efetiva no controle local do tumor e na sobrevivência dos pacientes, é associada a complicações cardiovasculares tardias [DARBY *et al*, 2003]. Isto ocorre porque durante o tratamento é freqüente a irradiação do coração e de alguns vasos, sendo a dose do coração maior quando a mama esquerda é afetada [JOHN CHO *et al*, 2004].

Estudos revelam que a maioria de casos da doença cardiovascular radioinduzida ocorre em pacientes previamente tratados para doença de Hodgkin [ADAMS *et al*, 2003].

Adicionalmente, a inclusão do coração no campo de irradiação acarreta problemas funcionais nos pulmões. Apesar das complicações cardíacas serem tardias, a influência nestes últimos aparece rapidamente [VAN LUIJK *et al*, 2005].

A doença cardiovascular é uma conseqüência direta da irradiação local do coração [SCHULTZ-HECTOR & TROTT, 2007]. A severidade das complicações cardíacas está relacionada ao valor das doses fracionadas [WONDERGEM *et al*, 1996]. Mudanças agudas e crônicas são observadas no tecido cardíaco [GYENES, 1998].

Os danos agudos são caracterizados por um infiltrado de neutrófilos envolvendo todo o tecido cardíaco, poucos dias após a irradiação; dano endotelial, afetando principalmente os capilares; reação inflamatória aguda, com ativação de macrófagos e monócitos, levando à liberação de fatores e citocinas, como por exemplo TNF e interleucinas; e ativação dos mecanismos de coagulação, acarretando deposição de fibrina [GYENES, 1998].

² Dose estabelecida pela International Commission on Radiation Units and Measurements no ano de 1998.

Os danos endoteliais causados regulam positivamente a liberação das citocinas IL-6 e IL-8. Apesar da IL-6 apresentar propriedades anti-inflamatórias, é conhecida por regular indiretamente a proliferação celular endotelial e o fluxo sanguíneo microvascular. Convergentemente, a IL-8 induz a proliferação das células endoteliais, além de ser quimioatraente para leucócitos. Esta proliferação é o evento chave para o desenvolvimento da cardiomiopatia radio-induzida [SCHULTZ-HECTOR & TROTT, 2007].

Efeitos pró-trombóticos também são observados, principalmente através da deposição ou liberação do fator von Willebrand, acarretando aumento da aderência das plaquetas e formação de trombos em capilares e artérias [SCHULTZ-HECTOR & TROTT, 2007].

A doença cardíaca radioinduzida, entretanto, apenas se torna clinicamente aparente alguns anos após a irradiação, sendo caracterizada por alterações progressivas funcionais. A irradiação é somente um fator neste processo multifatorial [SCHULTZ-HECTOR & TROTT, 2007]. Pacientes irradiados apresentam um risco aumentado de morte por problemas cardíacos após 10 anos [GYENES, 1998].

As principais manifestações tardias são pericardite crônica, aterosclerose, anormalidades na condução cardíaca, mudanças valvulares e fibrose pericárdica e miocárdica difusa [BOERMA *et al*, 2005]. Além disso, danos endoteliais ativam a proliferação de fibroblastos e aceleram a aterosclerose [VIOLET & HARMER, 2004] e injúrias radioinduzidas nos capilares são responsáveis pela degeneração isquêmica miocárdica e pela falha cardíaca [SCHULTZ-HECTOR & TROTT, 2007].

Quanto à função autônoma, é observado disfunção na frequência cardíaca, na forma de taquicardia, perda do ritmo circadiano e variabilidade na taxa respiratória do coração [ADAMS *et al*, 2003].

A pericardite após a irradiação é associada a edema, cicatriz fibrótica e adesão do epicárdio e pericárdio. Já com relação à aterosclerose, a radiação parece ser um fator de risco independente, que age em conjunto com outros fatores de risco [SCHULTZ-HECTOR & TROTT, 2007].

O fato dos danos valvulares serem mais comuns e severos no lado esquerdo sugere que a maior pressão do sistema circulatório tem importante papel na gênese da patologia [ADAMS *et al*, 2003].

Citocinas são importantes na sinalização entre células e constituem um componente humoral na resposta celular e tecidual aos danos causados pela irradiação. O fator transformante de crescimento, TGF- β , é a citocina chave que inicia e termina o reparo tecidual, através da indução da diferenciação dos fibroblastos em miofibroblastos, e que tem sua produção aumentada na fibrose radioinduzida [KRUSE *et al*, 2001].

A fibrose cardíaca radioinduzida é caracterizada por mudanças no arranjo colágeno do coração, sendo este o maior componente da matriz extracelular cardíaca. A deposição de colágeno é regulada através do recrutamento e da ativação dos miofibroblastos, que liberam citocinas e/ou fatores de crescimento fibrogênicos [KRUSE *et al*, 2001].

Ao nível microscópico, não é apenas um aumento geral do colágeno, e sim um aumento na proporção do colágeno I com relação ao colágeno III. E esta mudança contribui para a disfunção diastólica mais tarde observada [ADAMS *et al*, 2003].

Krüse *et al.* (2001) verificaram a expressão da citocina TGF- β e colágeno I através de um modelo de estudo de efeitos radiobiológicos cardíacos em ratos da linhagem Sprague-Dawley (*Rattus norvegicus*). A utilização de modelos animais em pesquisas é necessária para responder questões relevantes à resposta biológica de tecidos normais e patológicos, permitindo extrapolar dados para os seres humanos [KRUSE *et al*, 2001].

Apesar de apresentar uma parede relativamente fina e funcionar basicamente como uma câmara de passagem do sangue, o átrio tem papel essencial em manter o funcionamento cardíaco normal, especialmente nas doenças cardíacas. Além disso, é um órgão endócrino por apresentar em sua parede células secretoras capazes de produzir o peptídeo natriurético (ANP), regulador da pressão sanguínea e do balanço de sódio [KRUSE *et al*, 2001].

Os níveis plasmáticos de ANP refletem mal funcionamento cardíaco, o que é diretamente ligado ao aumento da pressão no átrio [WONDERGEM, 2001].

Juntamente com grânulos específicos, o ANP é liberado na circulação em resposta a estresse da parede atrial [KRUSE *et al*, 2001].

Os danos atriais radioinduzidos são visualizados antes que alguma mudança morfológica em outra região anatômica do coração possa ser vista e se caracterizam por uma redução no tamanho do átrio e desenvolvimento de fibrose generalizada [KRUSE *et al*, 2001].

Além disso, pesquisas histopatológicas demonstram alterações na região do sistema de condução átrio-ventricular. Estas levam a anormalidades eletrofisiológicas e distúrbios de coordenação na contração miocárdica [KESKIKURU *et al*, 2004].

2. OBJETIVOS

2.1. GERAL

Desenvolver um modelo de estudo radiobiológico em ratos Wistar (*Rattus norvegicus*).

2.2. ESPECÍFICOS

Avaliar morfologicamente os efeitos atriais radioinduzidos através da microscopia óptica, utilizando-se a hematoxilina-eosina (HE), colorações especiais e imunohistoquímica.

Avaliar as alterações morfológicas e funcionais atriais quanto ao tempo de sacrifício, à dose de irradiação e ao sexo do animal.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Devido à praticidade e fisiologia, os ratos foram utilizados preferencialmente para a realização do experimento. Além do baixo custo de aquisição e manutenção em laboratório, são mamíferos muito resistentes. Apresentam pequeno porte, reproduzem-se facilmente e produzem grande prole, o que permite observar os resultados em diferentes gerações.

Foram selecionados, aleatoriamente, 224 ratos Wistar (*Rattus norvegicus*), de ambos os sexos, provenientes de cruzamentos ao acaso. Esses animais foram divididos em três grupos teste (56 animais por grupo) e um grupo controle (56 animais). Apresentavam três meses de vida, aproximadamente, e peso médio de 250g, quando adquiridos da Universidade de São Paulo (USP). Os animais tiveram ciclo claro / escuro de 12h e receberam água e comida *ad libitum*.

A quantidade de cobaias utilizadas representa um número mínimo que permite comparações entre os resultados dos diferentes grupos. A linhagem Wistar foi selecionada por ser mais acessível no mercado e apresentar um maior número disponível.

Apesar de a incidência de câncer de mama ser maior em mulheres do que em homens [INCA], ambos os sexos foram selecionados a fim de se permitirem comparações entre os grupos.

Segundo Chadda e Devaud (2005), a natureza da resposta a um estresse e seu impacto na saúde depende do tipo do estresse, assim como a sensibilidade do organismo a este. Muitos fatores influenciam a percepção e a resposta ao estresse e um deles é o sexo. Geralmente fêmeas são mais sensíveis do que os machos, porém os esteróides ovarianos apresentam uma função protetora de moderação da resposta.

3.1. TOMOGRAFIA: Alguns ratos foram analisados por tomografia em tomógrafo Helicoidal Computadorizado (THC); Fabricante: General Electric; Modelo: HiSpeed 2246999-3; Série: 8219794M2, a fim de se determinar o volume cardiopulmonar.

3.2. IRRADIAÇÃO: Os ratos foram anestesiados via intrabdominal com tiopental (marca Cristalia) (0,05 g / Kg), imobilizados em suporte de isopor, e irradiados através do acelerador linear Varian® (Clinac 2100), em posição supino, com feixe de fótons de energia nominal de 6 MV e taxa de dose de 240 cGy / min³. As doses administradas foram de 500, 1000 e 1500 cGy no volume cardiopulmonar. estabelecido, num campo de 3X3 cm² direcionado ao coração, sendo colocado um bolus⁴ de 0,5 cm.

A tomografia e a irradiação foram realizadas no Hospital Universitário Clementino Fraga Filho (HUCCF / UFRJ). A escolha do anestésico tiopental está relacionada a sua disponibilidade no Hospital Universitário Pedro Ernesto (HUPE / UERJ), apesar do conhecimento de que se trata de um anestésico responsável pela depressão do sistema cardiovascular e respiratório em humanos e animais durante a sua ação [MUREN *et al*, 2002].

No Departamento de Microscopia e Histologia do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes (IBRAG / UERJ), os animais foram sacrificados após dois e quinze dias, e doze meses da irradiação, e os seus respectivos tecidos foram processados para a verificação dos efeitos imediatos e tardios. A duração desse trabalho, desde a seleção dos animais até a análise de resultados, foi de dois anos.

3.3. ANÁLISE FUNCIONAL: Os ratos foram anestesiados via intrabdominal com tiopental (marca Cristalia) (0,05 g / Kg) e submetidos ao exame de ecocardiograma nos tempos de 4, 8 e 12 meses após a irradiação para a verificação funcional do coração.

3.3.1. ECOCARDIOGRAMA

Os ratos anestesiados foram tricotomizados na região do tórax e posicionados em decúbito lateral esquerdo, visando a aquisição de imagens. O exame foi realizado através do aparelho Esaote com transdutor de 10MHZ e Caris Plus by Italy. Foi feita a análise da relação entre os diâmetros da aorta e do átrio esquerdo, nos três

³ A taxa de dose (cGy / min) estabelece uma relação entre a energia depositada (cGy) e o tempo (min), indicando, portanto, a velocidade de deposição de energia.

⁴ Constituído de material semelhante ao tecido na superfície do rato, é utilizado para se obter uma distribuição de energia mais homogênea no volume cardíaco a ser irradiado.

tempos, para a observação da anatomia cardíaca, e da espessura do pericárdio (cm), apenas nos tempos de oito e 12 meses.

Todos os exames foram conduzidos pelo mesmo observador experiente e todas as medidas foram adquiridas em triplicatas, sendo posteriormente calculados os valores médios e realizados os testes estatísticos.

No 4º mês, onde foi analisado somente o grupo controle e o grupo irradiado com 15Gy, foi empregado o teste T e a análise de variância e, nos 8º e 12º mês, onde foi comparado os resultados dos diferentes grupos (controle e irradiados com 5, 10 e 15Gy), as comparações foram efetuadas pela análise de variância (ANOVA), seguidas de teste de comparações múltiplas de Bonferroni.

3.4. ANÁLISE MORFOLÓGICA: Os átrios foram pesados e fixados em formaldeído 10% (marca Merck). Após 48 horas, o tecido sofreu processamento técnico, inclusão em parafina e cortes com espessura de cinco micra. Os cortes foram colocados em cinco lâminas para visualização por microscopia ótica. Os tecidos sofreram cortes em micrótomo e as peças foram inseridas em lâminas.

Para a observação da arquitetura tecidual, parte do material foi submetida às colorações por hematoxilina-eosina, resorcina-fucsina de Weigert, vermelho de picrosírius e tricrômico de Gomori, sendo essas duas últimas específicas para a marcação de fibras colágenas.

Para a qualificação de componentes ultraestruturais dos tecidos analisados, a outra parte do material foi submetida às técnicas de marcação imunohistoquímica através da utilização de anticorpo (marca Dako) para a biomolécula alfa actina de músculo liso (α -actina), de acordo com o método utilizado por Arias et al. (2003).

Dessa forma, a hipótese de Kruse et al (2001) foi testada, verificando-se a associação entre dose da radiação e o seu efeito fibrogênico.

3.4.1. PROCESSAMENTO DA AMOSTRA PARA A MICROSCOPIA ÓTICA

Após a fixação em formaldeído 10%, as peças foram clivadas e incluídas em cassete para o processamento histológico, sendo lavadas em água corrente por 10-15 minutos.

O material incluído nos cassetes sofreu desidratação em banhos consecutivos de etanol (marca Merck), cujas concentrações eram crescentes de 70%, 90% e 100%, no tempo de 30 – 40 minutos por banho.

Em seguida, foi realizado o clareamento em dois banhos consecutivos de xilol (marca Merck), no tempo de 30 – 40 minutos por banho.

As amostras foram submetidas a dois banhos consecutivos de parafina à temperatura de 37°C, no tempo de 15 minutos cada banho.

Após os consecutivos banhos, foi realizada a inclusão do material no bloco de parafina. Os blocos foram cortados e as lâminas preparadas com cortes de tecido com espessura média de cinco micrômetros.

3.4.2. COLORAÇÃO

3.4.2.1. HEMATOXILINA-EOSINA

Inicialmente, as lâminas sofreram desparafinização em três banhos consecutivos de xilol, sendo 3 minutos em cada banho. Em seguida, passaram pela bateria de hidratação em banhos consecutivos de etanol, cujas concentrações eram decrescentes de 100%, 90%, 70% e, por último, água destilada, sendo 3 minutos em cada solução.

Os tecidos foram corados com hematoxilina de Harris por 5 minutos e lavados em água corrente para retirar o excesso. Em seguida, foram lavados em água destilada e corados com eosina por 3 minutos.

Após serem lavados em água corrente, eles sofreram desidratação, começando-se com a água destilada e seguindo-se os banhos consecutivos de etanol em concentrações crescentes de 70%, 90% e 100%, sendo 3 minutos em cada solução.

Para clarificar, sofreram três banhos consecutivos de xilol, sendo 3 minutos em cada banho.

A montagem da lâmina foi realizada com Entellan (marca Merck) e lamínula, deixando-se secar, no mínimo, de um dia para outro.

3.4.2.2. RESORCINA – FUCSINA DE WEIGERT (SEM OXIDAÇÃO)

Inicialmente, as lâminas sofreram desparafinização em três banhos consecutivos de xilol, sendo 3 minutos em cada banho. Em seguida, passaram pela bateria de hidratação e desidratação em banhos consecutivos de etanol, cujas concentrações eram decrescentes de 100%, 90%, 70%, água destilada, e concentrações de etanol crescentes de 70% e 90%, sendo 3 minutos em cada solução.

Os tecidos foram corados com resorcina – fucsina de Weigert por 20 minutos e lavados em banhos consecutivos de etanol 90%, 70% e água destilada, sendo 3 minutos em cada solução.

Foram corados com Orange G por 10 – 15 segundos e sofreram desidratação, começando-se com a água destilada e seguindo-se os banhos consecutivos de etanol em concentrações crescentes de 70% e 90%, sendo 3 minutos em cada solução.

Para clarificar, sofreram três banhos consecutivos de xilol, sendo 3 minutos em cada banho.

A montagem da lâmina foi realizada com Entellan (marca Merck) e lamínula, deixando-se secar, no mínimo, de um dia para outro.

3.4.2.3. VERMELHO DE PICROSÍRIUS

Inicialmente, as lâminas sofreram desparafinização em dois banhos consecutivos de xilol, sendo 1 minuto em cada banho. Em seguida, passaram pela bateria de hidratação em banhos consecutivos de etanol, cujas concentrações eram decrescentes de 100%, 90%, 70% e, por último, água destilada, sendo 1 minuto em cada solução.

Os tecidos foram corados com vermelho de picrossírius por 5-60 minutos, passados em solução de HCl 0,01N (marca Merck) durante 2 minutos, e lavados em água destilada para retirar o excesso. Em seguida, foram corados com hematoxilina de Harris por 3 minutos e lavados em água corrente durante 10 minutos.

Após serem lavados em água corrente, eles sofreram desidratação, começando-se com a água destilada e seguindo-se os banhos consecutivos de etanol em concentrações crescentes de 70%, 90% e 100%, sendo 1 minuto em cada solução.

Para clarificar, sofreram dois banhos consecutivos de xilol, sendo 1 minuto em cada banho.

A montagem da lâmina foi realizada com Entellan (marca Merck) e lamínula, deixando-se secar, no mínimo, de um dia para outro.

3.4.2.4. TRICRÔMICO DE GOMORI

Inicialmente, as lâminas sofreram desparafinização em três banhos consecutivos de xilol, sendo 3 minutos em cada banho. Em seguida, passaram pela bateria de hidratação em banhos consecutivos de etanol, cujas concentrações eram decrescentes de 100%, 90%, 70% e, por último, água destilada, sendo 3 minutos em cada solução.

Os tecidos foram corados com hematoxilina de Harris por 2-3 minutos e lavados em água corrente para retirar o excesso. Em seguida, foram corados pelo tricrômico de Gomori por 15 – 30 minutos e diferenciados em ácido acético 0,2% (marca Merck) por 10 segundos.

Após serem lavados em água corrente, eles sofreram desidratação, começando-se com a água destilada e seguindo-se os banhos consecutivos de etanol em concentrações crescentes de 70%, 90% e 100%, sendo 3 minutos em cada solução.

Para clarificar, sofreram três banhos consecutivos de xilol, sendo 3 minutos em cada banho.

A montagem da lâmina foi realizada com Entellan (marca Merck) e lamínula, deixando-se secar, no mínimo, de um dia para outro.

3.4.3. IMUNOHISTOQUÍMICA

3.4.3.1. ALFA-ACTINA

1° DIA

Inicialmente, as lâminas sofreram desparafinização em três banhos consecutivos de xilol, sendo 5 minutos em cada banho. Em seguida, passaram pela bateria de hidratação em banhos consecutivos de etanol, cujas concentrações eram decrescentes de 100%, 90%, 70%, sendo 2 minutos em cada solução.

As lâminas foram montadas em câmara úmida e lavadas com PBS três vezes, por 5 minutos cada. Em seguida, aplicou-se a tripsina (marca Dako) a 37 °C deixando-a agir de 5 - 20 minutos. Após esse tempo, os tecidos foram lavados com água destilada por 5 minutos.

As lâminas foram lavadas novamente com PBS duas vezes, por 5 minutos cada. O soro de cabra 1% (PBS / BSA) foi aplicado deixando-o agir durante 1 hora. Por último, anticorpo primário para alfa – actina foi aplicado e deixado overnight.

2° DIA

As lâminas foram lavadas com PBS três vezes, por 5 minutos cada. O anticorpo secundário (marca Dako) foi aplicado deixando-o agir por 40 minutos, exceto no controle negativo.

Os tecidos foram lavados com PBS três vezes, por 5 minutos cada. O complexo ABC estreptavidina (marca Dako) foi aplicado, atuando por 30 minutos. Em seguida, as lâminas foram lavadas novamente com PBS três vezes, por 5 minutos cada.

DAB (marca Dako) foi aplicado e, após 10 segundos, as lâminas foram lavadas com água destilada. Os tecidos foram corados com hematoxilina de Harris por 5 minutos e lavados em água corrente por 1 minuto.

Em seguida, os tecidos sofreram desidratação, começando-se com a água destilada e seguindo-se os banhos consecutivos de etanol em concentrações crescentes de 70%, 90% e 100%, sendo 1 minuto em cada solução.

Para clarificar, sofreram três banhos consecutivos de xilol, sendo 1 minuto em cada banho.

A montagem da lâmina foi realizada com Bálsamo do Canadá e lamínula, deixando-se secar, no mínimo, de um dia para outro.

4. RESULTADOS

Por microscopia ótica, através da coloração com hematoxilina-eosina, observou-se nos machos áreas de fibrose intersticial, já nos ratos do grupo de 2 dias (Figura 1).

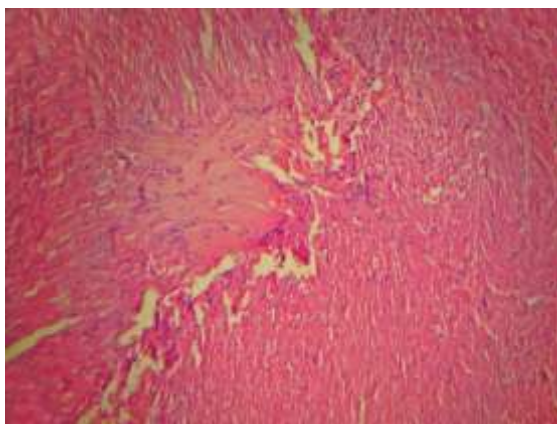


FIGURA 1: Macho 15Gy, 2 dias – Área de fibrose intersticial (Coloração por Hematoxilina-eosina)

No tempo de 12 meses, além da fibrose, também foi verificado discreto infiltrado inflamatório e hipertrofia das fibras musculares a partir da dose de 10Gy (Figura 2).

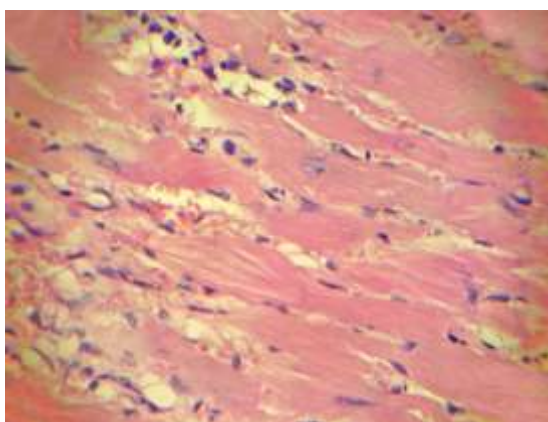


FIGURA 2: Macho 10Gy, 12 meses – Discreto infiltrado inflamatório intersticial e hipertrofia das fibras (Coloração por Hematoxilina-eosina)

Nas fêmeas, por sua vez, área de fibrose envolvendo miócitos degenerados e infiltrado inflamatório estavam presentes nos ratos do grupo de 12 meses irradiados com 5Gy (Figura 3).

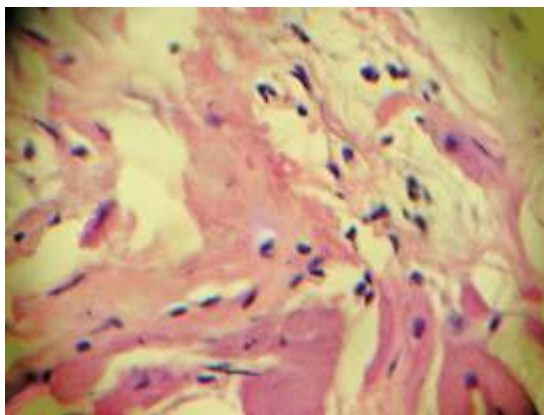


FIGURA 3: Fêmea 5Gy, 12 meses – Fibrose (Coloração por Hematoxilina-eosina)

Através do Tricrômico de Gomori verificou-se nos machos, no grupo de 2 dias, fibrose intersticial focal dissociando as fibras musculares. Entretanto, nas fêmeas, a fibrose estava presente desde o tempo de 2 dias. Além disso, os ratos sacrificados neste último apresentaram também um espessamento no endocárdio (Figuras 4, 5, 6, 7).

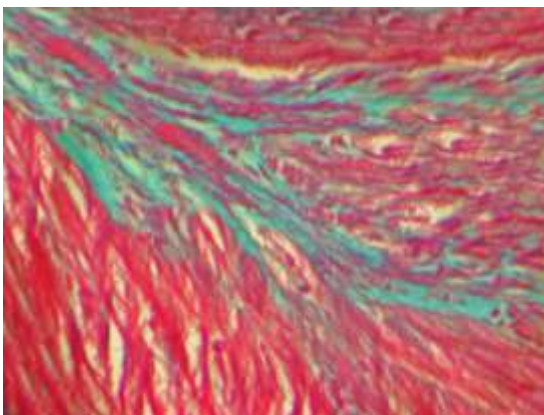


FIGURA 4: Macho 15Gy, 2 dias – Área de fibrose intersticial (Coloração por Tricrômico de Gomori)

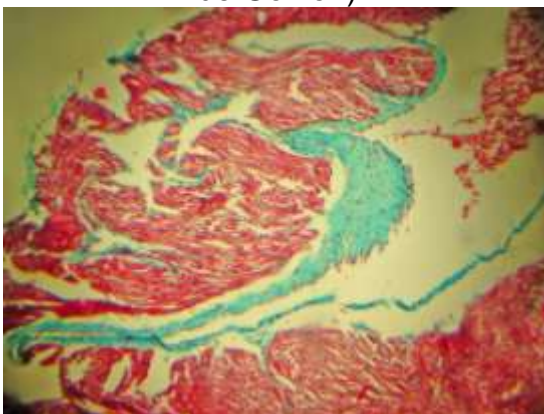


FIGURA 5: Fêmea 15Gy, 2 dias – Endocárdio espessado (Coloração por Tricrômico de Gomori)

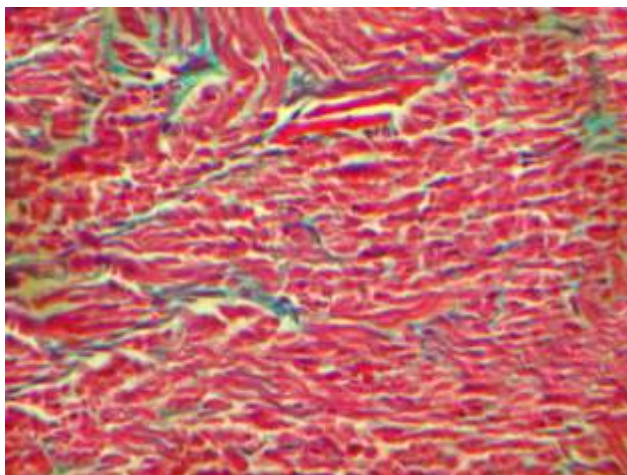


FIGURA 6: Fêmea 15Gy, 2 dias – Pequena fibrose (Coloração por Tricrômico de Gomori)

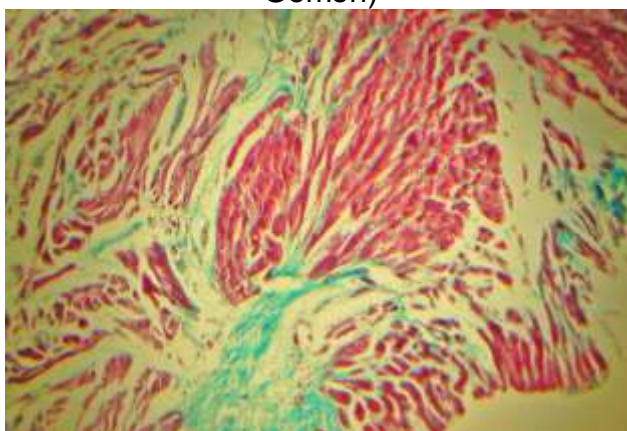


FIGURA 7: Fêmea 5Gy, 12 meses – Fibrose (Coloração por Tricrômico de Gomori)

Através do Picrosírius, por sua vez, foi observado nos machos área de fibrose intersticial, já no grupo de 2 dias. Nas fêmeas verificou-se fibrose somente a partir do tempo de sacrifício de 15 dias (Figuras 8, 9).

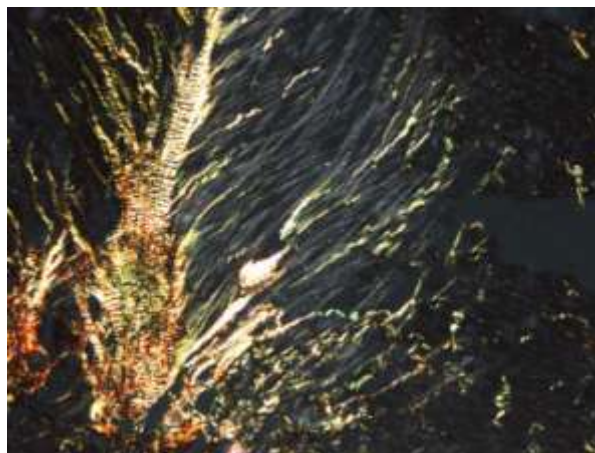


FIGURA 8: Macho 15Gy, 2 dias – Área de fibrose intersticial (Coloração por Picro Sirius, através de luz polarizada)



FIGURA 9: Fêmea 15Gy, 15 dias – Área de fibrose focal (Coloração por Picro Sirius, através de luz polarizada)

A coloração com resorcina-fucsina e a imunohistoquímica com alfa-actina não proveram alterações significativas.

Com relação ao ecocardiograma, constatou-se que, em ambos os sexos, apenas ocorreu uma diminuição significativa da relação aorta / átrio esquerdo nos ratos que receberam a dose de 15Gy. Porém, nas fêmeas, essa diminuição já foi possível ser observada no tempo de sacrifício de quatro meses após a irradiação, enquanto nos machos, apareceu somente a partir do tempo de oito meses (Quadro 1).

Em situações normais, a relação acima é geralmente de 1:1 e sua diminuição corrobora com a ocorrência de hipertrofia concêntrica do coração, ou seja, o aumento da parede deste, enquanto a luz do órgão diminui. Essa situação acarreta um aumento na pressão diastólica do ventrículo esquerdo e, conseqüentemente, dificuldade de esvaziamento atrial. O átrio esquerdo, então, aumenta de tamanho para tentar expulsar o sangue do seu interior, explicando a diminuição da relação, pois a aorta tem seu tamanho mantido.

Ao/AE	4 meses Controle	4 meses 15Gy	8 meses Controle	8 meses 5Gy	8 meses 10Gy	8 meses 15Gy	12 meses Controle	12 meses 5Gy	12 meses 10Gy	12 meses 15Gy
Macho	0,99 ± 0,11	0,95 ± 0,09	1,04 ± 0,06	0,95 ± 0,1	0,95 ± 0,01	0,88** ± 0,04	1,04 ± 0,09	1,02 ± 0,05	0,98 ± 0,06	0,88** ± 0,05
Fêmea	0,99 ± 0,03	0,93** ± 0,04	1 ± 0,04	1 ± 0,021	0,98 ± 0,02	0,92** ± 0,05	1,16 ± 0,17	1,05 ± 0,04	0,95 ± 0,04	0,90** ± 0,13

Quadro 1: Valores expressos em média \pm desvio padrão. A estatística dada por Teste T, com significância indicada como *P<0,05 e **P<0,01 em relação ao controle, foi realizada para os dados obtidos com 4 meses. Para os demais tempos as comparações foram efetuadas pela análise de variância (ANOVA), seguidas de teste de comparações múltiplas de Bonferroni. Ao= aorta; AE= átrio esquerdo.

Analisando-se o pericárdio, verificou-se um aumento na sua espessura conforme o aumento da dose em ambos os sexos. Porém, nas fêmeas, o espessamento se desenvolveu com aspectos localizados, já no tempo de oito meses, enquanto nos macho apenas apareceu no tempo de 12 meses. Isso foi verificado individualmente, através da análise longitudinal anterior e posterior e transversal anterior e posterior, para ambos os sexos (Quadro 2).

Parâmetros (cm)	Macho				Fêmea			
	8 meses Controle	8 meses 15Gy	12 meses Controle	12 meses 15Gy	8 meses Controle	8 meses 15Gy	12 meses Controle	12 meses 15Gy
PLA	0,08 ± 0,02	0,08 ± 0,01	0,08 ± 0,03	0,11** ± 0,03	0,063 ± 0,023	0,081 ± 0,022	0,06 ± 0,01	0,09** ± 0,02
PLP	0,1 ± 0,02	0,08 ± 0,02	0,07 ± 0,01	0,09** ± 0,02	0,07 ± 0,02	0,1 ± 0,03	0,08 ± 0,01	0,092 ± 0,01
PTA	0,09 ± 0,02	0,08 ± 0,02	0,09 ± 0,02	0,16* ± 0,05	0,06 ± 0,02	0,09* ± 0,02	0,067 ± 0,013	0,09** ± 0,02
PTP	0,09 ± 0,007	0,09 ± 0,03	0,08 ± 0,01	0,11** ± 0,02	0,08 ± 0,01	0,11** ± 0,02	0,08 ± 0,01	0,11* ± 0,03

Quadro 2: Valores expressos em média \pm desvio padrão. A estatística dada por Teste T, com significância indicada como *P<0,05 e **P<0,01 em relação ao controle, foi realizada para os dados obtidos com 4 meses. Para os demais tempos as comparações foram efetuadas pela análise de variância (ANOVA), seguidas de teste de comparações múltiplas de Bonferroni. PLA=pericárdio longitudinal anterior; PLP= pericárdio longitudinal posterior; PTA= pericárdio transversal anterior; PTP= pericárdio transversal posterior.

5. DISCUSSÃO

As alterações histopatológicas verificadas nesse trabalho são pertinentes com aquelas relatadas na literatura, como a pericardite, anormalidades na circulação sanguínea e fibrose [BOERMA *et al*, 2005; GYENES, 1998; KRUSE *et al*, 2001].

Comparando-se os animais dos grupos de 2 dias e 15 dias, aparentemente não são evidenciados graus distintos de alterações morfológicas imediatas radioinduzidas. Comparando-se esses animais dos grupos de efeitos imediatos com o grupo de efeitos tardios, cujo período de latência foi maior, percebe-se que, de uma forma geral, conforme há o aumento da dose de irradiação, a gravidade das complicações atriais também aumenta. Isso pode ser verificado através do aumento de intensidade do infiltrado inflamatório e da constatação de hipertrofia das fibras musculares nas lâminas analisadas.

Além disso, as fêmeas se mostraram serem mais sensíveis, porém, no fim, aparentaram ter menos lesões que os machos. Isso pode ser observado no maior grau de fibrose e no aparecimento de fibras musculares hipertrofiadas nos machos.

A menor lesão aparente em fêmeas pode estar associada à sua melhor capacidade de reparo, associada a fatores hormonais protetores, conforme relatado na literatura. Apesar de serem geralmente mais sensíveis ao *stress* que os machos, os hormônios esteróides ovarianos demonstraram apresentar uma função protetora de modulação de resposta ao *stress* em estudos com animais de laboratório realizados por Chadda e Devaud (2005).

Para eles, a natureza da resposta a um *stress* e seu impacto na saúde depende tanto do tipo de agente estressante quanto da sensibilidade do organismo a ele. Além disso, existiriam diferenças sexuais nas respostas neuroquímicas envolvendo vários sistemas de neurotransmissores, com envolvimento de receptores GABA, bem como ativação do eixo hipotalâmico-pituitária-adrenal (HPA) em resposta ao estímulo estressante quando comparada aos machos [CHADDA & DEVAUD, 2005].

Para melhor conhecimento e entendimento das alterações cardíacas decorrentes da irradiação, estudos futuros poderiam aplicar a técnica da estereologia, de acordo com o método descrito por Mandarim-De-Lacerda *et al* (2003).

Resume-se em um método de morfologia quantitativa que permite interpretar o arranjo tridimensional interno através análise de cortes da estrutura tecidual que fornecem, apenas, uma informação bidimensional, levando em consideração geometria e probabilidade estatística [ÁGUILA *et al*, 1998].

Dessa forma, pode-se inferir estatisticamente a porcentagem de fibrose e outras alterações morfológicas verificadas, possibilitando um estudo quantitativo das variáveis qualitativas analisadas.

Um outro recurso que poderia ser utilizado é a análise bioquímica e molecular para biomoléculas como citocinas e outras moléculas envolvidas no processo de fibrose, como por exemplo o TGF- β e o colágeno I.

O TGF- β tem um importante papel da regulação da síntese, remodelamento e degradação da matriz extracelular. A fibrose é causada por uma mudança no arranjo de colágeno e a deposição deste é regulada pelo recrutamento e ativação de miofibroblastos, cuja indução é decorrente do TGF- β [KRUSE *et al*, 2001].

Além disso, a imunohistoquímica com anticorpo para o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) é uma ferramenta interessante para o estudo dos processos através dos quais os tumores resistem à irradiação. Estudos revelam que a indução do VEGF pela radiação ionizante objetiva o favorecimento do tumor, através do aumento da radioresistência do endotélio vascular tumoral [GUPTA *et al*, 2002].

Uma alternativa para a prevenção dos efeitos pós-tratamento seria a administração de medicamentos com atividade citoprotetora, a fim de se reduzir a severidade dos danos radioinduzidos. O uso de antioxidantes para combater as espécies reativas de oxigênio, por exemplo, pode surgir como alternativa de tratamento, tendo em conta que pode ser uma estratégia menos onerosa em comparação a outras estratégias terapêuticas [DELANIAN, 1998].

Uma outra alternativa é o tratamento com interferon gama (IFN- γ) que, por tratar-se de citocina do tipo 1, pode combater os efeitos fibrogênicos do TGF beta. Uma desvantagem é que as citocinas têm atuação em todo o organismo e constituem uma rede intrincada de moléculas contribuindo para vários efeitos celulares. O tratamento

por longos períodos com esta citocina poderia desencadear efeitos colaterais desconhecidos [SHIRATORI *et al*, 2000].

6. CONCLUSÃO

A irradiação causa danos cardíacos aos pacientes tratados com radioterapia para câncer de mama, caracterizando o quadro da doença cardiovascular radioinduzida, cujas principais manifestações verificadas foram fibrose, infiltrado inflamatório e espessamento do endocárdio e pericárdio.

De uma maneira geral, verificou-se uma relação diretamente proporcional entre a dose de radiação e a severidade dos efeitos observados nos ratos. As fêmeas se mostraram mais sensíveis à irradiação que os machos, porém ao final, apresentavam menos lesões, indicando uma melhor capacidade de reparo.

O estudo de novas técnicas é necessário para evitar ao máximo que o coração e pulmão sejam atingidos. Os passos mais importantes para a diminuição da dose recebida pelo coração são: uso de aceleradores lineares modernos; uso de técnicas 3D e da terapia de radiação com intensidade modulada (IMRT); e redução na dose.

A homogeneização da dose de distribuição, assim como a redução da irradiação do coração e pulmão, são possíveis através de técnicas modernas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ABDULKARIM, B., DEUTSCH, E. *Endotelial-cell apoptosis and tumour response to radiotherapy*. *Oncology*, 5: 9, 2004.
- 2.→ADAMS, M. J., HARDENBERGH, P. H., CONSTINE, L. S., LIPSHULTZ, S. E. *Radiation-associated cardiovascular disease*. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 45: 55-75, 2003.
- 3.→ÁGUILA, M. B., MANDARIM-DE-LACERDA, C. A., APFEL, M. I. R. *Estereologia do miocárdio de ratos jovens e idosos*. *Arq. Bras. Cardiol.*, 70(2): 105-109, 1998.
- 4.→ARIAS, V., MAZZA, P. L., FUNKE, M. A. A. *Tissue processing for hormone receptor immunohistochemistry in breast cancer: two moments in a pathology laboratory; correlation of results with a biochemical assay*. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, 39(3): 223-228, 2003.
- 5.→BOERMA, M., WANG, J., WONDERGEM, J., JOSEPH, J., QIU, X., KENNEDY, R. H., HAUER-JENSEN, M. *Influence of mast cells on structural and functional manifestations of radiation-induced Heart disease*. *Cancer Res.*, 65(8): 3100-3106, 2005.
- 6.→CHADDA, R., DEVAUD, L. L. *Differential effects of mild repeated restraint stress on behaviors and GABA_A receptors in male and female rats*. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 81: 854-863, 2005.
- 7.→COLLIS, S. J., SCHWANINGER, J. M., NTAMBI, A. J. *Evasion of early cellular response mechanisms following low level radiation induced DNA damage*. *J. Biol. Chem.* 279: 49624-49632, 2004.
- 8.→COLOZZA, M., DE AZAMBUJA, E., PERSONENI, N., LEBRUN, F., PICCART, M. J., CARDOSO, F. *Achievements in systemic therapies in the pregenomic era in metastatic breast cancer*. *Oncologist*, 12: 253-270, 2007.
- 9.→DARBY, S., MCGALE, P., PETO, R., GRANATH, F., EKBOM, P. H., EKBOM, A. *Research pointers: mortality from cardiovascular disease more than 10 years after radiotherapy for breast cancer: nationwide cohort study of 90 000 Swedish women*. *BMJ*, 326: 256-257, 2003.
- 10.→DELANIAN, S. *Striking regression of radiation-induced fibrosis by a combination of pentoxifyline and tocopherol*. *The British Journal of Radiology*, 71: 892-894, 1998.
- 11.→GAGLIARD, G., BJÖHLE, J., LAX, I., OTTOLENGHI, A., ERIKSSON, F., LIEDBERG, A., LIND, P., RUTQVIST, L. E. *Radiation pneumonitis after breast cancer irradiation: analysis of the complication probability using the relative seriality model*. *Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys.*, 46 (2): 373-381, 2000.
- 12.→GUPTA, V. K., JASKOWIAK, N. T., BECKETT, M. A., MAUCERI, H. J., GRUNSTEIN, J., JOHNSON, R. S., CALVIN, D. A., NODZENSKI, E., PEJOVIC, M., KUFEL, D. W., POSNER, M. C., WEICHSELBAUM, R. R. *Vascular endothelial growth factor enhances endothelial cell survival and tumor radioresistance*. *The Cancer Journal*, 8(1): 47-54, 2002.

- 13.→GYENES, G. *Radiation-induced ischemic heart disease in breast cancer*. Acta Oncologica, 37 (3): 241-246, 1998.
- 14.→INGLE, J. N. *Endocrine therapy trials of aromatase inhibitors for breast cancer in the adjuvant and prevention settings*. Clinical Cancer Research, 11: 900-905, 2005.
- 15.→JOHN CHO, B. C., SCHWARZ, M., MIJNHEER, B. J., BARTELINK, H. *Simplified intensity-modulated radiotherapy using pre-defined segments to reduce cardiac complications in left-sided breast cancer*. Radiotherapy and Oncology, 70: 231-241, 2004.
- 16.→KESKIKURU, R., JUKKOLA, A., NUUTINEN, J., KATAJA, V., RISTELI, J., AUTIO, P., LAHTINEN, T. *Radiation-induced changes in skin type I and III collagen synthesis during and after conventionally fractionated radiotherapy*. Radiotherapy and Oncology, 70: 243-248, 2004.
- 17.→KRÜSE, J. J. C. M., ZURCHER, C., STROOTMAN, E. G., BART, C. I., SCHLAGWEIN, N., LEER, J. W., WONDERGEM, J. *Structural changes in the auricles of the rat Heart after local ionizing irradiation*. Radiotherapy and Oncology, 58: 303-311, 2001.
- 18.→KUFE, D. W., POLLOCK, R. E., WEICHSELBAUM, R. R., BAST, R. C. J., GANSLER, T. S., HOLLAND, J. F., FREI III, E. Cancer Medicine. Seção 1, cap. 3, 6ª edição, Canadá, 2003.
- 19.→KUMAR, P., MILLER, A. I., POLVERINI, P. J. *P38 MAPK mediates γ -irradiation-induced endothelial cell apoptosis, and vascular endothelial growth factor protects endothelial cells through the phosphoinositide 3-kinase-akt-bcl-2 pathway*. The Journal of Biological Chemistry, 279(41): 43352-43360, 2004.
- 20.→MUREN, L. P., MAURSTAD, G., HAFSLUND, R., ANKER, G., DAHL, O. *Cardiac and pulmonary doses and complication probabilities in standard and conformal tangential irradiation in conservative management of breast cancer*. Radiotherapy and Oncology, 62: 173-183, 2002.
- 21.→PIERQUIN, B., TUBIANA, M., PAN, C., LAGRANGE, J., CALITCHI, E., OTMEZGUINE, Y. *Long-term results of breast cancer irradiation treatment with low-dose-rate external irradiation*. Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys., 67(1): 117-121, 2007.
- 22.→RODEMANN, HP. *Bases celulares da fibrose radioinduzida*. Radiotherapy and Oncology, 35: 83-90, 1995.
- 23.→RUTQVIST, L. E., LAX, I., FORNANDER, T., JOHANSSON, H. *Cardiovascular mortality in a randomized trial of adjuvant radiation therapy versus surgery alone in primary breast cancer*. Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys., 22: 887-896, 1992.
- 24.→SCHULTZ-HECTOR, S., TROTT, K. *Radiation-induced cardiovascular diseases: is the epidemiologic evidence compatible with the radiobiologic data?* Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys., 67(1): 10-18, 2007.
- 25.→SHIRATORI, Y., IMAZEKI, F., MORIYAMA, M., YANO, M., ARAKAWA, Y., YOKOSUKA, O., KUROKI, T., NISHIGUCHI, S., SATA, M., YAMADA, G., FUJIYAMA, S., YOSHIDA, H., OMATA, H. *Histologic Improvement of*

- Fibrosis in Patients with Hepatitis C Who Have Sustained Response to Interferon Therapy. Annals of Internal Medicine* 132(7):517-524, 2000.
- 26.→SIME, P. J., O'REILLY, K. M. A. *Fibrosis of the lung and other tissues: new concepts in pathogenesis and treatment. Clinical Immunology*, 99 (33): 308-319, 2001.
- 27.→STOFF-KHALILI, M. A., DALL, P., CURIEL, D. T. *Gene therapy for carcinoma of the breast. Cancer Gene Therapy*, 13 (7): 633-647, 2006.
- 28.→SUMITRA, M., MANIKANDAN, P., RAO, K. V. K., NAYEEM, M., MANOHAR, B. M., PUVANAKRISHNAN, R. *Cardiorespiratory effects of diazepam-ketamine, xylazine-ketamine and thiopentone anesthesia in male Wistar rats – a comparative analysis. Life Sciences*, 75: 1887-1896, 2004.
- 29.→VAN LUIJK, P., NOVAKOVA-JIRESOVA, A., FABER, H., SCHIPPERS, J. M., KAMPINGA, H. H., MEERTENS, H., COPPES, R. P. *Radiation damage to the Heart enhances early radiation-induced lung function loss. Cancer Res.*, 65 (15): 6509-6511, 2005.
- 30.→VIOLET, J. A., HARMER, C. *Breast cancer: improving outcome following adjuvant radiotherapy. The British Journal of Radiology*, 77: 811-820, 2004.
- 31.→VON HARSDORF, R., LI, P., DIETZ, R. *Signaling pathways in reactive oxygen species-induced cardiomyocyte apoptosis. Circulation*, 99: 2934-2941, 1999.
- 32.→WONDERGEM, J., FRANKEN, N. A. P., VAN DER LAARSE, A., PERSONS, C. C. M., VAN RAVELS, F. J. M., REIJNART, I. C. W., STROOTMAN, E. G. *Changes in cardiac performance and sympathetic stimulation during and after fractionated radiotherapy in a rat model. Radiotherapy and Oncology*, 38: 33-40, 1996.
- 33.→WONDERGEM, J. *Circulating atrial natriuretic peptide plasma levels as a marker for cardiac damage after radiotherapy. Radiotherapy and Oncology*, 58: 295-301, 2001.
- 34.→Centro de Diagnósticos Avançados – www.cip.com.br, acessado em 14/08/06.
- 35.→Instituto Nacional de Câncer – www.inca.gov.br, acessado em 15/08/06.
- 36.→Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – www.ipen.br, acessado em 15/08/06.
- 37.→Pro Rad – www.prorad.com.br, acessado em 15/08/06.