



Universidade do Estado do Rio de Janeiro
Centro Biomédico
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes

Cherley Borba Vieira de Andrade


**Avaliação de alterações morfológicas da pele após
lesão radioinduzida em ratos Wistar**

Rio de Janeiro

2010

Cherley Borba Vieira de Andrade

**Avaliação de alterações morfológicas da pele após
lesão radioinduzida em ratos Wistar**



Dissertação apresentada, como requisito parcial
para obtenção do título de Mestre, ao Programa
de Pós-Graduação em Biociências, da
Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Eduardo Veloso de Almeida

Rio de Janeiro

2010

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

A553 Andrade, Cherley Borba Vieira de.
Avaliação de alterações morfológicas da pele após lesão radioinduzida em ratos Wistar / Cherley Borba Vieira de Andrade. – 2010.
88 f. : il.

Orientador: Carlos Eduardo Veloso de Almeida.
Dissertação (Mestrado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. Pós-graduação em Biociências.

1. Pele – reparos e reconstrução – Teses. 2. Pele – Câncer – Imagens – Teses. 3. Radioterapia – Teses. 4. Efeitos de radiação. 4. Radiação ionizante - Dosimetria. 5. Fator transformador de crescimento beta. 6. Colágeno – Teses. I. Almeida, Carlos Eduardo Veloso de. II. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara. III. Título.

CDU 616-003.9

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

Assinatura

Data

Cherley Borba Vieira de Andrade

**Avaliação de alterações morfológicas da pele após
lesão radioinduzida em ratos Wistar**

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Biociências, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 25 de fevereiro de 2010.

Orientador:

Prof. Dr. Carlos Eduardo Veloso de Almeida
Universidade do Estado do Rio de Janeiro - UERJ

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Jorge Jose de Carvalho
Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

Prof. Dr. Alexandre Felip Silva Corrêa
Universidade Veiga de Almeida - UVA

Prof.^a Dra. Nadja Lima Pinheiro
Faculdade de Medicina - UGF

Rio de Janeiro

2010

DEDICATÓRIA

Dedico primeiramente a Deus, por ser o governante da minha vida.

Aos meus pais José Paulo (*in memoriam*) e Aurelina por estarem sempre ao meu lado, me dando apoio nos momentos em que mais precisei.

Ao meu irmão Charles pelo companheirismo em todas as horas.

À minha filha Raphaelly razão do meu viver e amor da minha vida.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, meu irmão e minha filha pela compreensão nos momentos de ausência que não foram poucos, carinho e companheirismo constante em minha vida.

Ao meu orientador Carlos Eduardo pela confiança no meu trabalho e pela ajuda no meu crescimento profissional.

Aos funcionários do Centro Universitário de Controle de Câncer da UERJ, sem eles boa parte desse trabalho não aconteceria.

Aos amigos do Laboratório de Ultraestrutura e Biologia Tecidual. Laboratório o qual passei boa parte da minha caminhada.

À professora Andrea Monte Alto pela disponibilidade constante em me ajudar na análise do material do projeto.

Ao professor Jorge José de Carvalho por me acolher mais uma vez em seu laboratório e pela orientação.

Aos técnicos do Laboratório de Microscopia Eletrônica, em especial ao amigo Alan Cesar por sempre estar disponível para me auxiliar, sem esquecer das varias risadas que me proporcionou.

Aos amigos mais que amados do Laboratório de Ciências Radiológicas: Claudia, Shirlei, Rubens, Leonardo, Ronaldo, Luis, Marcio, Renato, Josmael, Marilene, Andréia, Marcela, Sane, entre outros pelo incentivo constante, pela distração proporcionada, pelas risadas, por tudo.

As minhas amigas Claudia Marcello, Camilla Sampaio, Camila Salata e Viviane Fernandes por fazerem meus dias mais alegres e por todo carinho demonstrado.

As amigas Ana Heloísa Medeiros e Aluana Santana por tudo que me proporcionaram e que ainda irão proporcionar.

À amiga de todas as horas Márcia Gianfaldoni, obrigada por fazer parte da minha vida pessoal e profissional.

Um agradecimento mais que especial a Bióloga Ana Lucia do Nascimento, que sempre esteve presente na minha caminhada profissional, é mais do que uma amiga é uma irmã.

Ao professor Antonio Carlos de Freitas um amigo que encontrei.

Aos meus familiares por entenderem minha ausência em vários momentos

A todos os meus amigos que fazem da minha vida uma constante alegria.

Ao CNEN pela bolsa concedida.

Ao meu pai José Paulo (*in memoriam*), onde quer que o senhor esteja sei que torce por mim. Mais uma vitória conquistada.

A Deus por estar sempre ao meu lado.

RAIOS

Raios de sol que aquecem e iluminam...
Raios cósmicos, grande explosão...
Raios que matam e raios que curam...
Vida! ... Meia – vida! ... Radiação...

Radiação apreendida e domada...
Colocada pelo homem a trabalhar...
Fazendo com que a vida, condenada...
Possa por mais tempo, continuar...

Ah! Feixes de elétrons comportados...
Para total benefício dos pacientes...
Cumpram seu papel, acelerados...
Destruindo todas as células doentes...

No entanto, com todo o cuidado...
As doses devem ser administradas...
Só o tumor deve ser bombardeado...
Senão a vida pode ficar complicada...

Raios de sol que aquecem e iluminam...
Raios cósmicos, grande explosão...
Raios que matam e raios que curam...
Vida! ... Meia – vida! ... Radiação...

(Marcia Garcia Gianfaldoni)

RESUMO

ANDRADE, Cherley Borba Vieira. *Avaliação de alterações morfológicas da pele após lesão radioinduzida em ratos Wistar*, 2010. 88 f. Dissertação (Mestrado em Biociências) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2010.

A radioterapia é uma das modalidades terapêuticas mais utilizadas no tratamento do câncer, visando à destruição das células neoplásicas, a partir da utilização de radiação ionizante. Um dos fatores limitantes da radioterapia é o dano em tecidos sadios vizinhos ao tumor. A irradiação da pele, acidental ou para fins terapêuticos, pode desencadear uma série de lesões culminando na fibrose, o que implica na alteração funcional deste órgão. A avaliação dos efeitos morfológicos associados à irradiação da pele torna-se fundamental para estabelecer estratégias de irradiação mais eficazes e diminuição da morbidade; e em caso de acidentes, adequado manuseio da vítima. O objetivo deste estudo foi avaliar as alterações dérmicas radioinduzidas, utilizando um modelo em ratos. Ratos Wistar, machos, com três meses de idade, tiveram sua pele irradiada, em um campo de 3cm², com doses únicas de 10, 40 e 60 Gy de elétrons com energia nominal de 4MeV. Após a irradiação, os animais permaneceram sob avaliação constante, sendo as lesões registradas fotograficamente. Os animais foram divididos em grupos e eutanasiados: no dia da irradiação, 5, 10, 15, 25 e 100 dias após a irradiação. Parte da pele foi fixada em formaldeído, incluída em parafina e submetida à microtomia. Os cortes foram corados com hematoxilina-eosina, picrosirius red e imunomarcados com anticorpo anti-TGF-beta1. Outra parte do tecido foi fixada em glutaraldeído e processada para microscopia eletrônica de varredura. Foi observado macroscopicamente o surgimento de lesões cutâneas semelhantes a queimaduras em toda área irradiada. Ao microscópio óptico foi verificado o início de desenvolvimento de lesão 5 dias após irradiação. Decorridos 10 dias da irradiação observou-se indícios de cicatrização epidérmica abaixo da crosta formada pela lesão. Aos 15 dias após a irradiação o tecido abaixo da lesão apresentava epiderme reconstruída e características de cicatrização tecidual. Foi visualizado também um infiltrado de polimorfonucleares significativo. Após 25 dias nas doses mais elevadas as lesões persistiam, o que não ocorreu na menor dose, na qual a área irradiada dos animais já se encontrava completamente cicatrizada. Após 100 dias da irradiação na dose de 40 Gy ocorreu a cicatrização da ferida. Na dose de 60 Gy em alguns animais a lesão persistia. Nos animais em que ocorreu a cicatrização houve uma hipertrofia da epiderme (acantose). Foi visualizado um tecido com aspecto morfológico totalmente descaracterizado, e necrosado. Os resultados encontrados na análise através de microscopia eletrônica de varredura corroboram os dados encontrados na microscopia de luz, onde observou-se a descaracterização das fibras de colágeno nas doses mais elevadas. Os resultados indicam que as doses utilizadas induziram um processo inflamatório importante na pele, ativando o sistema imunológico. Este fato promoveu um aumento na expressão do TGFbeta1, um dos responsáveis pelo aumento da produção da matriz extracelular por vários tipos celulares, principalmente por fibroblastos em tecidos lesionados. Além do aumento de expressão da MEC, o TGFbeta1 também promove a inibição dos processos de degradação da mesma. A intensa expressão desta citocina na pele irradiada pode desencadear o processo de fibrose e, conseqüentemente, afetar a homeostase deste órgão devido ao acúmulo da MEC.

Palavras-chave: Pele. Radiação ionizante. Reparo Tecidual. TGF-beta. Colágeno.

ABSTRACT

Radiation therapy is one of the most commonly used therapeutic modalities in cancer treatment, aiming the destruction of neoplastic cells using ionizing radiation. A limiting factor is the radiation damage in healthy tissues neighboring the tumor. The irradiation of the skin, accidentally or for therapeutic purposes, can trigger a series of injuries culminating in fibrosis, causing functional alterations in this organ. The morphological evaluation of the effects associated with skin irradiation becomes essential to establish more effective strategies for irradiation and decreased morbidity, and in case of accidents, proper handling of the victim. The aim of this study was to evaluate the radiation-induced dermal changes, using a rats model. Male Wistar rats, three months old, had their skin irradiated, in a 3cm² field, with single doses of 10, 40 and 60 Gy of electrons with nominal energy of 4MeV. After irradiation, the animals were kept under constant observation, lesions were recorded photographically. The animals were divided into groups and euthanized: on the day of irradiation, 5, 10, 15, 25 and 100 days after irradiation. Part of the skin was fixed in formaldehyde, embedded in paraffin and subjected to microtomy. Sections were stained with hematoxylin-eosin, picrosirius red and immunostained with anti-TGF-beta1. Another part of the tissue was fixed in glutaraldehyde and processed for scanning electron microscopy. It was observed macroscopic skin lesions similar to burns throughout the irradiated area. It was verified, by optical microscopy, the early development of lesions 5 days after irradiation. After 10 days of irradiation there was evidence of epidermal wound healing under the crust formed by the injury. At the day 15 days the tissue below the lesion was reconstructed and had characteristics of healing, displaying a significant polymorphonuclear cells infiltration. After 25 days, at the higher doses, the lesions persisted, which did not occur at the lowest dose, which the irradiated area was already completely healed. After 100 days of irradiation with 40 Gy the wound was healed. With 60 Gy, in some animals, the lesion persisted. In the animals which the healing took place there was a hypertrophy of the epidermis (acanthosis). It was observed a tissue totally morphological mischaracterized, and necrotic. The results obtained by scanning electron microscopy analysis corroborate with the optical microscopy findings, where the higher doses collagen fibers were mischaracterized. The results indicate that the doses used induced a significant inflammation in the skin, activating the immune system. This fact promoted an increased expression of TGFbeta1, which is responsible for an increased production of extracellular matrix (ECM) by various cell types, mainly fibroblasts in injured tissues. Besides the increased expression of ECM, the TGFbeta1 also promotes the inhibition of the degradation processes of the same. The intense expression of this cytokines in irradiated skin can trigger the process of fibrosis and, consequently, affect the homeostasis of the body due to accumulation of ECM.

Keywords: Skin. Ionizing Radiation. Wound healing. TGF-beta. Collagen.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Quadro 1 –	Distribuição dos animais de acordo com a dose e tempo.....	29
Figura 1 –	Fotografias demonstrando o processo de anestesia e região tricotomizada para irradiação.....	29
Figura 2 –	Fotografias demonstrando o bloco de alloy utilizado para irradiação de dois animais, acelerados CLINAC 2100 e cobaias na posição adequada para irradiação.....	30
Quadro 2 –	Anticorpo utilizado na análise imunohistoquímica.....	34
Figura 3 –	Fotografias demonstrando lesões radioinduzidas em animais irradiados com dose de 10 Gy.....	35
Figura 4 –	Fotografias demonstrando lesões radioinduzidas em animais irradiados com dose de 40 Gy.....	37
Figura 5 –	Fotografias demonstrando lesões radioinduzidas em animais irradiados com dose de 60 Gy.....	39
Figura 6 –	Fotomicrografias de cortes histológicos de pele corados com H-E dos animais irradiados com 10 Gy, utilizando objetiva de 20x.	41
Figura 7 –	Fotomicrografias de cortes histológicos de pele corados com picrosirius red dos animais irradiados com 10 Gy, utilizando objetiva de 20x.	43
Figura 8 –	Fotomicrografias de cortes histológicos de pele corados com H-E dos animais irradiados com 40 Gy, utilizando objetiva de 20x.	45
Figura 9 –	Fotomicrografias de cortes histológicos de pele corados com H-E dos animais irradiados com 40 Gy, utilizando objetiva de 40x.	46
Figura 10 –	Fotomicrografias de cortes histológicos de pele corados com picrosirius red dos animais irradiados com 40 Gy, utilizando objetiva de 20x.....	48
Figura 11 –	Fotomicrografias de cortes histológicos de pele corados com H-E dos animais irradiados com 60 Gy, utilizando objetiva de 20x.	50
Figura 12 –	Fotomicrografias de cortes histológicos de pele corados com H-E dos animais irradiados com 60 Gy, utilizando objetiva de 40x.	51
Figura 13 –	Fotomicrografias de cortes histológicos de pele corados com picrosirius red dos animais irradiados com 60 Gy, utilizando objetiva de 20x.....	53

Figura 14 – Fotomicrografias de cortes histológicos de pele imunomarcados com anticorpo anti-TGF-beta 1 dos animais irradiados com 10 Gy, utilizando objetiva de 20x.....	55
Figura 15 – Fotomicrografias de cortes histológicos de pele imunomarcados com anticorpo anti-TGF-beta 1 dos animais irradiados com 40 Gy, utilizando objetiva de 20x.....	57
Figura 16 – Fotomicrografias de cortes histológicos de pele imunomarcados com anticorpo anti-TGF-beta 1 dos animais irradiados com 40 Gy, utilizando objetiva de 40x.....	58
Figura 17 – Fotomicrografias de cortes histológicos de pele imunomarcados com anticorpo anti-TGF-beta 1 dos animais irradiados com 60 Gy, utilizando objetiva de 20x.....	60
Figura 18 – Fotomicrografias de cortes histológicos de pele imunomarcados com anticorpo anti-TGF-beta 1 dos animais irradiados com 60 Gy, utilizando objetiva de 40x.....	61
Figura 19 – Micrografias eletrônicas de varredura dos animais irradiados com 10 Gy.....	62
Figura 20 – Micrografias eletrônicas de varredura dos animais irradiados com 40 Gy.....	63
Figura 21 – Micrografias eletrônicas de varredura dos animais irradiados com 60 Gy.....	64

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C	–	Graus Celsius
µm	–	Micrometro
AC	–	Acantose
Alloy	–	Liga metálica
BSA	–	“Bovine Serum Albumin” – Soro Albumina Bovina
CACO	–	Tampão Cacodilato
cm ²	–	Centímetros quadrado
CNEN	–	Comissão Nacional de Energia Nuclear
CO ₂	–	Gás Carbônico
Col I	–	Colágeno do tipo 1
Col III	–	Colágeno do tipo 3
DAB	–	Diaminobenzidina
DNA	–	Ácido Desoxirribonucléico
F	–	Fibrose
FC	–	Fibras de colágeno
FCD	–	Fibras de colágeno delgadas
FCE	–	Fibras de colágeno espessas
Gr	–	Gramas
Gy	–	Gray
HCl	–	Ácido Clorídrico
H-E	–	Hematoxilina e Eosina
IAEA	–	“International Agency Energy Atomic” – Agência Internacional de Energia Nuclear
INCa	–	Instituto Nacional do Câncer

MEV –	Microscopia Eletrônica de Varredura
MeV –	Megaeletron Volts
N –	Normalidade
Ne –	Necrose
PBS –	“Phosphate Buffered Saline” – Tampão Fosfato de Sódio
pH –	Potencial de Hidrogênio
RT –	Radioterapia
RTOG –	“Radiation Therapy Oncology Group”
TC –	Tecido Cicatrizado
TG –	Tecido de Granulação
TGF-beta –	“Transforming Growth Factor” – Fator Transformante de Crescimento Beta
UERJ –	Universidade do Estado do Rio de Janeiro

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	16
1	OBJETIVOS	27
1.1	Geral	27
1.2	Específico	27
2	MATERIAL E MÉTODOS	28
2.1	Animais utilizados no trabalho	28
2.2	Irradiação dos animais	28
2.3	Análise macroscópica	31
2.4	Coleta do Material	31
2.5	Processamento para microscopia de luz	31
2.6	Análise histológica	32
2.6.1	<u>Coloração com Hematoxilina-Eosina</u>	32
2.6.2	<u>Coloração com picro Sirius red</u>	32
2.7	Análise Imunohistoquímica	33
2.8	Processamento para microscopia eletrônica de varredura	34
3	RESULTADOS	35
3.1	Avaliação macroscópica	35
3.1.1	<u>Grupo 10 Gy</u>	35
3.1.2	<u>Grupo 40 Gy</u>	36
3.1.3	<u>Grupo 60 Gy</u>	38
3.2	Avaliação da microscopia de luz	40
3.2.1	<u>Resultados da técnica histológica</u>	40
3.2.1.1	Grupo 10 Gy.....	40
3.2.1.1.1	Coloração com Hematoxilina – Eosina.....	40
3.2.1.1.2	Coloração com picrosirius red.....	42
3.2.1.2	Grupo 40 Gy.....	44
3.2.1.2.1	Coloração com Hematoxilina – Eosina.....	44
3.2.1.2.2	Coloração com picrosirius red.....	47
3.2.1.3	Grupo 60 Gy.....	49
3.2.1.3.1	Coloração com Hematoxilina – Eosina.....	49
3.2.1.3.2	Coloração com picrosirius red.....	52

3.2.2	<u>Resultados da técnica de imunohistoquímica</u>	54
3.2.2.1	<u>Grupo 10 Gy – anti-TGF-beta1</u>	54
3.2.2.2	<u>Grupo 40 Gy – anti-TGF-beta1</u>	56
3.2.2.3	<u>Grupo 60 Gy – anti-TGF-beta1</u>	59
3.3	Avaliação da microscopia eletrônica de varredura	62
3.3.1	<u>Grupo 10 Gy</u>	62
3.3.2	<u>Grupo 40 Gy</u>	63
3.3.3	<u>Grupo 60 Gy</u>	64
4	DISCUSSÃO	65
5	CONCLUSÕES	70
	REFERÊNCIAS	71
	ANEXO - Comitê de ética em pesquisa	78

INTRODUÇÃO

Radioterapia

Câncer é o nome dado a um conjunto de mais de 100 doenças que têm em comum o crescimento desordenado (maligno) de células as quais invadem os tecidos e órgãos, podendo espalhar-se (metástase) para outras regiões do corpo. (INCA, 2002; Dalerba et al, 2007)

Dividindo-se rapidamente, estas células tendem a ser muito agressivas e incontroláveis, determinando a formação de tumores (acúmulo de células cancerosas) ou neoplasias malignas. Outras características que diferenciam os diversos tipos de câncer entre si são a velocidade de multiplicação das células e a capacidade de invadir tecidos e órgãos vizinhos ou distantes (metástases) (INCA, 2002; Gatenby e Gillies, 2008).

O câncer é uma das maiores enfermidades que acometem a população mundial. Dados do INCA informam que no Brasil, as estimativas para o ano de 2008, válidas também para o ano de 2009, apontam que ocorrerão 466.730 casos novos de câncer. Os tipos mais incidentes, à exceção do câncer de pele do tipo não melanoma, serão os cânceres de próstata e de pulmão, no sexo masculino, e os cânceres de mama e de colo do útero, no sexo feminino, acompanhando o mesmo perfil da magnitude observada no mundo (INCA, 2007).

Dentre as modalidades terapêuticas contra o câncer, a radioterapia é uma das mais utilizadas, visando à destruição das células cancerosas, a partir da utilização de radiação ionizante. Esta tem o objetivo de danificar ao máximo as células tumorais, que apresentam uma frequência de divisão celular superior às células normais (INCA, 2002; Basavaraju e Eastely, 2002).

Os danos causados nos tecidos vivos pela radiação são decorrentes da sua interação direta com macromoléculas ou de reações físico-químicas que levam à produção de radicais livres (Magné et al, 2006). A exposição a esses radicais conduz ao aparecimento de alterações biológicas diversas, que podem pôr em risco também a integridade genética. Os radicais livres em especial as espécies reativas de oxigênio, são metabólitos instáveis com capacidade de alterar importantes biomoléculas incluindo lipídios, proteínas e ácidos nucleicos. O aumento do nível desses metabólitos causa lesões celulares que, por sua vez, podem estar relacionados na gênese de uma série de doenças.

A radioterapia pode ser realizada de duas formas, com fontes de radiações internas ao paciente, em contato direto ou próximas ao tumor, fazendo com que o mesmo receba uma maior dose (braquiterapia), ou então com uma fonte de radiação externa, que se encontra a uma distância de 60-100 cm do paciente, emitindo um feixe que alcança a massa tumoral (teleterapia) (Berberich et al, 2001; INCA, 2002).

Na radioterapia (teleterapia), geralmente são utilizados feixes de elétrons ou fótons, sendo a energia e o design do tratamento estabelecidos a partir de parâmetros tais como: tamanho e posição do tumor, profundidade em relação à pele, tipo celular do tumor, características individuais do paciente entre outros (INCA, 2002).

Um dos fatores limitantes do tratamento radioterápico é o fato da radiação, além de promover a morte das células da massa tumoral, alcançar também tecidos saudáveis vizinhos ao tumor, promovendo lesão e morte dos mesmos, podendo também provocar, em muitos casos, lesões indesejáveis na pele.

Nesse órgão a radioterapia pode ocasionar várias alterações histológicas como reação aguda com edema, dermatite, escamação, ulceração, fibrose radio - induzida tardia, necrose e tumores secundários, como sarcoma, carcinomas basocelular e espinocelular (Kupper, 1990; Hopewell, 1990; Archambeau et al, 1995; Harper et al, 2004). O surgimento destas lesões depende, dentre outras causas, da dose depositada na pele e de fatores biológicos inerentes ao paciente (Nouailhetas, 2007).

Acidentes Radiológicos

Com a crescente utilização de fontes radioativas nas áreas médica e industrial, o risco de acidentes radiológicos aumenta consideravelmente. Entende-se como radiação acidental a exposição não planejada de um indivíduo à radiação ionizante, de qualquer natureza, através de uma fonte externa ao organismo. Podem ser citados três tipos de irradiação acidental:

* irradiação de corpo inteiro – quando várias regiões do organismo forem expostas, nesse caso a distribuição da dose, nas diferentes regiões, poderá ter caráter homogêneo ou não. É extremamente improvável que numa exposição de corpo inteiro haja uma distribuição de fato homogênea da dose;

* irradiação parcial – quando apenas um território é exposto, como o segmento cefálico, o abdome ou o tórax. A repercussão clínica de uma irradiação parcial vai depender da extensão do dano e da quantidade de medula óssea preservada;

* irradiação localizada – por exemplo, quando um membro é irradiado acidentalmente, essa irradiação pode trazer consequências completamente diversas da irradiação de corpo inteiro ou parcial com comprometimento de um grande território corporal.

Para minimizar a ocorrência de tais eventos, deve-se implantar e manter condutas de radioproteção adequadas. No entanto, como se pode observar, nos diversos relatos de acidentes descritos pela Agência Internacional de Energia Atômica (IAEA), estes eventos ainda ocorrem com certa frequência, com a exposição de pessoas, por vezes, a altas doses de corpo inteiro ou localizadas de radiação, com a incidência de casos, com gravidade variável, das Síndromes Aguda e/ou Cutânea da Radiação (SAR/SCR). Os dois exemplos descritos abaixo são acidentes registrados pela IAEA.

* Falha no *interlock* do acelerador do tipo NEPTUN 10P® - ocorreu interrupção do fornecimento de energia elétrica durante o tratamento de um paciente, após o retorno da energia, o acelerador foi reiniciado após a checagem de seus controles internos. Os procedimentos de tratamento continuaram com mais quatro pacientes, dois deles reclamaram de uma sensação de queimação durante a irradiação, devido a essas reclamações o técnico resolveu interromper o tratamento. Foram feitas medidas dosimétricas subsequentes e revelaram que o *output* do acelerador estava significativamente maior do que esperado, checagens posteriores verificaram que o sistema de monitoramentos de dose do acelerador não estava funcionando corretamente e, que um dos componentes do sistema de interlocks de segurança estava danificado. Consequentemente, todos os cinco pacientes tratados desenvolveram lesões radioinduzidas de diversos graus de severidade. Os exames médicos revelaram que as lesões de todos os cinco pacientes foram suficientemente graves para indicar o tratamento cirúrgico. Alguns pacientes apresentavam doenças concomitantes que complicavam sua condição (Bialystok, Polônia - 2001);

* Dados do Decaimento Incorretos Para Uma Fonte de Cobalto - Durante o Período de 1974 a 1976, o físico não executou medidas regulares para verificar a calibração e o controle de qualidade, confiando em estimativas do decaimento da fonte de cobalto e com esta estimativa, calculou a taxa de dose e tempo de tratamento dos pacientes. Desta forma, a curva da taxa de dose extrapolou. O decaimento da fonte era determinado através de uma reta, construída em um papel semi-log, relacionando a data com a atividade. O físico ao invés de usar um papel

semi-log, usou um papel comum para plotar a curva de decaimento da fonte de cobalto. Ele continuando a usar a escala linear do papel, na qual plotou a curva de decaimento, gerou dois problemas que são: No eixo Y, os valores de decaimento da fonte passaram a não corresponder aos valores corretos como também no eixo X os valores foram incorretos para as datas. O erro na taxa de dose durou o período de 1974 até 1976. Os pacientes tratados durante este período receberam dose de 10% a 55% superior aos valores prescritos. E a magnitude do erro na taxa de dose aumentava quase linearmente com o tempo. Este acidente veio a ser descoberto, porque os pacientes começaram a manifestar sintomas que caracterizavam super-exposição: 426 pacientes receberam overdoses significativas, 57%, ou seja, 243 morreram no primeiro ano, pacientes que sobreviveram apresentaram complicações no segundo ano devido a overdose, 74 pacientes tiveram complicações significativas durante o primeiro ano depois do tratamento, 78 pacientes sobreviveram mais de 5 anos, dos 78 pacientes, 68% desenvolveram algum tipo de tumor. Complicações específicas nos pacientes do local: 22 pacientes tiveram complicações de pele, 51 pacientes tiveram complicações na bexiga e reto, 15 pacientes tiveram complicações respiratórias, 6 pacientes tiveram complicações cardiovasculares, 18 pacientes tiveram complicações no sistema nervoso. (Ohio, E.U.A.- 1974 a 1976).

A radiobiologia da pele

Descrição Histológica da Pele

A pele é o maior órgão do corpo humano. Ela consiste em duas camadas histológicas de origens diferentes, que se encontram firmemente aderidas uma à outra: a epiderme e a derme (Junqueira et al, 1999).

A epiderme é constituída por um epitélio estratificado pavimentoso queratinizado (queratinócitos) de origem ectodérmica e apresenta outros tipos celulares: os melanócitos, as células de Langerhans e as células de Merkel. Sua espessura e estrutura variam com o local estudado, sendo mais espessa e complexa na palma das mãos e planta dos pés (Hopewell, 1990; Junqueira et al, 1999).

A pele sofre um processo de regeneração constante com células localizadas em sua camada basal, mais profunda, migrando deste para o estrato mais superficial, onde sofrem

alterações morfológicas tornando-se queratinizadas. A seguir, ocorre um processo de descamação, que dá lugar a continua reposição de células mortas por células novas, facilitando o processo de regeneração da epiderme (Ross, 2005). A renovação da epiderme ocorre na espécie humana cada 20 a 30 dias, essa atividade mitótica segue um ritmo diário que é aumentado por estímulos mecânicos (Hopewell, 1990; Junqueira et al, 1999).

A derme é o tecido conjuntivo de origem mesenquimal, sobre o qual se apóia a epiderme e que comunica a epiderme com a hipoderme. A derme apresenta espessura variável. Sua superfície externa é extremamente irregular, observando-se saliências que acompanham as reentrâncias correspondentes da epiderme (Junqueira et al, 1999; Ross, 2005).

A derme apresenta duas regiões de limites poucos distintos, que são a papilar, superficial e a reticular, mais profunda. Ambas as camadas contêm muitas fibras elásticas, responsáveis, em parte, pelas características de elasticidade da pele. A derme é composta por fibroblastos, fibrócitos e seus produtos extracelulares; fibras colágenas e reticulares; matriz contendo glicosaminoglicanas; vasos sanguíneos e pequenos números de macrófagos, linfócitos e mastócitos. Também são encontradas na derme as seguintes estruturas: pêlos, glândulas sebáceas e sudoríparas e unhas (Archambeau, 1987; Hopewell, 1990; Junqueira et al, 1999; Harper et al, 2004).

As fibras colágenas correspondem aproximadamente a 75% do peso da pele. O colágeno tipo I compõe parte considerável das fibras extracelulares, que são, basicamente, responsáveis pela força de tensão da pele. Estima-se que o colágeno tipo I corresponde a 80% de todo colágeno da pele normal de um adulto humano (Uith et al, 1999). Outro tipo de colágeno é o tipo III que é geneticamente diferente do tipo I e representa aproximadamente 10% do colágeno presente na pele normal de um adulto humano (Epstein Jr, 1974)

Foi estabelecido que a propriedade de degradação de fibras de colágeno é um dos pré-requisitos para o funcionamento normal da pele. O acúmulo inadequado das fibras colágenas velhas restringem a remodelação e adaptação da pele. Os colágenos I e III são degradados por diversas proteinases extracelulares, sendo as colagenases, sintetizadas por fibroblastos presentes na pele ou mucosa, a mais importante (Oishi et al, 2002)

A hipoderme é formada por tecido conjuntivo frouxo que une de maneira pouco firme a derme aos órgãos subjacentes. É a camada responsável pelo deslizamento da pele sobre as estruturas na qual se apóia. Dependendo da região em estudo e do grau de nutrição do organismo, a hipoderme poderá ter uma camada variável de tecido adiposo, sendo nele que se

deposita a maior parte dos lipídios. Atualmente a hipoderme não tem sido considerada como sendo uma camada da pele (McQuestion, 2006).

Limiares de Dose

Os acidentes com radiolesões localizadas vêm aumentando nos últimos anos e há a perspectiva para um incremento ainda maior, uma vez que, o uso de fontes radioativas, em diversas aplicações médicas, industriais e de pesquisa vem crescendo (Valverde, 2003). Torna-se, portanto, necessário o conhecimento das alterações de pele radioinduzidas, para minimizar os efeitos associados à irradiação deste órgão.

É extremamente importante em relação à radiosensibilidade celular, tissular e orgânica, o enunciado de Bergonie e Tribondeau (1959): “a sensibilidade das células à irradiação é diretamente proporcional ao seu grau de diferenciação”. Ou seja, quanto menos diferenciada e com maior capacidade de reprodução for a célula, mais radiosensível. Quanto mais diferenciada e menor for sua capacidade proliferativa, mais resistente. Encontra-se exceção apenas nos linfócitos do sangue periférico, que apesar de contrariarem o enunciado são extremamente radiosensíveis, a ponto de se constituírem num indicador biológico da gravidade do dano, em caso de irradiação de corpo inteiro (Valverde, 2003).

Os efeitos determinísticos ou com limiar de dose são aqueles que são reproduzidos se a dose absorvida de radiação estiver acima de um determinado limiar. Por exemplo, para que se desenvolva a síndrome aguda da radiação (SAR) é necessário que pelo menos haja uma dose única absorvida entre 0,8 e 1 Gy, atingindo o corpo inteiro; para o desenvolvimento de uma radiolesão de pele de grau I, a dose local, dependendo da energia da radiação, deve estar entre 3 e 5 Gy. A catarata radioinduzida, a esterilidade, a epilação transitória ou definitiva também são efeitos determinísticos. Estes são dependentes da morte celular (necrose ou apoptose) (Valverde, 2003).

O tempo decorrido entre a exposição e o surgimento de lesões independe da energia transferida pela radiação ao tecido (dose); depende do tempo de trânsito das células das camadas mais internas para as camadas mais externas do tecido. Na pele, o tempo de latência corresponde a uma dezena de dias; nas vilosidades intestinais a ulceração tem início por volta do quarto dia após a exposição (Nouailhetas, 2007).

A manifestação apresentada na pele, proveniente da absorção de uma dose de radiação ionizante, a partir de uma fonte externa ao corpo é conhecida como Síndrome Cutânea da Radiação (SCR) ou radiolesão localizada. Este efeito biológico das radiações ionizantes tem caráter determinístico, com limiar de dose entre 3 e 5 Gy. As radiolesões podem ser divididas em dois tipos: agudas e crônicas. As últimas são extremamente raras atualmente, devido ao controle de doses ocupacionais dos trabalhadores expostos às radiações. Já as agudas são invariavelmente provocadas por acidentes, nos quais a dose foi única ou fracionada, porém em altas taxas, ao longo de alguns dias. Um exemplo de como pode ocorrer uma radiolesão aguda é o extravio de fontes de gamagrafia industrial, as quais sendo encontradas por leigos podem ser colocados em um bolso ou levadas para suas residências. E desta forma, podem não só provocar dano localizado, como também irradiação de corpo inteiro, embora normalmente não uniforme (Jammet et al, 1980).

Existem doses de radiação que, quando depositadas na pele humana, e dependendo da energia correspondente, são associadas a determinados efeitos. Como exemplo, pode-se citar a epilação temporária (> 4 Gy), epilação definitiva (16-20 Gy), radiodermite eritematosa (6-12 Gy), radiodermite exudativa (16-20 Gy) e radionecrose (25 Gy) (Harper et al, 2004; Nouailhetas, 2007).

Os critérios do RTOG são utilizados para identificar os graus das lesões geradas pela radiação ionizante na pele: Grau 0: sem mudanças; Grau I: eritema folicular fraco ou apagado, epilação, descamação seca, diminuição da sudorese; Grau II: eritema brando, descamação úmida em placas, edema moderado; Grau III: descamação úmida confluyente, edema em “casca de laranja”, eritema rubro escuro, brilhante e doloroso; Grau IV: ulceração, hemorragia, necrose (Cox et al, 1995).

A avaliação dos efeitos morfológicos e/ou moleculares associados à irradiação da pele, torna-se fundamental para estabelecer estratégias de irradiação mais eficazes e com menor morbidade (Seares et al, 2001).

Reparo Tecidual

O reparo tecidual ocorre para restaurar a integridade anatômica e funcional do tecido. O mesmo é um estado dinâmico que compreende diferentes processos, entre eles, inflamação, proliferação celular e síntese de elementos que constituem a matriz extracelular, como

colágeno, elastina e fibras reticulares (Clark, 1993; Amadeu et al, 2008). A síntese de colágeno é processo rápido e harmônico que tem seu início com a lesão intersticial e se estende até o final da fase de cicatrização, quando ocorre a remodelação dos tecidos (Rochkind et al, 1989; Amadeu et al, 2008).

O primeiro colágeno depositado, de 3 a 5 dias após a lesão, possui fibras mais finas e corresponde ao colágeno do tipo III (Cotran et al, 2000). Progressivamente, esse colágeno é substituído pelo colágeno tipo I, que é mais resistente. Em duas semanas as fibras colágenas tipo I são predominantes (Brasileiro et al, 2004).

Os processos de cicatrização e reparo tecidual ocorrem após trauma ou doença (Shal et al, 1994; Amadeu et al, 2008). O reparo das feridas e sua reestruturação constituem mecanismo complexo, em que vários fatores contribuem para a criação de diversos tipos de cicatrização, como hipertrofia, atrofia ou normotrofia, da área lesionada. Esses processos compreendem três fases: inflamação, granulação e formação de matriz extracelular e remodelamento. Essas fases não possuem limites muito distintos e são sobrepostas no tempo (Clark et al, 1995; Amadeu et al, 2008). Normalmente no processo de cicatrização de feridas, após o início do estágio de granulação, há sutil predominância de macrófagos e aumento do número de fibroblastos com síntese de nova matriz extracelular, ocorrendo a remodelação desses tecidos com a contração do tecido de granulação. Na fase de formação da matriz, os fibroblastos produzem quantidades abundantes de matriz extracelular (Scharffetter et al, 1989).

A fase inflamatória é iniciada após a ruptura de vasos sanguíneos com extravasamento dos constituintes sanguíneos, iniciando-se a produção provisória de matriz extracelular (Clark, 1996). Com o tempo, as plaquetas ativam vários mediadores vasoativos e fatores quimiotáticos, como por exemplo, interleucinas, fator de crescimento vascular endotelial, fator de crescimento epidermal, fator de crescimento derivado de plaquetas e TGF-beta, que faz o recrutamento de células inflamatórias, incluindo neutrófilos e macrófagos, além de fibroblastos e células endoteliais para o local da lesão (Singler et al, 1999; Peled et al, 2000; Amadeu et al, 2003).

Esse estímulo é essencial para a próxima fase, formação do tecido de granulação, caracterizado pela angiogênese, diferenciação miofibroblástica e fibroplasias (Clark, 1996; Singler et al, 1999). Durante essa fase, algumas células se diferenciam em miofibroblastos para síntese de matriz extracelular e gerar força mecânica para contração da lesão (Tomasek

et al, 2002). Outros eventos são cruciais para promover a re-epitelização e para isso ocorre a proliferação e migração de células epiteliais para o tecido lesionado (Usui et al, 2005).

Após a completa reepitelização, a fase de remodelamento inicia-se. Essa fase é caracterizada pela diminuição do tecido de granulação no tecido lesado, ocorrendo significativa diminuição de macrófagos e fibroblastos, e ativação de metaloproteases (MMPs) da matriz para degradação dos componentes da MEC (Zitelli, 1989; Amadeu et al, 2008).

Citocinas e seu papel regulador da radiofibrose

A fibrose é um processo caracterizado pela proliferação e diferenciação de fibroblastos e pela elevada síntese de colágeno tipo I, III e V, proteoglicanas e outros componentes da matriz extracelular. Análise histológica das lesões fibróticas tem revelado a presença de células inflamatórias, fibroblasto e uma quantidade variada de componentes da matriz extracelular (fibronectina, proteoglicanas e colágeno) (Rodemann e Bamberg, 1995; Sime e O'Reilly, 2001; Wynn, 2008).

Como vem sendo descrita por vários autores, a fibrose induzida pela radiação parece ser um processo multicelular, que é mantido através da comunicação entre diferentes células. Essa interação de diferentes tipos celulares, em especial células endoteliais, macrófagos e fibroblastos envolve a reprogramação genética das células que passam a expressar dentro de poucas horas após a irradiação uma série de fatores de crescimento como PDGF, IL-1, TGF-beta e TNF-alfa (Lijnen *et al.*, 2000; Amadeu, 2008). Essa inicial modulação na expressão de genes pode estar relacionada com efeitos tardios da irradiação. A alterada expressão de fatores de crescimento e citocinas podem resultar na interação de várias células que participam no processo fibrótico.

As citocinas são proteínas produzidas, principalmente por células do sistema imune, dentre outros tipos celulares, que têm papel na regulação do crescimento e desenvolvimento celular (Rodemann e Bamberg, 1995). Elas agem basicamente de forma autócrina e parácrina e são encontradas em locais onde houve lesão tecidual (Branton e Kopp, 1999). Acredita-se que existam dois tipos principais de citocinas: as do tipo 1, consideradas anti-fibróticas, promovendo o reparo com restauração do tecido. As do tipo 2, consideradas pró-fibróticas, desencadeando o processo de fibrose. Em condições de fibrose parece haver um desequilíbrio

entre esses dois tipos de citocinas, prevalecendo as citocinas do tipo 2 (Sime e O'Reilly, 2001; Wynn, 2008).

Por exemplo, TGF-beta tem mostrado influenciar na proliferação dos fibroblastos, que pode ser a etapa inicial da fibrose. Ao contrário, IL-1 tem demonstrado ter papel radioprotetor. Sua administração 24 horas antes da irradiação fracionada, pode reduzir as lesões em pulmão (Sime e O'Reilly, 2001; Atamas, 2002).

Numerosos dados têm mostrado TGF-beta1 como uma molécula sinalizadora que apresenta diversas funções incluindo controle do crescimento celular (negativo ou positivo), diferenciação, apoptose (indutor ou inibidor) e produção de matriz extracelular (Chin *et al.*, 2004; Bujak e Frangogiannis, 2007, Berta et al, 2009).

O TGF-beta1, *in vitro* é capaz de induzir um significativo aumento na síntese de DNA e na proliferação de fibroblastos em pulmão. Essa citocina também é capaz de inibir a síntese da enzima colagenase (Ruiz-Ortega *et al.*, 2007).

O TGF-beta participa do processo de fibrogênese e no remodelamento normal do tecido após uma lesão. Apresenta um significativo papel nas complicações fibróticas de radioterapia, quimioterapia e transplante de órgãos. Algumas evidências: o nível de TGF-beta está aumentado em áreas de fibrose, a administração exógena de TGF-beta em cobaias conduz o desenvolvimento de fibrose em alguns órgãos (Sime e O'Reilly, 2001; Bujak e Frangogiannis, 2007; Verrecchia e Mauviel, 2007).

A ligação entre fibrose e TGF-beta tem sido demonstrada claramente em pulmão, fígado e rim. Em doenças fibróticas de todos os três tecidos mostrou-se nas regiões da matriz, aumento de TGF-beta, especialmente da isoforma TGF-beta1 (Ruiz-Ortega et al., 2007; Verrecchia e Mauviel, 2007).

Parte da resposta fibrótica induzida por essa citocina parece estar relacionada com o descontrole do equilíbrio do sistema fibroblasto/miofibroblasto, levando ao acúmulo de colágeno tipo I e III. O TGF-beta1 pode ser produzido por uma variedade de células, incluindo as células envolvidas no processo inflamatório, como os macrófagos, linfócitos, células endoteliais, plaquetas e pelos próprios fibroblastos. Essas citocinas são potentes ativadores da produção de colágeno e outros integrantes da matriz (Sime e O'Reilly, 2001; Bujak e Frangogiannis, 2007; Verrecchia e Mauviel, 2007).

Estratégias de tratamento de fibrose

Embora sejam observadas semelhanças na instalação da fibrose em diferentes órgãos, deve-se atentar que existem importantes diferenças a serem levadas em consideração para criar estratégias de tratamento para a condição, em função do acometimento de cada órgão especificamente (Sime e O'Reilly, 2001).

As estratégias de tratamento da fibrose radioinduzida precisam ser desenvolvidas para garantir que o paciente receba os benefícios do tratamento radioterápico, minimizando-se os efeitos colaterais. Em virtude dos inibidores de HDAC reduzirem os níveis de citocinas radioinduzidas, estes podem ser candidatos para o tratamento da SCR (Chung et al, 2004).

O uso de inibidores de HDAC é uma estratégia promissora, pois, paradoxalmente, podem agir como radiosensibilizadores e radioprotetores, dependendo do tipo celular, do contexto biológico e da forma de administração. Embora alguns trabalhos estejam em desenvolvimento neste sentido, ainda existem muitas lacunas a serem esclarecidas (Karragiannis & El-Osta, 2006).

O uso de antioxidantes, como por exemplo, vitaminas C, E (tocoferol) também auxilia na prevenção de lesões radioinduzidas, pois eles “seqüestram” os radicais livres gerados pela radiação ionizante, com isso diminuindo a probabilidade desses radicais interagirem com biomoléculas, o que ocasionaria efeitos deletérios no tecido irradiado (Pathak et al, 1968; Fuchs et al, 1989; Record et al, 1991; Dirier et al, 2007).

1 OBJETIVO

1.1 Objetivo Geral

A avaliação morfológica dos efeitos radiológicos sobre a matriz extracelular tendo como base de estudo um modelo radiobiológico de dose-resposta, desenvolvido com a utilização de ratos Wistar (*Rattus norvegicus*).

1.2 Objetivos Específicos

- Avaliar o surgimento e o grau de lesões radioinduzidas através dos parâmetros propostos pelo RTOG;
- Estudar a cicatrização do tecido lesionado através da radiação ionizante;
- Observar as alterações morfológicas da matriz extracelular da pele, de acordo com a exposição a diferentes doses de radiação e em função do tempo após a irradiação;
- Analisar a expressão da citocina TGF-beta1 (proteína envolvida no processo de fibrose), na pele dos ratos em diferentes tempos, após a irradiação e
- Analisar a modelagem tecidual após o reparo das lesões provenientes da irradiação.

2 MATERIAS E MÉTODOS

2.1 Animais utilizados no trabalho

Nesse trabalho foram utilizados 85 ratos da espécie *Rattus norvegicus albinus*, da linhagem Wistar, clinicamente saudáveis, machos, com idade aproximada de 3 meses e peso médio de 300 gr. Esses animais foram acondicionados em grupos de 5 animais por gaiolas, cada gaiola medindo 50x32x17 e mantidos em condições ambientais de temperatura (22°C) e luminosidade (ciclo 12 horas dia/12 horas noite), alimentados com ração comercial sólida sob a forma de pelotas (Nuvilab ® CR1) e com água *ad libitum*. Manuseados de acordo com as normas do Comitê de Ética em Pesquisa com Animais da UERJ, através do processo de número CEA/248/2008, sendo eutanasiados em dias específicos.

2.2 Irradiação dos animais

Os animais foram divididos em três grupos experimentais com dose de 10, 40 e 60 Gy conforme Quadro 1. Os ratos foram pré-anestesiados, via intraperitoneal, com xilasina (2mg/kg) e midazolam (2,5 mg/kg) e anestesiados com tiopental (15 mg/kg). Após a anestesia foram tricotomizados na região dorsal inferior numa área de 3 cm², conforme mostrado na figura 1, imobilizados em suporte de isopor na posição de decúbito ventral. Os animais foram submetidos a uma sessão única de radioterapia, tendo como fonte ionizante um acelerador linear modelo CLINAC 2100® da VARIAN, do Centro Universitário de Controle do Câncer da UERJ, com doses únicas de 10, 40 e 60 Gy, com feixes de elétrons de energia nominal de 4 MeV, na região tricotomizada. Foi utilizado um bloco de proteção feito de Alloy adaptado num aplicador para irradiação de elétrons, delimitando dois campos, para que desta forma pudesse ser realizada a irradiação 2 animais por vez, conforme ilustrado na figura 2. Foi utilizado material equivalente ao tecido (bôlus) na espessura de 0,5 cm em cima da área a ser irradiada, para obter uma distribuição mais homogênea da dose, conforme ilustrado na figura 2.

Grupo/ Data da eutanásia	0 dias	05 dias	10 dias	15 dias	25 dias	100 dias	Total
Controle	5	-	-	-	-	-	5
10 Gy	5	5	5	-	5	-	20
40 Gy	5	5	5	5	5	5	30
60 Gy	5	5	5	5	5	5	30
Total	20	15	15	10	15	10	85

Quadro 1: Distribuição dos animais, de acordo com a dose de radiação ionizante e o tempo de análise após o procedimento de irradiação.

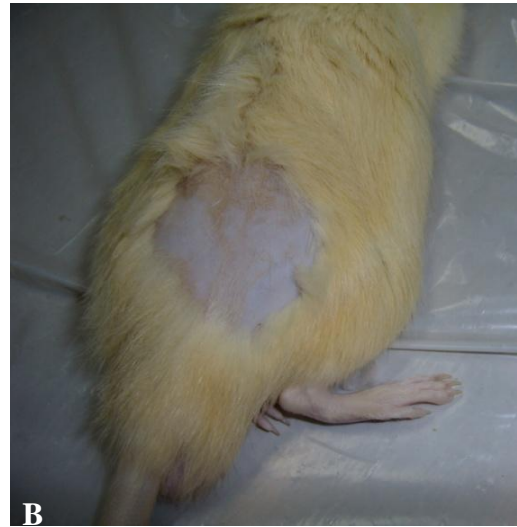


Figura 1: Na fotografia A podemos observar o processo de anestesia da cobaia antes da irradiação. A fotografia B mostra a região tricotomizada no animal, pronta para a irradiação.



Figura 2: Na fotografia A observamos o bloco de proteção feito de Alloy, adaptado num aplicador para irradiação de elétrons, que foi utilizado para delimitar 2 campos e com isso realizar a irradiação de 2 animais por vez. Fotografia B observa-se o acelerador linear Clinac 2100 utilizado para irradiação dos animais. Na fotografia C visualizam-se os animais na posição adequada para a irradiação e com o bôlus na área tricotomizada.

2.3 Análise Macroscópica

Após a irradiação os animais foram avaliados diariamente, sendo as lesões registradas fotograficamente. Para esse registro foi utilizada uma câmera digital Nikon Coolpix L1 (número de série v30359831). As imagens foram tratadas no software Photoshop C3®. As avaliações dos níveis de lesão seguiram os parâmetros ditados pelo RTOG.

2.4 Coleta do Material.

Após a irradiação, os animais foram eutanasiados numa câmara de CO₂ nos dias específicos, conforme o quadro 1. Os fragmentos da pele foram fixados em formol a 10% para posterior processamento para microscopia de luz. Outra parte da pele foi fixada em glutaraldeído a 2,5% para processamento para microscopia eletrônica de varredura.

2.5 Processamento para microscopia de luz

Após a fixação dos fragmentos de pele por 72 horas, os mesmos foram lavados 20 minutos em água corrente para retirada do excesso de fixador. A pele clivada passou por uma etapa de desidratação através de banhos em concentrações crescentes de álcool etílico P.A. (70%, 90% e dois banhos de 100%) com duração de 40 minutos cada. Após a desidratação, a pele passou por um processo de clarificação através de 2 banhos em xileno de 40 minutos cada. Em seguida, a pele foi para a etapa de infiltração (processo no qual a parafina ocupa os espaços ocupados pelo xilol) de parafina através de um primeiro banho de 20 minutos em parafina I, seguido de outro banho de 40 minutos em parafina II (parafina pura). Posteriormente, foram confeccionados blocos através da inclusão da pele em parafina P.A. na temperatura de 60°C. A pele foi cortada (em microtomo da marca Microm modelo HM 325) com espessura média de 5 µm. Os cortes foram recolhidos em lâminas histológicas para posterior coloração com corantes específicos e submetidos à técnica imunohistoquímica.

2.6 Análise histológica

Após o processamento para microscopia de luz as lâminas histológicas foram coradas com corantes específicos para a visualização de várias estruturas celulares.

As lâminas ficaram por 30 minutos em estufa a 37°C e depois ocorreu o processo de desparafinização que consiste na retirada da parafina (para que as soluções utilizadas posteriormente pudessem infiltrar no material) através de 3 banhos em xileno (por 2 minutos cada). Após a desparafinização, os cortes foram hidratados com banhos decrescentes (100%, 90% e 70%) de álcool etílico P.A. e água destilada (todos os banhos tiveram a duração de 2 minutos). Após o banho de água destilada as lâminas foram mergulhadas nos corantes específicos, que serão citados abaixo. Depois do tempo necessário em cada corante, as lâminas passaram por banhos de água destilada para retirada do excesso de corante. Posteriormente, as lâminas foram desidratadas através de banhos crescentes (70%, 90% e 100%) em álcool etílico P.A. e diafanizadas por 3 banhos de xileno, cada banho teve a duração de 2 minutos. As lâminas foram montadas com entelan e lamínula para posterior visualização no microscópio de luz.

2.6.1 Coloração com Hematoxilina-Eosina

Após a desidratação dos cortes, estes foram corados com hematoxilina por 6 minutos. Seguidamente corados com eosina por 3 minutos.

Essa técnica de histológica tem como objetivo corar os núcleos das células de roxo, e o citoplasma de rosa.

O material foi visualizado no microscópio Olympus BX51 e com as imagens capturadas através da câmera DP-72 da Olympus, com software próprio.

2.6.2 Coloração com vermelho de picosirius red

Após o banho de água destilada as lâminas foram coradas com solução de vermelho de picosirius por 30 minutos. Posteriormente, as lâminas foram mergulhadas em solução de ácido clorídrico a 0,1N por 2 minutos, seguidamente lavadas em água destilada para retirada

do ácido e mergulhadas em hematoxilina por 6 minutos. Nessa coloração foi utilizado um microscópio de luz polarizada (Microscópio Olympus BX51) para observação do material

Essa técnica foi utilizada pelo fato de ser um método histológico específico para detecção do colágeno, sendo útil no estudo da distribuição estrutural e diferenciada dos tipos de colágenos, pelo fato da birrefringência da molécula estudada demonstrar diferentes intensidades de cores.

2.7 Técnica Imunohistoquímica

Uma parte das amostras foi utilizada para identificação, através da técnica de imunohistoquímica, da expressão de determinadas proteínas no tecido analisado.

As lâminas foram clarificadas e hidratadas conforme descrito no item 3.6 (análise histológica). Após o banho de água destilada, as lâminas foram transferidas para câmara úmida. O bloqueio da peroxidase endógena foi realizado por 15 minutos, através do peróxido de hidrogênio a 3%. A retirada do excesso de peróxido de hidrogênio a 3% foi realizada com 3 banhos em tampão PBS de 5 minutos cada. Foi realizada recuperação antigênica por 20 minutos, através de tampão citrato pH 6,0 a 96°C. O excesso foi retirado através de 3 banhos em tampão PBS de 5 minutos cada. A reação das amostras com PBS/BSA a 3% por 20 minutos foi realizada para que ocorresse o bloqueio de sítios inespecíficos. Após este intervalo de tempo ocorreu a incubação da amostra com o anticorpo primário (diluído em PBS/BSA a 1%) por 18 horas a 4°C. Após este período o excesso de anticorpo primário foi retirado com 3 banhos em tampão PBS, de 5 minutos cada. Seguidamente foi realizada a incubação do anticorpo secundário, conjugado com biotina (DAKO®) durante 30 minutos, e retirado o excesso do anticorpo secundário através de 3 banhos em tampão PBS de 5 minutos cada. A incubação com streptavidina (utilizado para se conjugar a biotina do anticorpo secundário e com isso amplificar o sinal da reação antígeno-anticorpo (KIT DAKO®)) foi realizada durante 20 minutos. Passado esse intervalo o excesso de streptavidina foi retirado por lavagem única em tampão PBS. Após essa lavagem foi aplicado uma gota de DAB (KIT DAKO®) durante 20 segundos, para evidenciar a reação antígeno-anticorpo, tornando possível a visualização da mesma ao microscópio de luz. A reação com o DAB foi interrompida através da colocação das lâminas em água destilada. O material foi contra corado com hematoxilina por 1 minuto. Após a contra coloração as amostras foram

desidratadas, diafanizadas e montadas, conforme descrito no item 3.6 (análise histológica). O quadro 2 mostra os anticorpos utilizados no projeto com as diluições utilizadas e os fabricantes. O material foi visualizado no microscópio Olympus BX51 e com as imagens capturadas através da câmera DP-72 da Olympus, com software próprio.

Anticorpo	Diluição	Fabricante	Código
TGF-beta 1	1:200	Santa Cruz	Sc-146

Quadro 2: Anticorpo utilizado no projeto, diluição utilizada e fabricante.

2.8 Processamento para microscopia eletrônica de varredura

Os fragmentos de pele após terem sido fixados por 48 horas em glutaraldeído a 2,5% passaram por 3 lavagens em tampão cacodilato de 15 minutos cada. Foi realizada uma pós fixação com tetróxido de ósmio e ferrocianeto de potássio durante 60 minutos. Após a pós fixação com tetróxido de ósmio, ocorreu uma nova etapa de 3 lavagens com tampão Cacodilato por 15 minutos cada. Decorridas as lavagens foi realizada uma etapa de desidratação das amostras através de banhos de 30 minutos em concentrações crescentes de acetona P.A. (30%, 50%, 70%, 90% e dois banhos de 100%).

A partir da desidratação foram realizadas as etapas de ponto crítico (que consiste na substituição do solvente por CO₂) no aparelho Critical Point Dryer CPD2 e metalização (realização de uma camada fina de material condutor) no aparelho Sputter Coater 108 Cressington. Após essas etapas o material foi visualizado no microscópio eletrônico de varredura LEO 1450 VP.

3 RESULTADOS

3.1 Avaliação macroscópica

3.1.1 Grupo 10 Gy

Foi observado predominantemente o aparecimento de eritema (figura 3 A), descamação seca (figura 3 B) e descamação úmida com formação de exsudato inflamatório na pele de alguns animais. Após 15 dias (figura 3 C) a pele dos animais já se encontrava completamente cicatrizada e com o crescimento normal de pêlos. Seguindo os critérios do RTOG as lesões visualizadas foram de grau I e II.

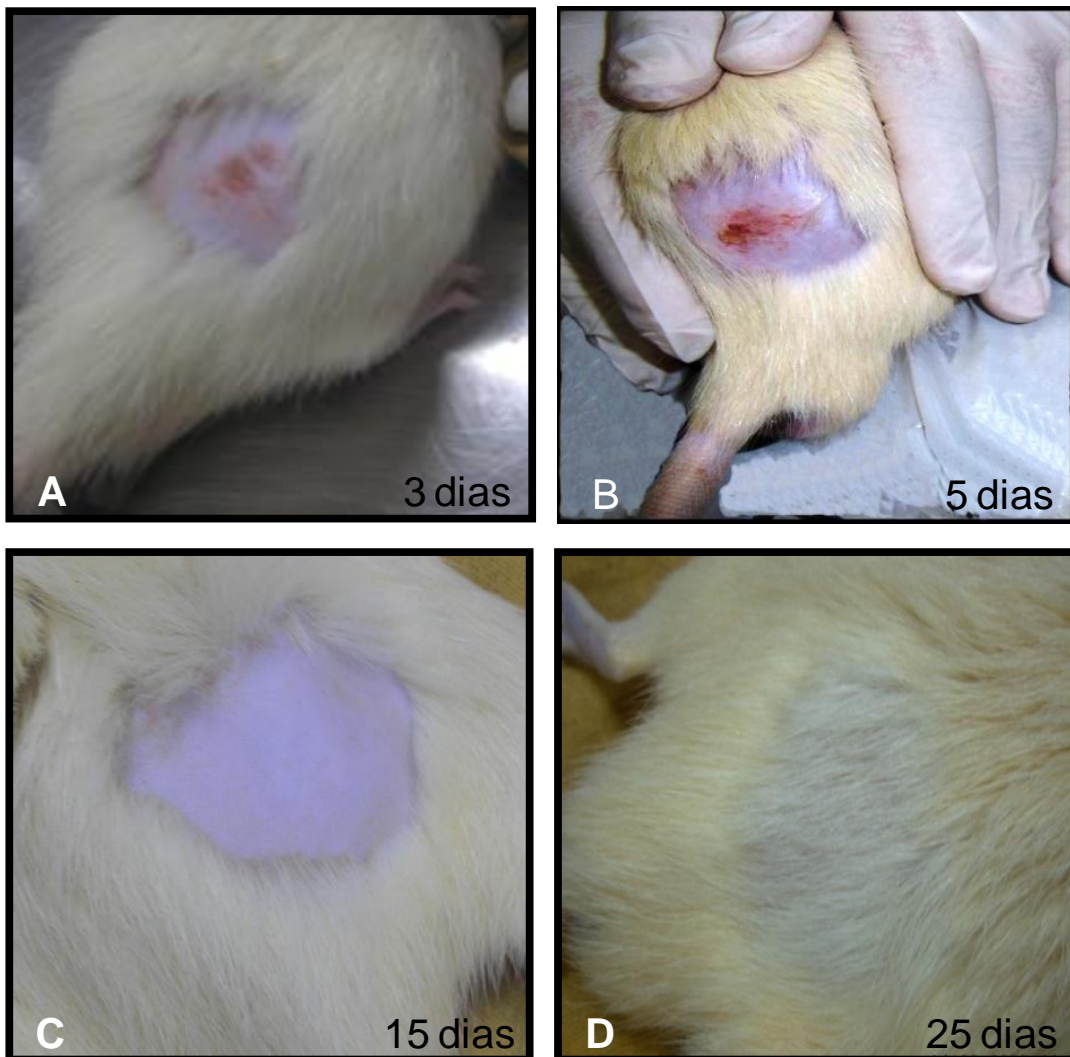


Figura 3: Lesões radioinduzidas em animais irradiados com dose de 10 Gy. A – 3 dias após irradiação; B – 5 dias; C – 15 dias e D – 25 dias

3.1.2 Grupo 40 Gy

Observou-se na pele dos animais o aparecimento inicial de eritema (figura 4 A) evoluindo para descamação seca (figura 4 B) e posteriormente descamação úmida com formação de exsudato inflamatório (figura 4 C). Pode-se visualizar também que as lesões geradas foram bem semelhantes às queimaduras (figura 4 D) que frequentemente aparecem em pacientes tratados com radioterapia e em acidentados. Houve uma evolução temporal da lesão até o 12º, após esse período visualizam-se as linhas de contração (figuras 4 E), indicando a cicatrização da lesão. Após 76 dias ocorreu a cicatrização das lesões (figura 4 F), porém sem o crescimento normal de pêlos no local irradiado. Seguindo os critérios do RTOG as lesões visualizadas foram de grau II e III.

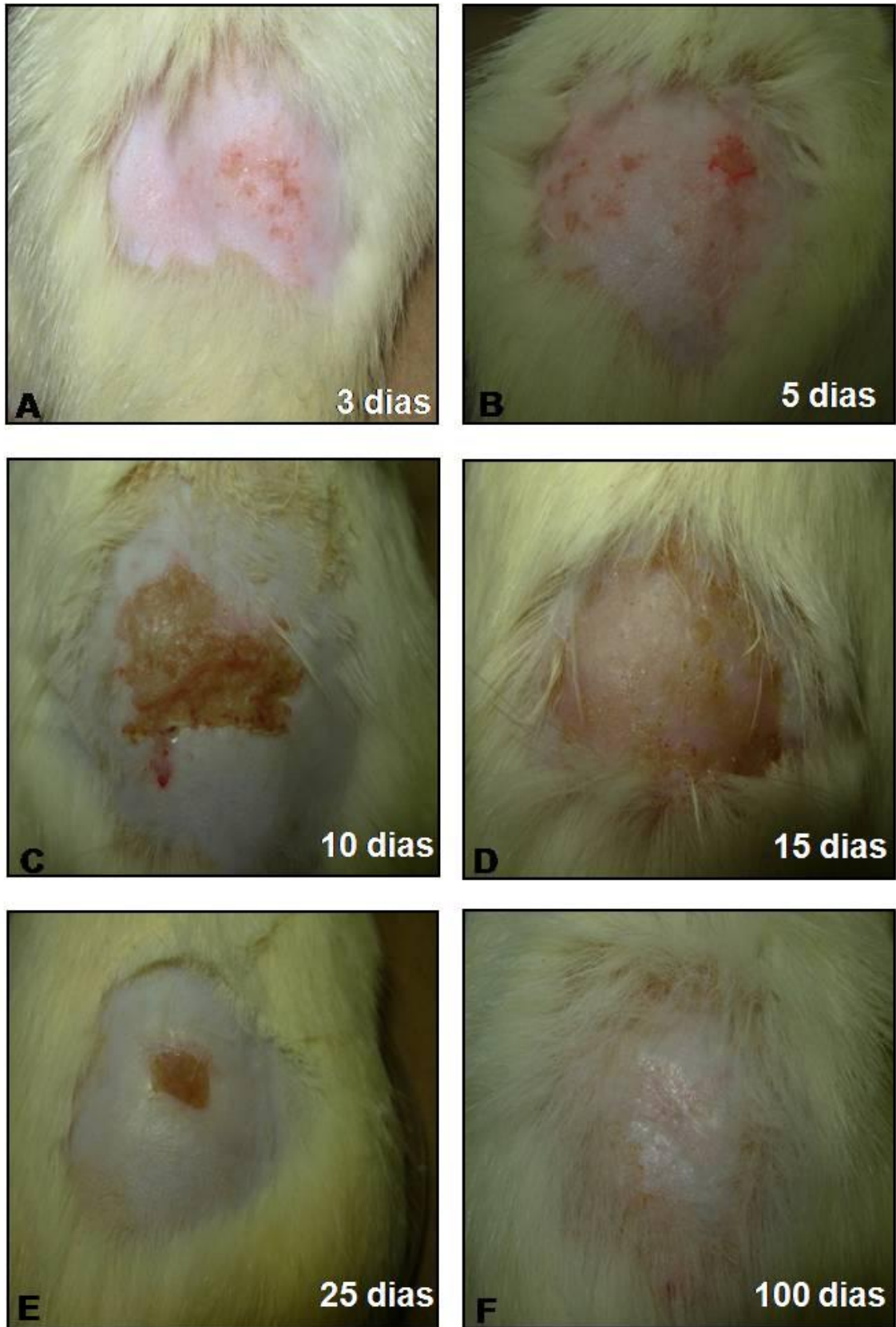


Figura 4: Lesões radioinduzidas em animais irradiados com dose de 40 Gy. A – 3 dias após irradiação; B – 5 dias; C – 10 dias, D – 15 dias; E – 25 dias e F – 100 dias

3.1.3 Grupo 60 Gy

Nesse grupo foi observado que as lesões foram bem mais agressivas, devido a alta dose cujo os animais foram submetidos. Visualizou-se que as lesões foram evoluindo em todo campo irradiado (figura 5 A), algumas com pontos de sangramento (figura 5 B), descamação úmida bem acentuada (figura 5 C e D), mesmo após 80 dias a pele de alguns animais não se encontravam cicatrizadas (figura F). Algumas das lesões visualizadas se assemelham a lesões ocasionadas em diversos acidentes radiológicos (figura 5 E), como se pode verificar na figura 5. Seguindo os critérios do RTOG as lesões visualizadas foram de grau III e IV.

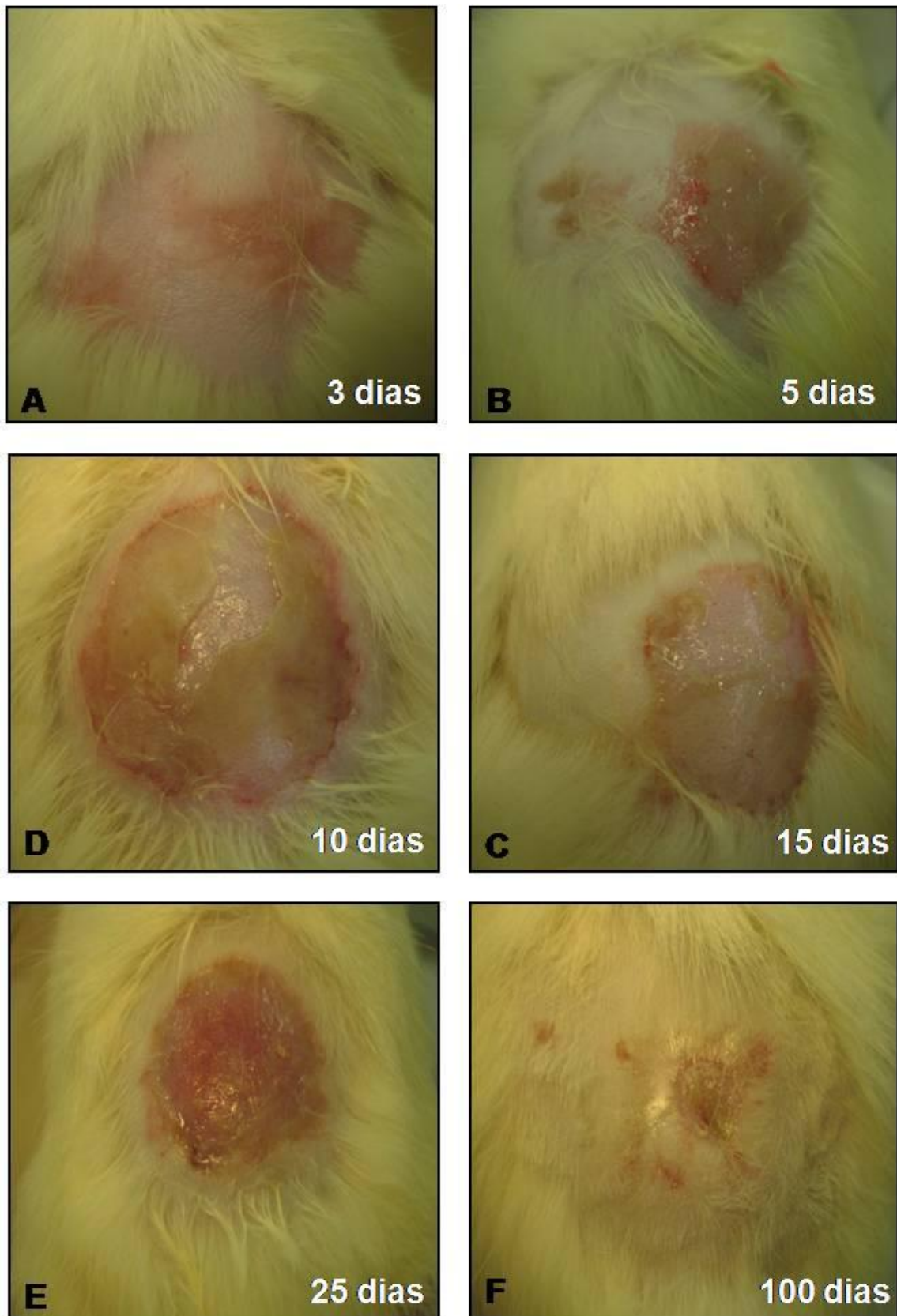


Figura 5: Lesões radioinduzidas em animais irradiados com dose de 60 Gy. A – 3 dias após irradiação; B – 5 dias; C – 10 dias, D – 15 dias; E – 25 dias e F – 100 dias

3.2 Avaliação da microscopia de luz

3.2.1 Resultados da técnica de histológica

3.2.1.1 Grupo 10 Gy

3.2.1.1.1 Coloração com Hematoxilina – Eosina

Após 10 dias (figura. 6. D) de irradiação não foi visualizado alteração significativa.

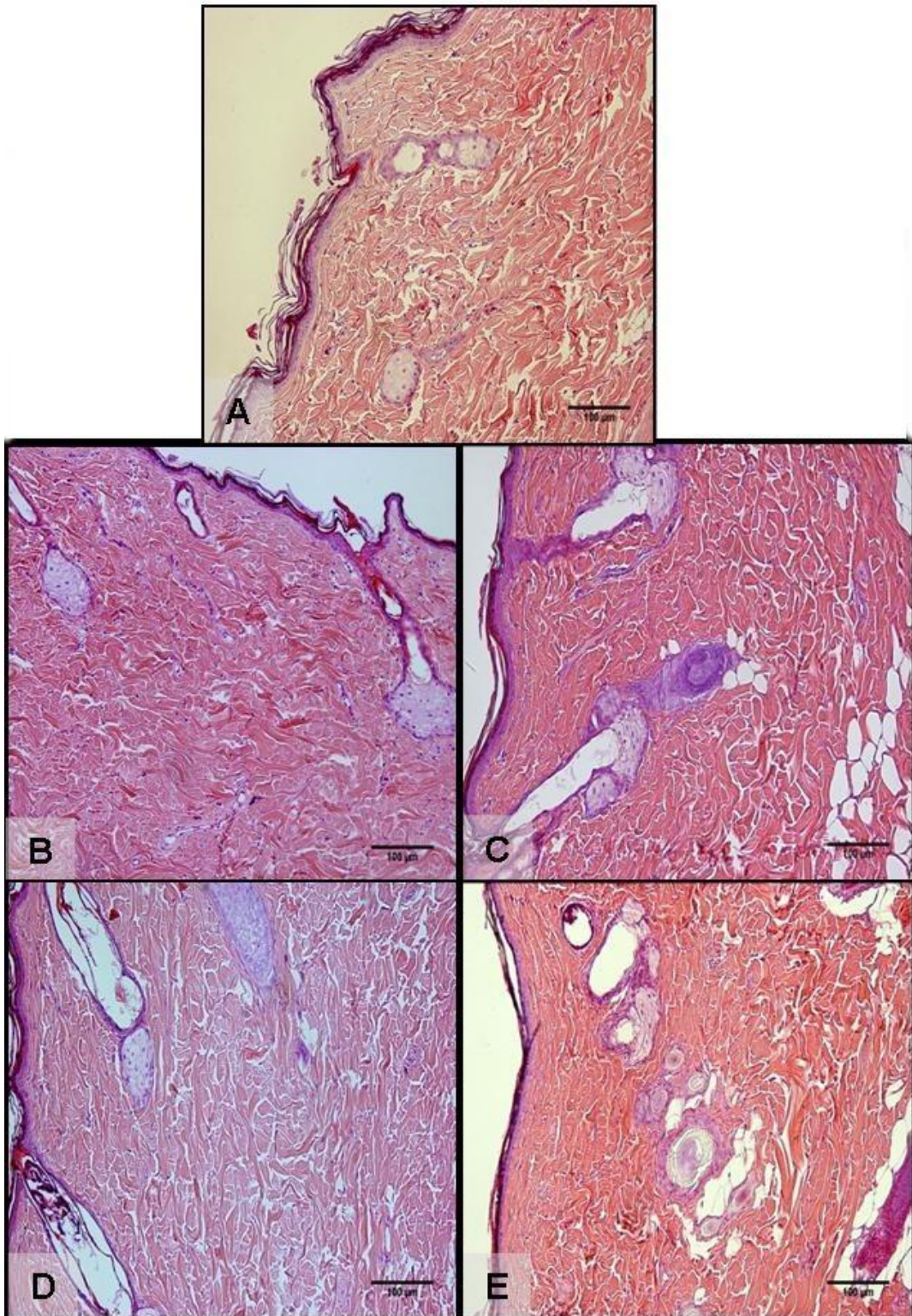


Figura 6: Fotomicrografias de cortes histológicos corados com HE, dos animais irradiados com 10 Gy. A- grupo controle; B - grupo 0 dias, C – grupo 5 dias; D – grupo 10 dias; E – grupo 25 dias. Barra = 100 µm.

3.2.1.1.2 Coloração com PicroSirius Red

Foi observada birrefringência amarelada nos grupos 5, 10 e 25 dias (figura 7 C, D e E, respectivamente). No grupo 5 dias foi observado o encurtamento de alguns feixes de fibras de colágeno na região da derme papilar. No grupo 10 dias observou-se o encurtamento nessa mesma região, além de algumas fibras estarem mais espessas, podendo indicar um aglomerado destas. No grupo 25 dias, foi observado um paralelismo das fibras em relação à epiderme.

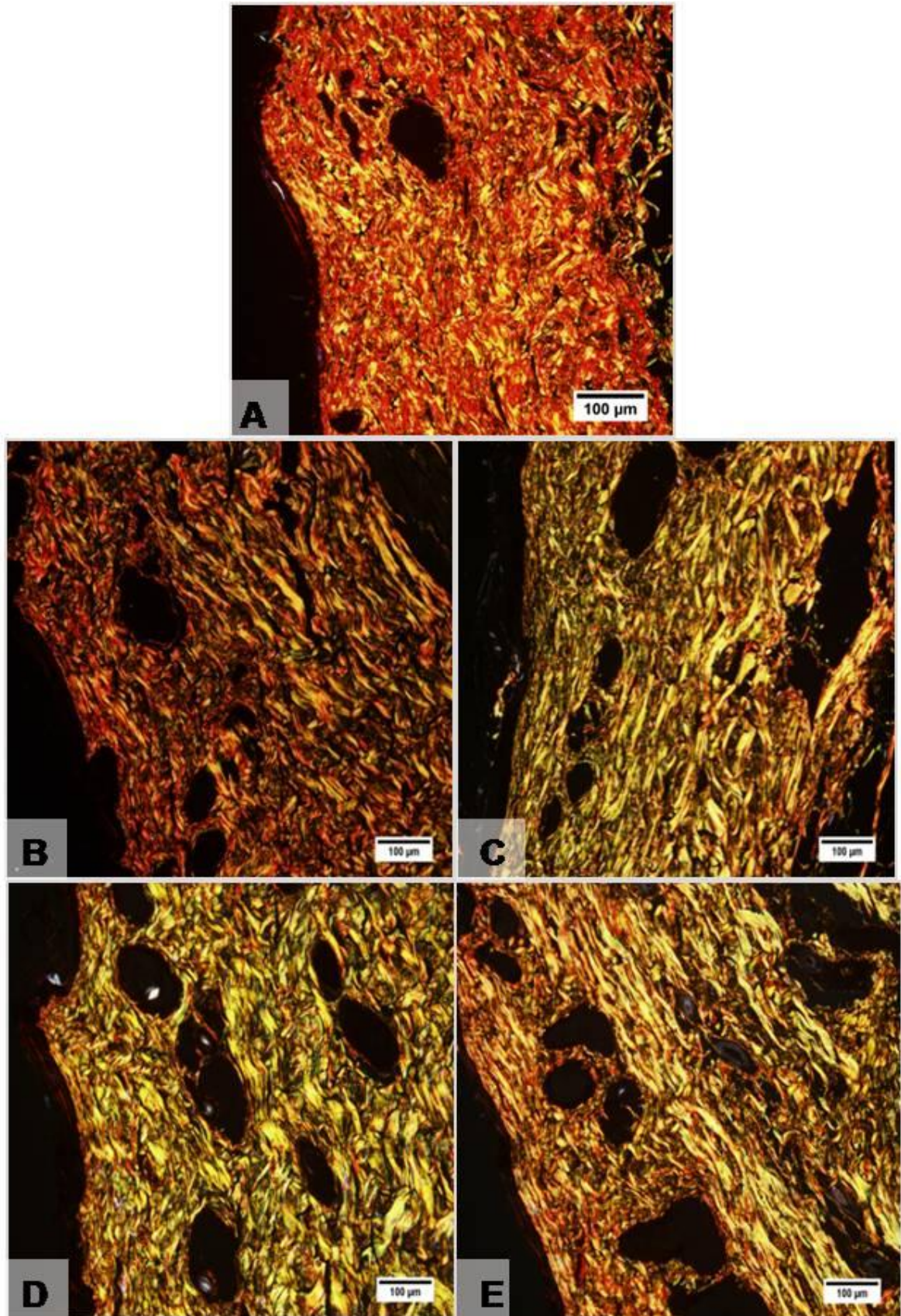


Figura 7: Fotomicrografias de cortes histológicos corados com picrosirius red, dos animais irradiados com 10 Gy. A- grupo controle; B - grupo 0 dias, C – grupo 5 dias; D – grupo 10 dias; E – grupo 25 dias. Barra = 100 μm

3.2.1.2 Grupo 40 Gy

3.2.1.2.1 Coloração com Hematoxilina – Eosina

Após 5 dias (figura 8 C) de irradiação foi visualizado um intenso infiltrado inflamatório composto por muitos polimorfonucleares (figura 9 A), demonstrando a fase aguda da inflamação; regiões de lesão, onde observou-se a crosta formada, além de regiões com pouca matriz extracelular, onde foram encontradas muitas células inflamatórias (figura 9 B); e outras regiões com adelgaçamento das fibras de colágeno. O infiltrado inflamatório persiste nos grupos 10 e 15 dias, no grupo 10 dias (figura 8 D) em regiões mais profundas da derme reticular se pode observar fibras colágenas mais espessas (figura 9 D), porém no grupo 15 dias (figura 8 E) foi visualizado um adelgaçamento dessas fibras (figura 9 C). No grupo 25 dias foi (figura 8 F) observado uma redução do infiltrado, regiões com fibras mais delgadas e outras com fibras mais espessas. Ocorreu a cicatrização da área lesionada com regiões de acantose (figura 9 E). No grupo 100 dias (figura 8 G) foi observado, na região mais profunda da derme reticular, fibras de colágeno delgadas em contraste com outras mais espessas, além de um tecido cicatrizado bem característico (figura 9 F), com regiões de acantose.

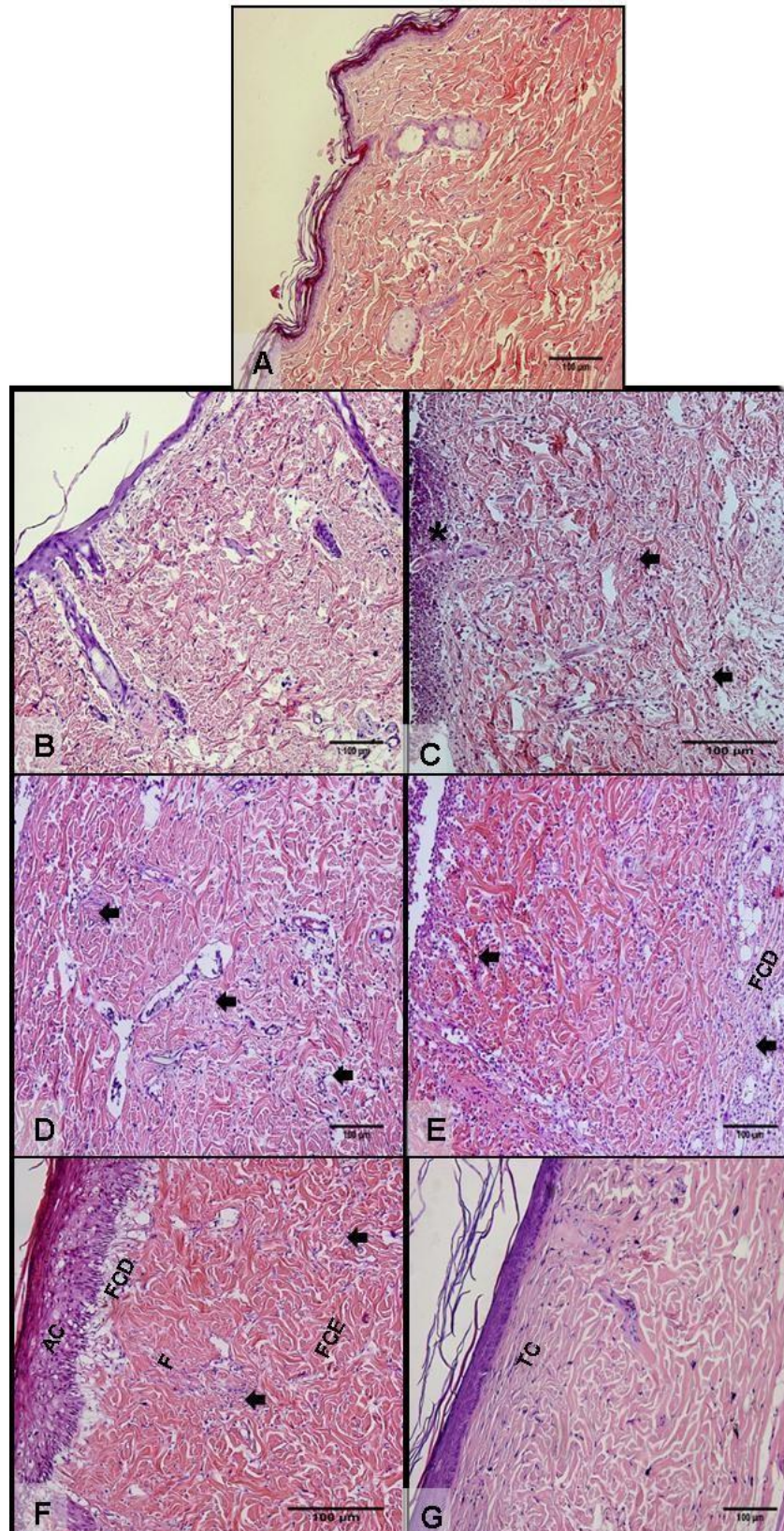


Figura 8: Fotomicrografias de cortes histológicos corados com HE, dos animais irradiados com 40 Gy. A- grupo controle; B - grupo 0 dias, C – grupo 5 dias; D – grupo 10 dias; E – grupo 15 dias; F – grupo 25 dias; G- grupo 100 dias. Asterisco – infiltrado de polimorfonucleares; FCD – fibras de colágeno delgadas; FCE – fibras de colágeno espessas; TC – tecido cicatrizado; F – fibrose; AC – acantose. Barra = 100 µm.

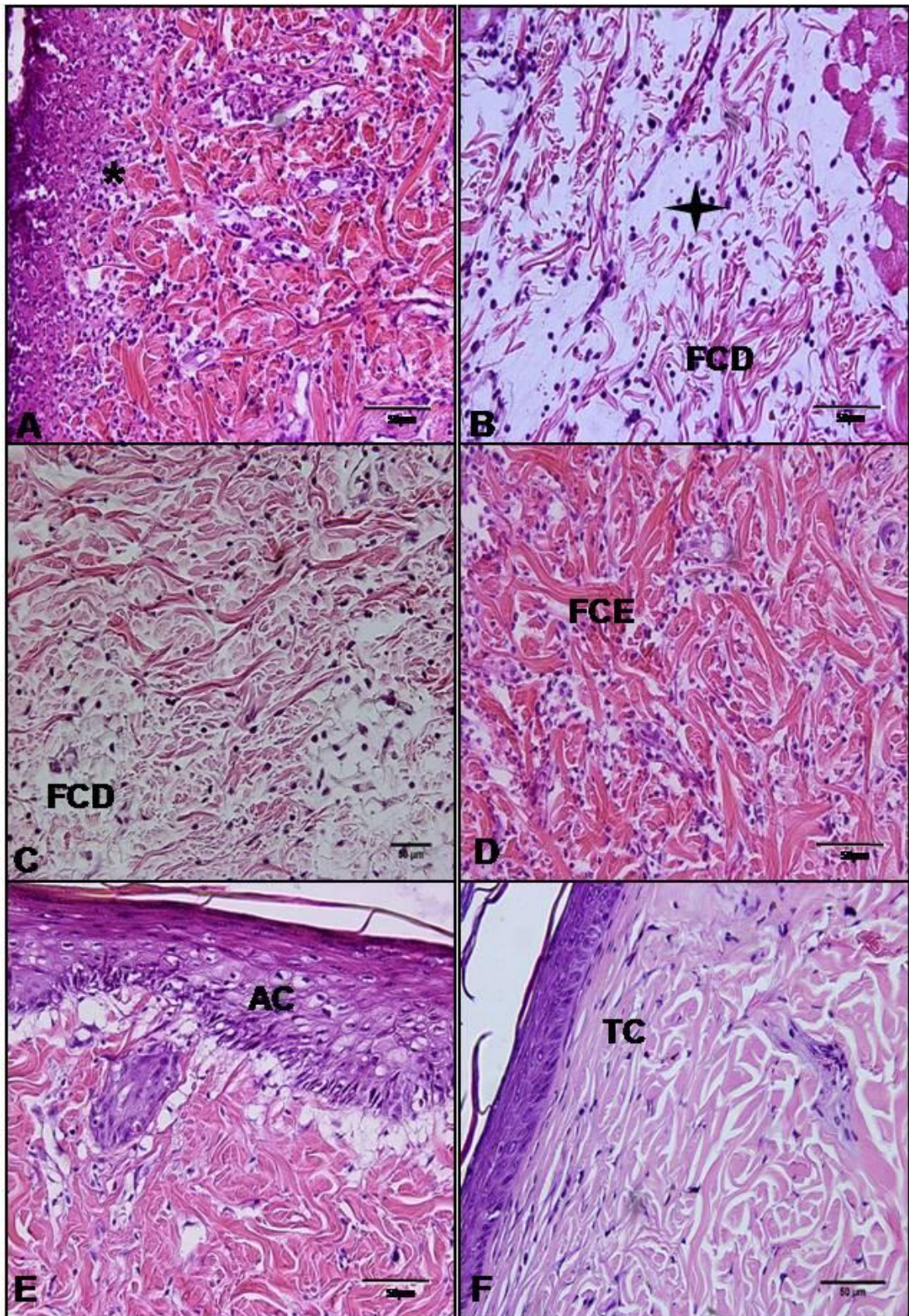


Figura 9: Fotomicrografias de cortes histológicos corados com HE, dos animais irradiados com 40 Gy. A- infiltrado inflamatório composto por polimorfonucleares (asterisco); B – região com escassez de matriz extracelular e com células inflamatórias (estrela), C – fibras de colágeno delgadas (FCD); D – fibras de colágeno espessas (FCE); E – acantose (AC); F – tecido cicatrizado (TC). Barra

3.2.1.2.2 Coloração com PicroSirius Red

Após a irradiação no grupo 0 dia (figura 10 B) foi observado colágeno com birrefringência vermelho, podendo ser indicativo de colágeno tipo 1, além da visualização do encurtamento significativo dessas fibras; o mesmo ocorrendo 5 dias (figura 10 C) após a irradiação. Nos grupos 10 e 15 dias (figura 10 D e E, respectivamente) foi observado na derme reticular profunda, colágeno com birrefringência para o amarelo e fibras mais alongadas, porém foi visualizado o encurtamento das fibras na região da derme reticular superficial. Nos grupos 25 e 100 dias (figura 10 F e G, respectivamente) verificou-se uma equivalência entre a birrefringência das fibras de colágeno e fibras encurtadas e alongadas.

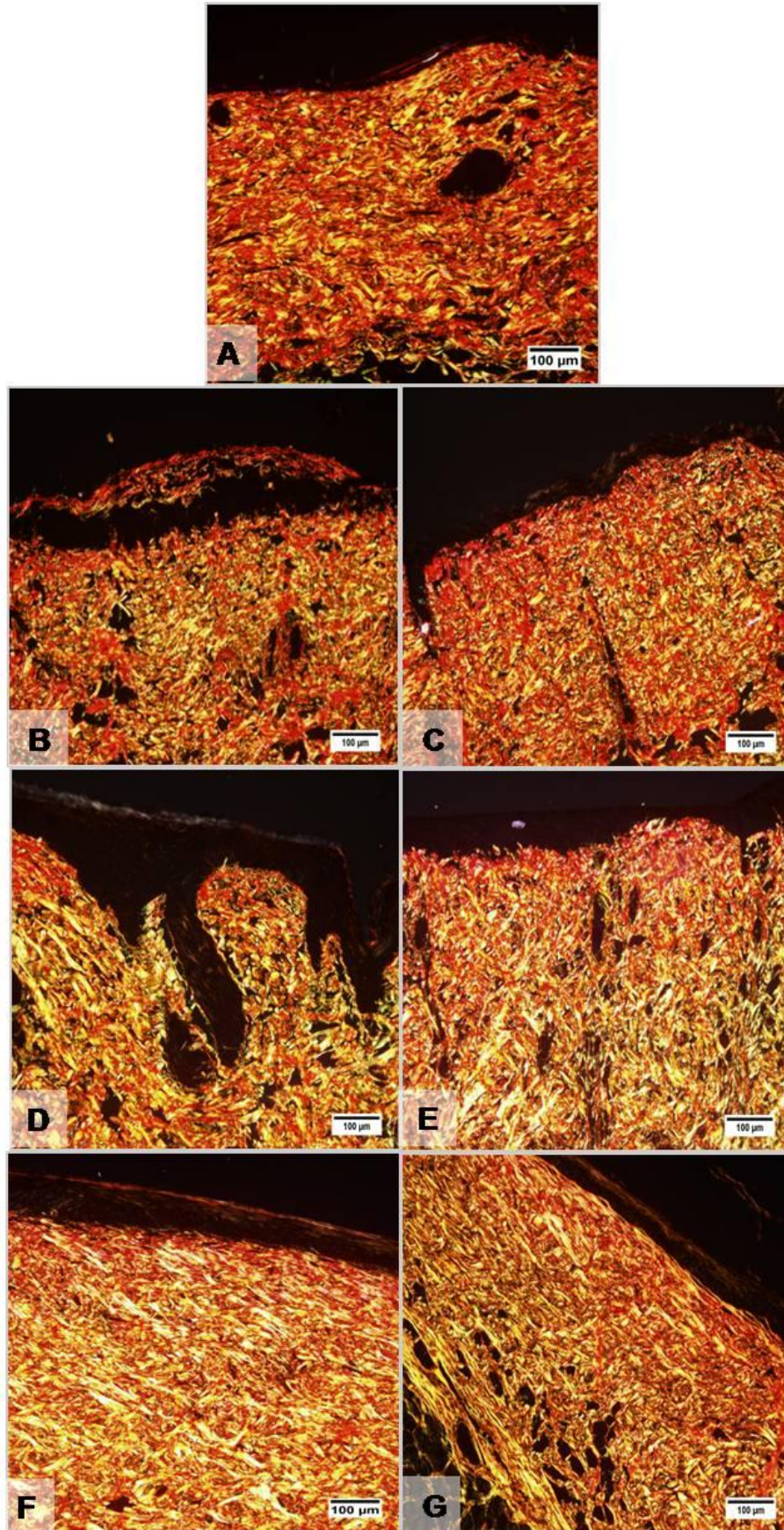


Figura 10: Fotomicrografias de cortes histológicos corados com picosirius red, dos animais irradiados com 40 GY. A- grupo controle; B - grupo 0 dias; C – grupo 5 dias; D – grupo 10 dias; E – grupo 15 dias; F – grupo 25 dias; G- grupo 100 dias. Barra = 100 µm

3.2.1.3 Grupo 60 Gy

3.2.1.3.1 Coloração com Hematoxilina – Eosina

No grupo 5 dias (figura 11 C) foi observado um infiltrado inflamatório com muitos polimorfonucleares (figura 12 A) mais concentrado na região da derme reticular mais próxima da derme papilar (que foi perdida na lesão) e uma crosta no local da lesão, observou-se formação de tecido de granulação, além de regiões com adelgaçamento das fibras (figura 12 B). No grupo 10 dias (figura 11 D) ainda observa-se tecido de granulação na área da lesão e o início de fibrose (figura 12 C) e células inflamatórias em toda derme reticular. Foram visualizadas fibras de colágeno delgadas e fibras mais espessas em diferentes regiões da derme reticular no grupo 15 dias (figura 11 E). Após 25 dias (figura 11 F) as fibras de colágeno encontravam-se espessas, a lesão ainda persistia porém nas regiões cicatrizadas houve o aparecimento de acantose. O infiltrado inflamatório ainda era expressivo em toda a derme reticular (figura 12 D e hipoderme). No grupo 100 dias (figura 11 G) observou-se regiões em toda a derme com adelgaçamento das fibras de colágeno, acantose em algumas regiões, discreto infiltrado inflamatório. Num dos animais irradiados com essa dose foi visualizado a completa alteração morfológica da pele, indicando a necrose daquele tecido (figura 12 E e F).

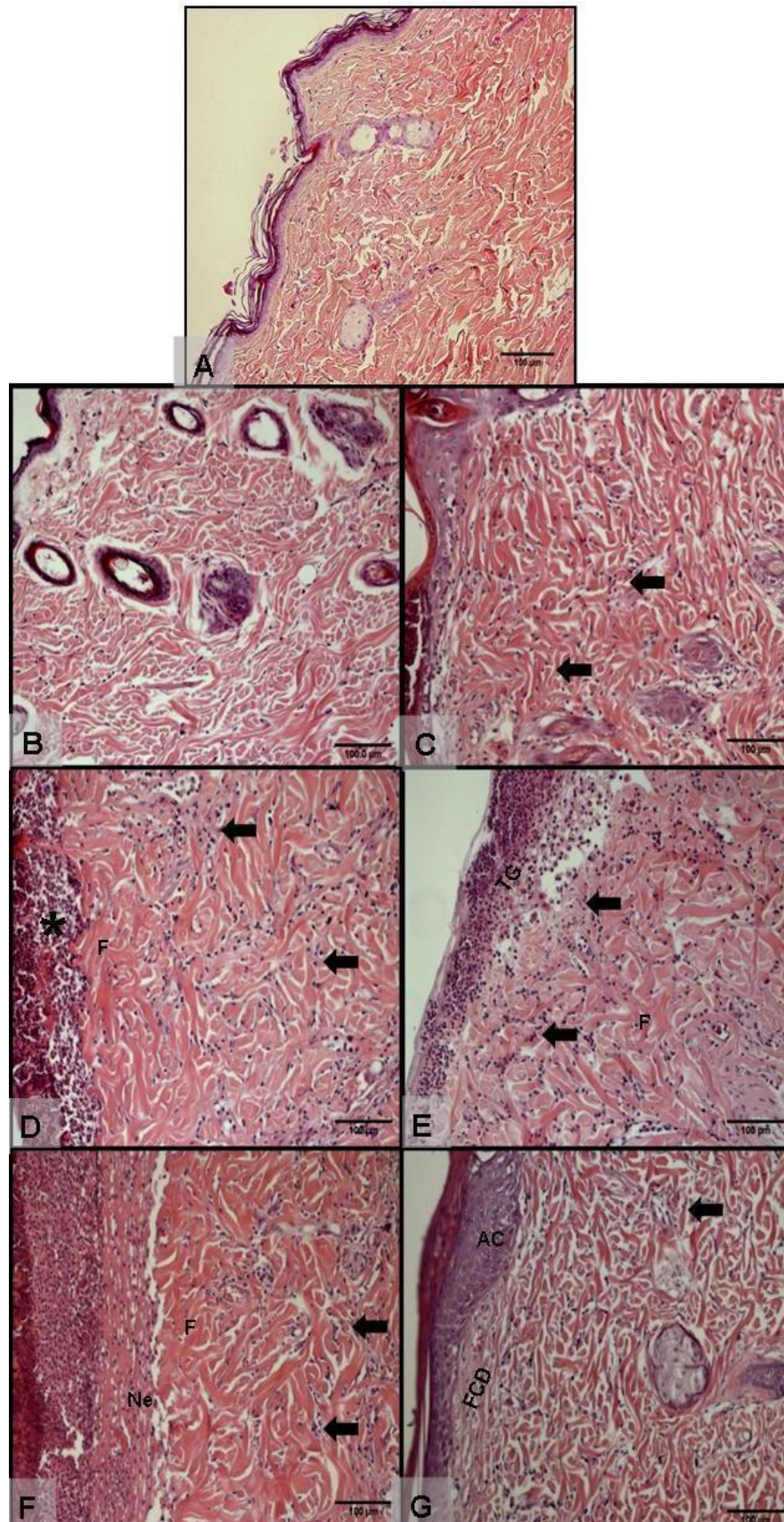


Figura 11: Fotomicrografias de cortes histológicos de pele dos animais irradiados com 60 GY corados com HE. A- grupo controle; B - grupo 0 dias, C – grupo 5 dias; D – grupo 10 dias; E – grupo 15 dias; F – grupo 25 dias; G- grupo 100 dias. FCD – fibras de colágeno delgadas; F – fibrose; AC – acantose; asterisco – infiltrado inflamatório. Barra = 100 μ m

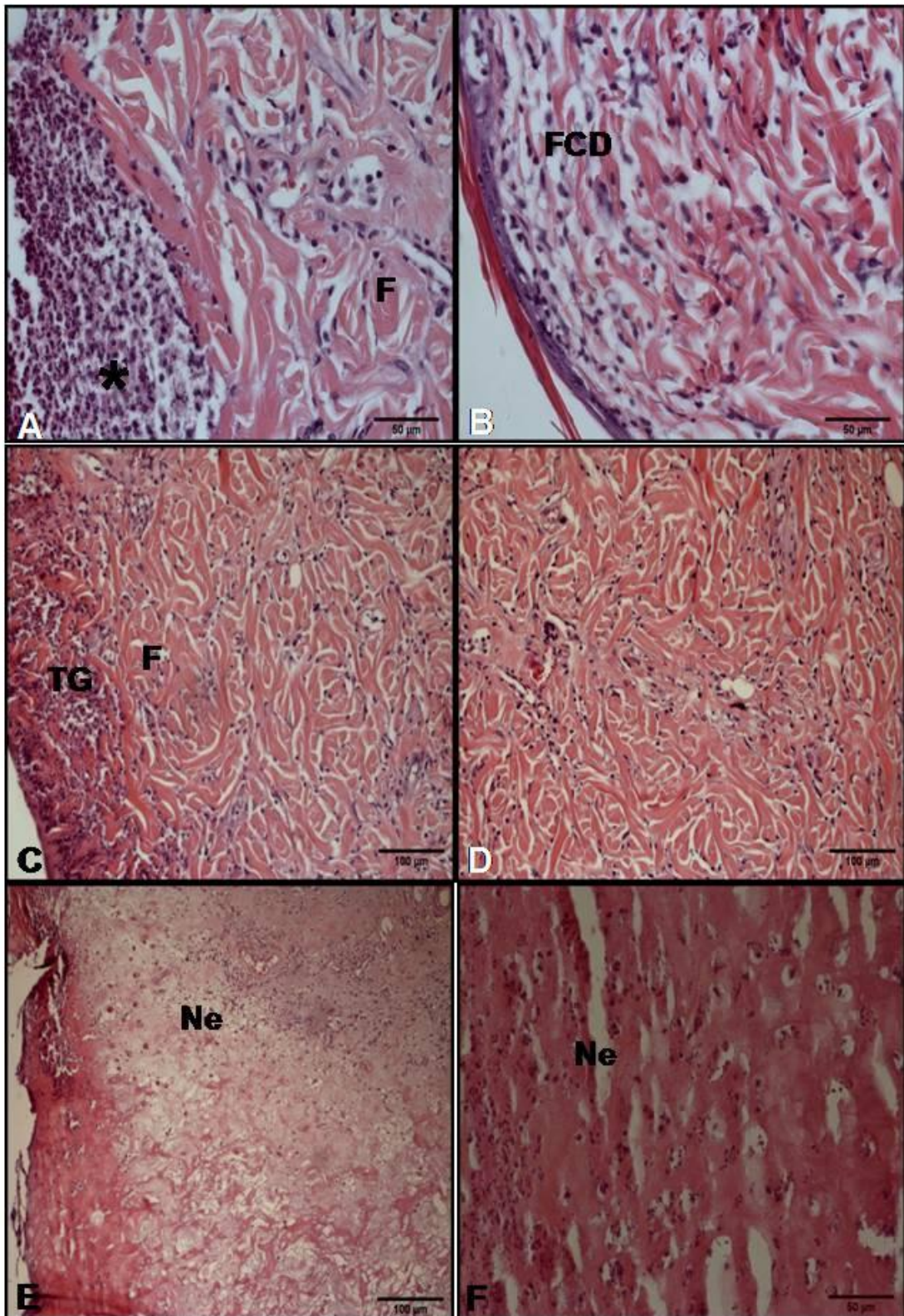


Figura 12: Fotomicrografia de cortes histológicos corados com HE, dos animais irradiados com 60 Gy. A- infiltrado inflamatório composto por polimorfonucleares (asterisco); B –fibras de colágeno delgadas (FCD); C- formação de tecido de granulação (TG); D – infiltrado inflamatório na derme reticular; E e F – necrose (Ne). Fotomicrografias A, B e F Barra = 50 μ m;Fotomicrografias C, D e E Barra = 100 μ m

3.2.1.3.2 Coloração com PicroSirius Red

No grupo 5 dias (figura 13 C) foi observado disposição perpendicular das fibras de colágeno na derme, além do seu encurtamento, em algumas regiões. Os grupos 10, 15 (figura 13 D e E, respectivamente) apresentam colágeno com birrefringência para vermelho, podendo ser indicativo de colágeno tipo 1 e foi visto o encurtamento significativo dessas fibras, sendo que isso ocorre em quase toda derme reticular. No grupo 25 dias (figura 13 F) o colágeno mostra uma birrefringência para o amarelo, o que pode indicar ser colágeno tipo 3, que se encontrava encurtado. Já em 100 dias (figura 13 G) após a irradiação, as fibras de colágeno encontravam-se paralelas a epiderme com a cor mais amarelada.

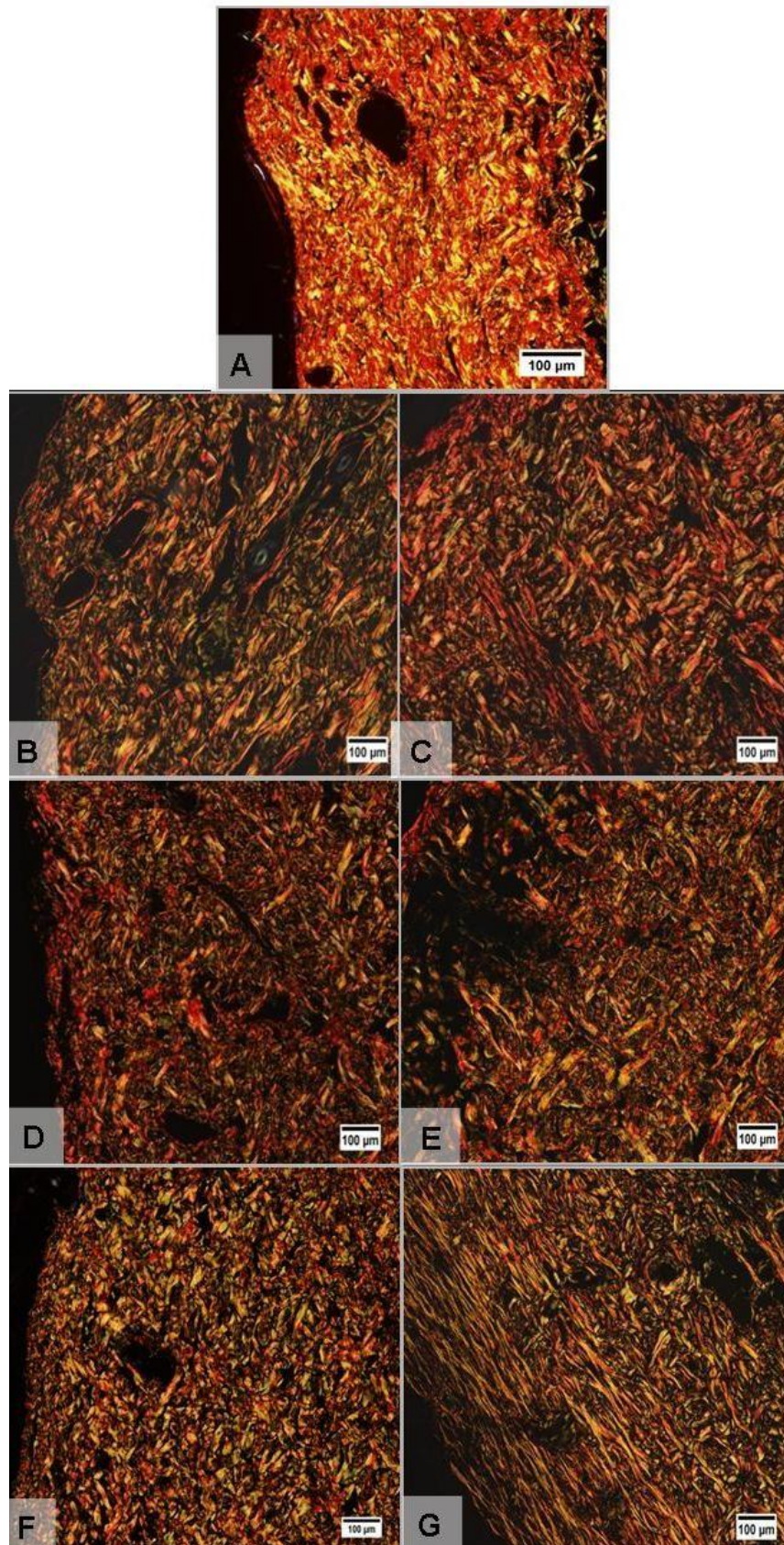


Figura 13: Fotomicrografias de cortes histológicos corados com picrosirius red, dos animais irradiados com 60 GY. A- grupo controle; B - grupo 0 dias, C – grupo 5 dias; D – grupo 10 dias; E – grupo 15 dias; F – grupo 25 dias; G- grupo 100 dias. Barra = 100 µm

3.2.2 Resultados da técnica de imunohistoquímica

3.2.2.1 Grupo 10 Gy – Anti-TGF-beta

No grupo 5 dias (figura 14 D) foi observado uma discreta expressão dispersa pela derme reticular com pontos de maior expressão; no grupo 10 dias (figura 14 E) a expressão da citocina foi mais intensa tanto na derme papilar quanto na reticular. Não foi visualizada expressão no grupo 25 dias (figura 14 F).

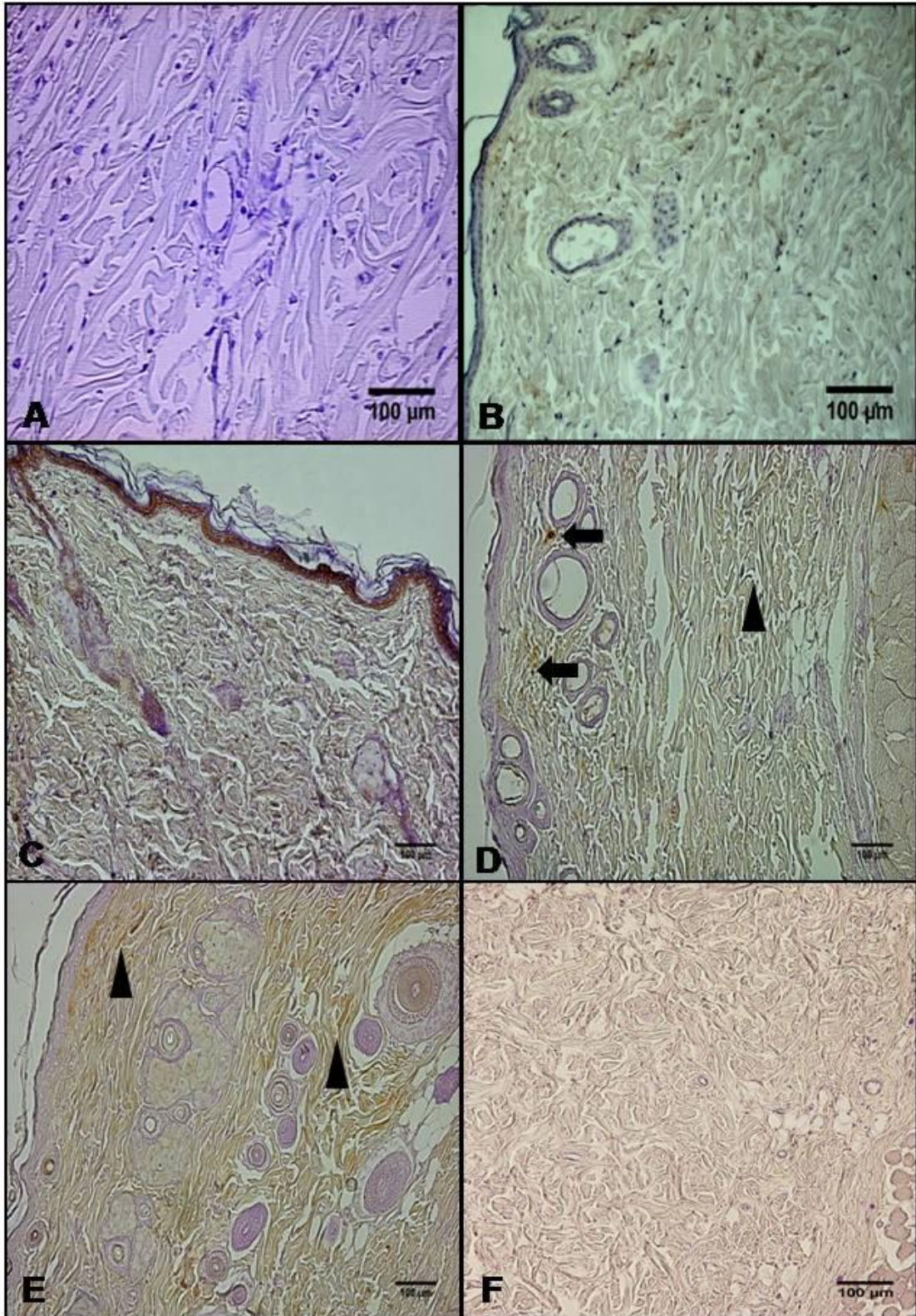


Figura 14: Fotomicrografias de cortes histológicos imunomarcados com anticorpo anti-TGF-beta1, dos animais irradiados com 10 GY. A- controle negativo; B - grupo controle, C - grupo 0 dia; D - grupo 5 dias; E - grupo 10 dias; F - grupo 25 dias. As setas e cabeças de setas indicam a expressão do TGF-beta1. Barra = 100 µm

3.2.2.2 Grupo 40 Gy – Anti-TGF-beta

O início da expressão da citocina ocorreu horas após a irradiação visualizado no grupo 0 dia (figura 15 C), houve um aumento dessa expressão nos dias 5, 10, 15 e 25 (figura 15 D, E, F e G respectivamente), com posterior decréscimo no grupo 100 dias (figura 15 H). No grupo 5 dias a expressão foi mais visível em algumas regiões e dispersa pela derme reticular (figura 16 A); nos grupos 10 e 15 dias a expressão foi mais significativa na derme reticular, logo abaixo da área lesionada (figura 16 B), onde é possível observar algumas células sintetizando essa citocina (figura 16 C). No grupo 25 dias, foi observado a expressão dessa citocina nas células da epiderme (figura 16 D) e em algumas regiões da derme. Após 100 dias de irradiação a expressão foi equiparada com a do controle (figura 15 B).

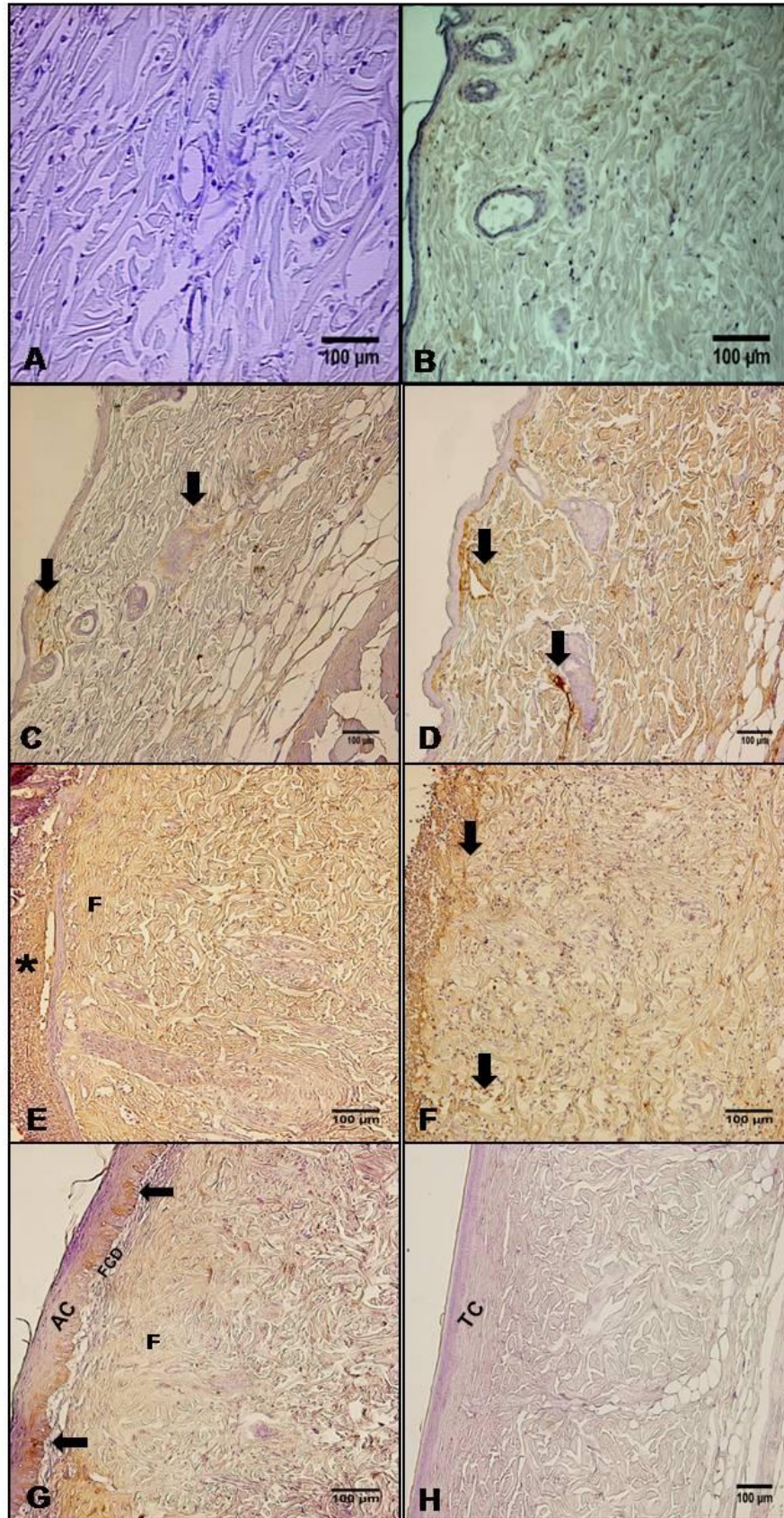


Figura 15: Fotomicrografias de cortes histológicos imunomarcados com anticorpo anti-TGF-beta1, dos animais irradiados com 40 GY. A- controle negativo; B - grupo controle, C - grupo 0 dia; D - grupo 5 dias; E - grupo 10 dias; F - grupo 15 dias; G - grupo 25 dias; H - grupo 100 dias. As setas indicam a expressão do TGF-beta1, Ac- acantose, TC - tecido cicatrizado, F - fibrose, FCD - fibras de colágeno delgadas. Barra = 100 μm

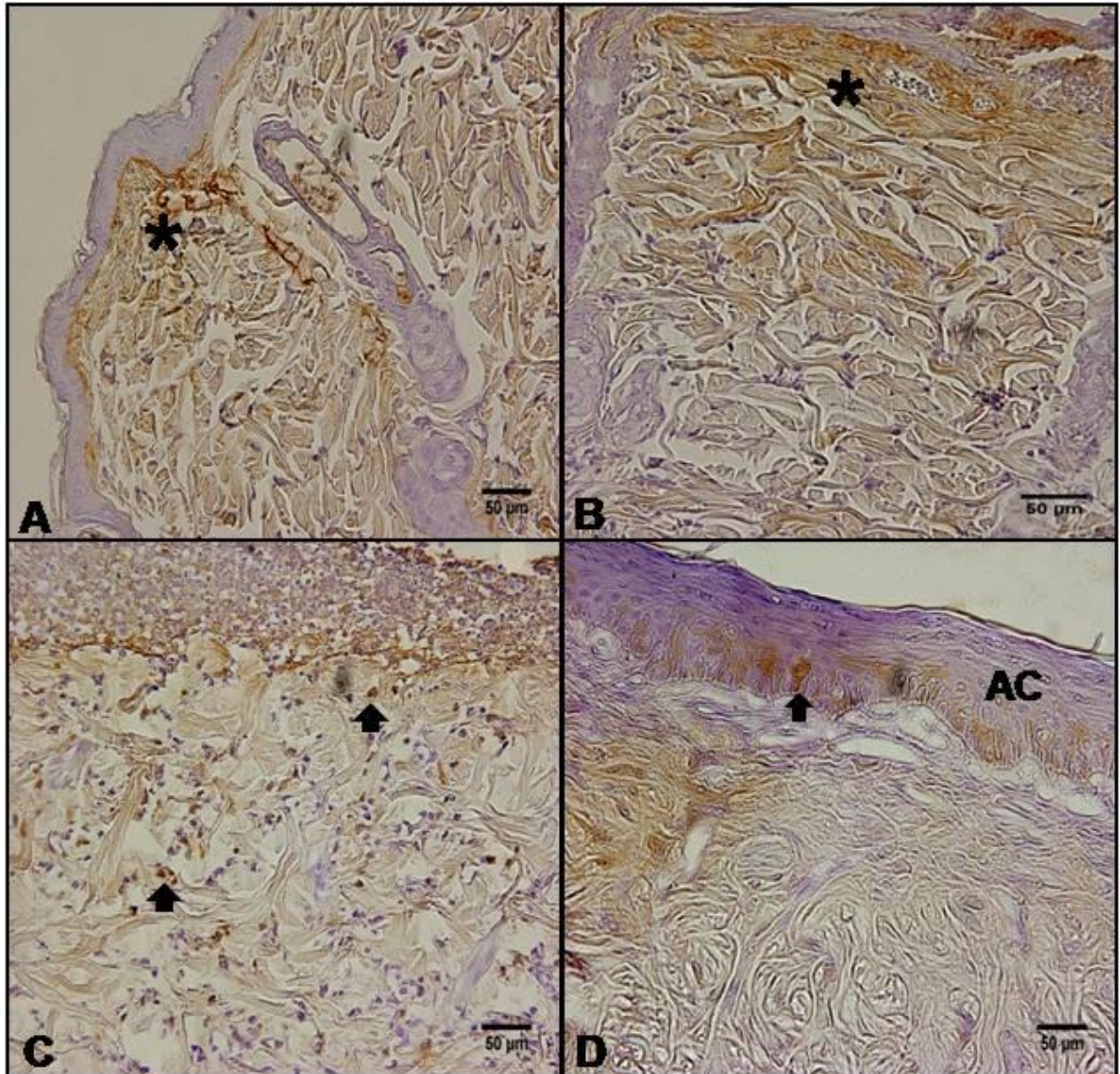


Figura 16: Fotomicrografias de cortes histológicos imunomarcados com anticorpo anti-TGF-beta1, dos animais irradiados com 40 GY. A- grupo 5 dias, expressão da citocina (asterisco); B - grupo 10 dias, expressão logo abaixo da área lesionada (asterístico), C – grupo 15 dias, as setas indicam algumas células expressando a citocina TGF-beta1; D – grupo 25 dias a seta mostra células da epiderme sintetizando TGF-beta1 e acantose (AC). Barra = 50 µm

3.2.2.3 Grupo 60 Gy – Anti-TGF-beta

Foi observado o início da expressão da citocina TGF-beta, 5 dias (figura 17 D) após a irradiação, a qual mostrou-se intensificada nos grupos 10, 15 e 25 dias (figura 17 E, F e G, respectivamente). Essa expressão foi difusa pela derme reticular, porém visualizou-se uma maior expressão em algumas áreas da derme papilar (figura 18 A) ou logo abaixo da área lesionada (figura 18 B), e no tecido de granulação (figura 18 C). Na hipoderme, também se pode visualizar sua expressão. É possível visualizar a expressão desta citocina por algumas células (figura 18 D). Observou-se marcação logo abaixo da epiderme hipertrofiada (acantose) (figura 18 E) e em regiões com necrose (figura 18 F)

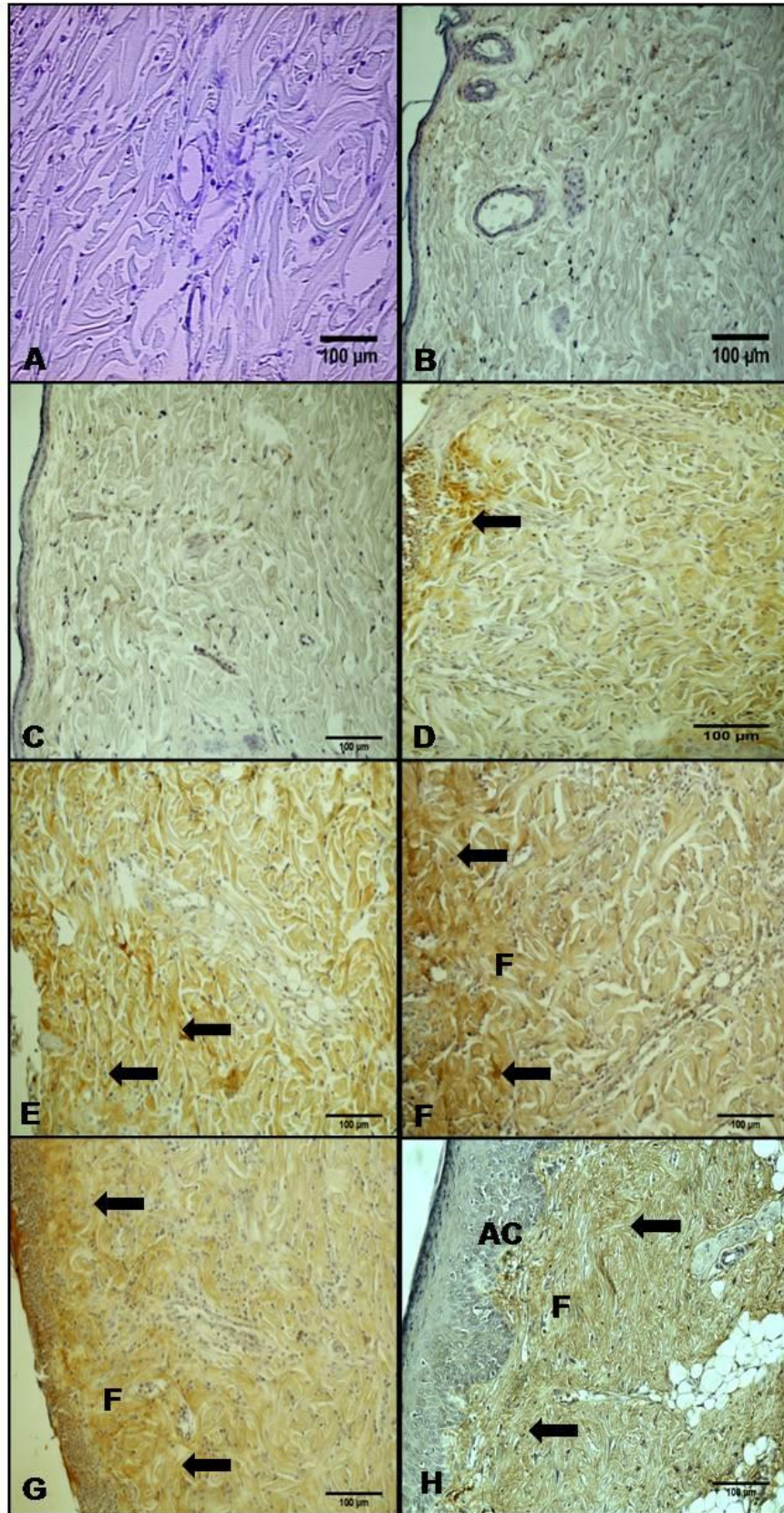


Figura 17: Fotomicrografias de cortes histológicos imunomarcados com anticorpo anti-TGF-beta1, dos animais irradiados com 60 GY. A- controle negativo; B - grupo controle, C - grupo 0 dia; D - grupo 5 dias; E - grupo 10 dias; F - grupo 15 dias; G - grupo 25 dias; H - grupo 100 dias. As setas indicam a expressão do TGF-beta1, Ac- acantose, F - fibrose. Barra = 100 µm

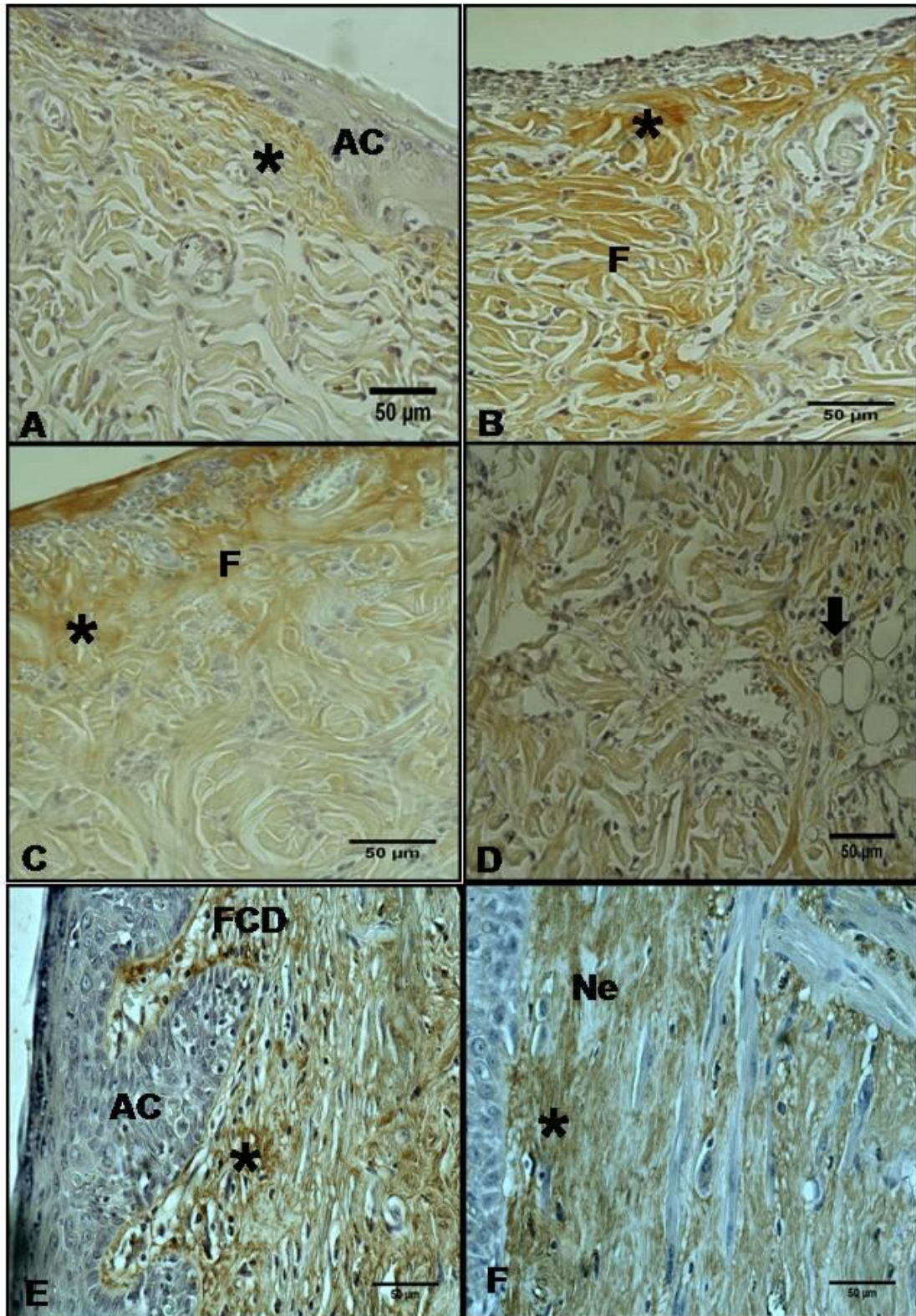


Figura 18: Fotomicrografia de cortes histológicos imunomarcados com anticorpo anti-TGF-beta1, dos animais irradiados com 60 GY. A e B- grupo 5 dias, expressão da citocina (asterisco), regiões com fibrose (F) e acantose (AC) na região cicatrizada; C – grupo 25 dias expressão da citocina (asterisco), regiões com fibrose (F) , D – grupo 25 dias algumas células expressando a citocina TGF-beta1; E e F – grupo 100 dias, regiões com acantose (AC), fibras de colágeno delgadas (FCD) e necrose (Ne). Barra = 50 µm

3.3 Avaliação da microscopia eletrônica de varredura

3.3.1 Grupo 10 Gy

Visualiza-se um adelgaçamento das fibras de colágeno logo abaixo da lesão. As fibras de colágeno possuem suas características morfológicas integras nos grupos 10 e 25 dias (figura 19 B, C e D).

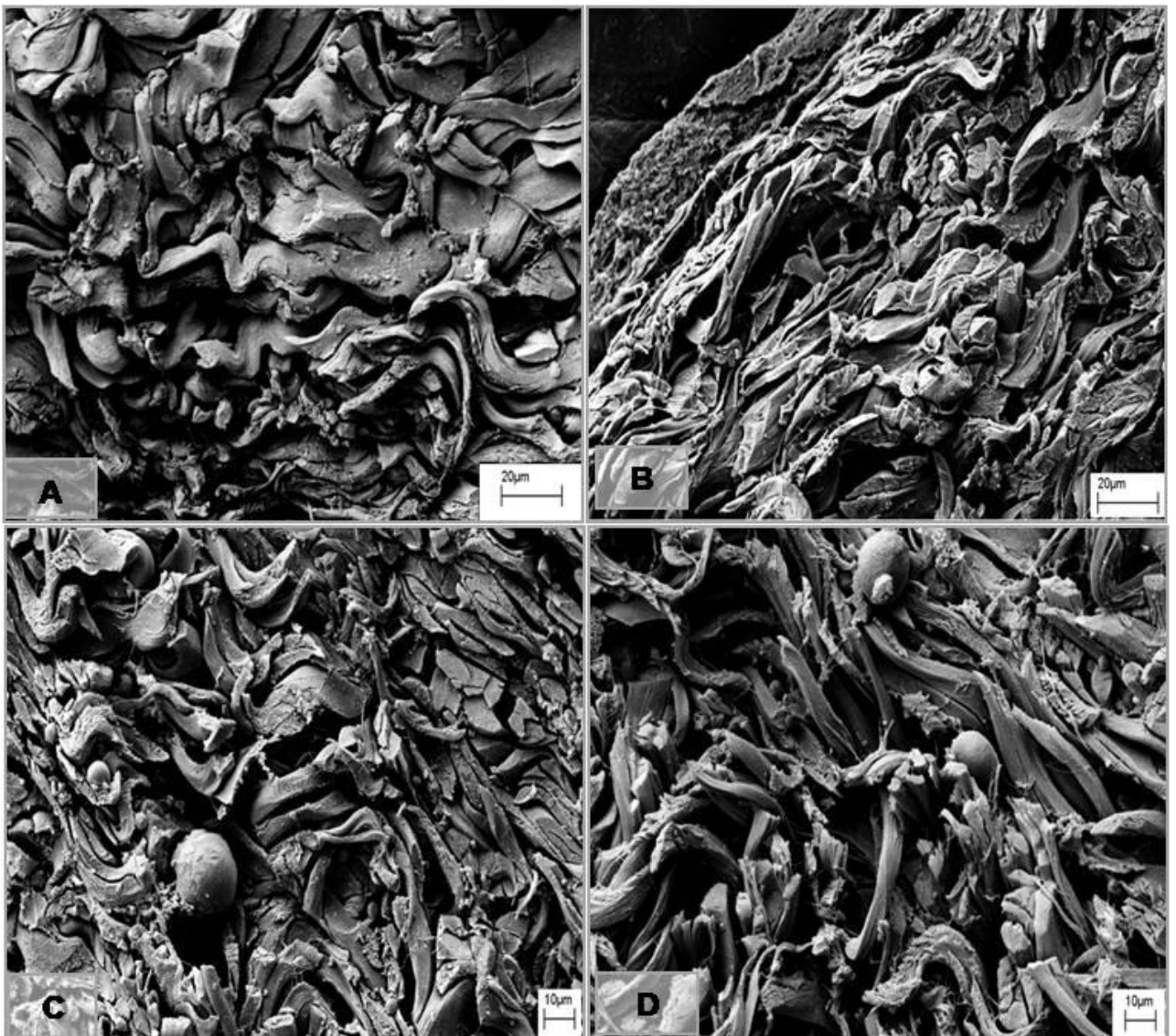


Figura 19: Micrografias eletrônicas de varredura dos animais irradiados com 10 Gy. A – grupo controle onde é possível visualizar o aspecto morfológico característico das fibras de colágeno; B – grupo 5 dias visualiza-se fibras de colágeno delgadas (FCD); C – grupo 10 dias aspecto geral do tecido; D – grupo 25 dias tecido com aspecto característico.

3.3.2 Grupo 40 Gy

As fibras de colágeno não possuem mais suas características morfológicas (figura 20 B). No grupo 10 dias foi observado o adelgaçamento de algumas fibras de colágeno (figura 20 C). No grupo 25 dias foi observado um adelgaçamento das fibras de colágeno (figura 20 D).



Figura 20: Micrografias eletrônicas de varredura dos animais irradiados com 40 Gy. A – grupo controle onde é possível visualizar o aspecto morfológico característico das fibras de colágeno; B – grupo 5 dias visualiza-se fibras de colágeno sem seu aspecto morfológico característico; C – grupo 10 dias observa-se o adelgaçamento das fibras de colágeno; D – grupo 25 dias visualiza-se fibras de colágeno delgadas.

3.3.3 Grupo 60 Gy

No grupo 5 dias foi visualizado as fibras de colágeno com suas características morfológicas normais (figura 21 B). No grupo 10 dias as fibras de colágeno não apresentam sua morfologia característica (em forma de feixes) (figura 21 C). 25 dias após a irradiação observa-se infiltrado inflamatório da epiderme (figura 21 D) além de uma matriz extracelular com as fibras de colágeno morfológicamente alteradas, sem o aspecto de feixes (figura 21 D).

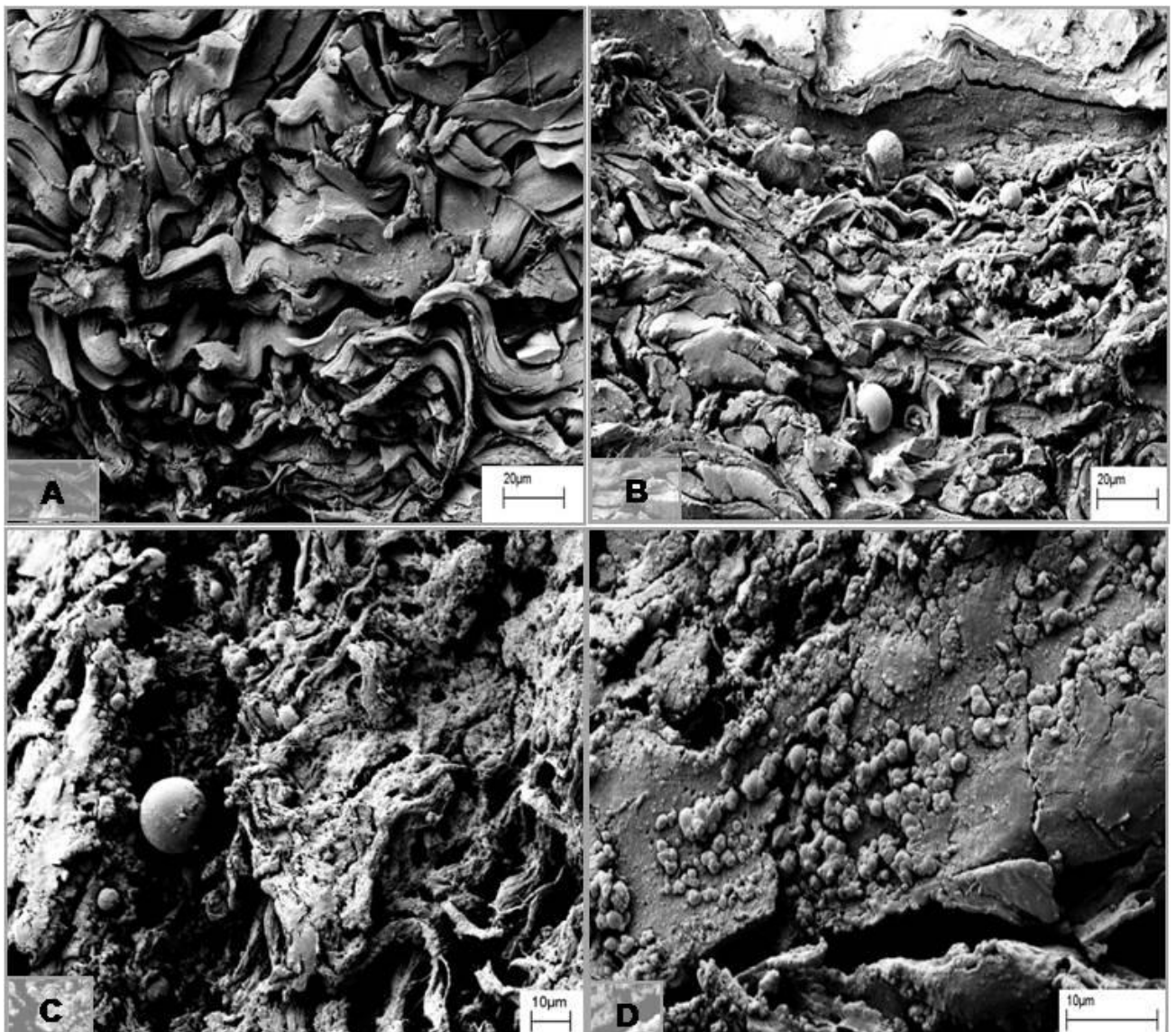


Figura 21: Micrografias eletrônicas de varredura dos animais irradiados com 60 Gy. A – grupo controle onde é possível visualizar o aspecto morfológico característico das fibras de colágeno; B – grupo 5 dias aspecto geral do tecido, C – grupo 10 dias aspecto geral do tecido, não visualiza-se o aspecto de feixes das fibras de colágeno; D – grupo 25 dias observa-se uma matriz extracelular com as fibras de colágeno alteradas e infiltrado inflamatório.

4 DISCUSSÃO

A radioterapia tem sido utilizada como parte do tratamento oncológico, concomitante ou não com outras técnicas terapêuticas, e tem melhorado o prognóstico de várias doenças neoplásicas, reduzindo a chance de recidivas (Boema et al, 2005). Devido ao aumento da sobrevivência dos pacientes, diversos efeitos colaterais vêm sendo relatados provenientes dessa prática. Dentre os efeitos colaterais podem ocorrer complicações na pele, que podem aparecer horas após a irradiação (Boema et al, 2004; Boema et al, 2005; Charniot et al, 2006).

Apesar de todos os cuidados em radioproteção, que vem sendo tomados pelos governos dos diversos países e fiscalizados por vários órgãos internacionais, tais como a Agência Internacional de Energia Nuclear, a crescente utilização de fontes radioativas nas áreas industriais e médicas fazem com que o risco de um acidente radiológico ainda seja elevado, colocando em risco a saúde e até mesmo a vida de muitas pessoas, pois geralmente as doses recebidas são elevadas podendo ocasionar a síndrome cutânea da radiação (IAEA).

Há algumas décadas a pele não era um órgão de interesse para estudo, porém essa visão vem sendo alterada ao longo dos anos, devido à observação de alguns autores de que a pele é um órgão fundamental, uma vez que é uma barreira contra agentes patológicos de diversas origens, tais como bactérias, fungos, radiação ionizante entre outros. Desta forma torna-se de suma importância estudos mais aprofundados sobre esse órgão, para a melhor compreensão dos mecanismos envolvidos em seu reparo. Caso ocorra um reparo inadequado ou se a homeostase for afetada, o organismo como um todo pode sofrer conseqüências prejudiciais (Valverde, 2003; Brasileiro et al, 2004).

O presente estudo teve como objetivo acompanhar, *in vivo* as possíveis alterações na pele, originadas da exposição à radiação ionizante. Para tanto, foram utilizados, como modelos, ratos Wistar, expostos a diferentes doses (10, 40 e 60 Gy).

As alterações induzidas pela radiação na pele vêm sendo associadas a mudanças, na disposição e na concentração do colágeno, o maior componente da matriz extracelular. A citocina TGF-beta1 foi objeto de estudo juntamente com o colágeno, devido ao fato da literatura sugerir que essa citocina seja uma das responsáveis pelo aumento da produção de matriz extracelular por vários tipos celulares (tais quais fibroblastos, macrófagos, células endoteliais, queratinócitos, entre outros) em tecidos lesionados. A citocina TGF-beta1 também age na regulação de metaloproteases, afetando com isso o processo de degradação da matriz. A intensa expressão desta citocina na pele irradiada pode desencadear o processo de

fibrose e, conseqüentemente, afetar a homeostase deste órgão devido ao acúmulo de matriz. (Oishi et al, 2002; Flanders et al, 2002; Flanders et al, 2003; Xiao et al, 2006; Verrecchia e Mauviel, 2007; Muller et al, 2007;). Entre outras funções do TGF-beta1 pode-se citar seu papel na regulação da inflamação fisiológica e patológica e na fibrose.

Seguindo os critérios do RTOG os animais irradiados com 10 Gy foi visualizado lesões de grau I e II, na dose de 40 Gy o grau das lesões foram II e III e os animais irradiados com 60 Gy foi visualizado lesões de grau III e IV (Cox et al, 1995).

Segundo Flanders e colaboradores, (2003) estudos em roedores mostraram que cinco semanas após a irradiação a pele de alguns animais encontrava-se com ulceração na epiderme, inflamação cutânea grave, corroborando com os resultados encontrados neste trabalho, mostrando que as lesões iniciais radioinduzidas caracterizam-se por eritema, descamação seca e úmida, e ulceração resultante da infiltração de células inflamatórias. É possível observar hipertrofia (acantose) na epiderme irradiada. Outro resultado encontrado é a deposição de matriz fibrosa anormal tanto em quantidade e qualidade. Essas seqüelas fibróticas são uma complicação indesejada na radioterapia e nos acidentes, gerando um impacto na qualidade de vida dos pacientes (Flanders et al, 2002; Flanders et al, 2003).

Tem sido relatado que a exposição a radiações ionizantes aumenta a produção do TGF-beta1 dentro de várias horas após a irradiação persistindo por meses. A radiação induz uma cascata permanente de citocinas inflamatórias e fibrogênicas que levam a fibrose. Os dados obtidos no presente trabalho através da imunomarcagem para expressão do TGF-beta1 demonstram um quadro progressivo o que é corroborado com resultados encontrados na literatura (Flanders et al, 2002; Flanders et al, 2003; Xiao et al, 2006; Muller et al, 2007) mostrando o recrutamento de mais células inflamatórias para o local da injúria e com isso manutenção por um longo período dos níveis de TGF-beta1 na pele irradiada. A manutenção desses níveis é dose dependente, o que ficou evidente nos resultados obtidos nesse trabalho. Os níveis elevados de TGF-beta1 sugerem o acometimento de fibrose radioinduzida na pele dos animais irradiados. Segundo Muller, (2007) e Flanders, (2003) queratinócitos e fibroblastos são produtores de níveis elevados de TGF-beta1 após a irradiação.

O efeito da radiação parece ser um processo multicelular, que é mantido através da comunicação entre diversas células (Rodemann e Bamberg, 1995). Essa interação, de diferentes tipos celulares (células endoteliais, macrófagos, monócitos, mastócitos e fibroblastos) envolve a reprogramação genética das células que passam a expressar, dentro de poucas horas, após a exposição à radiação, uma serie de mediadores. Essa modulação inicial

na expressão desses genes pode estar relacionada com efeitos tardios da irradiação (Basavaraju e Easterly, 2002; Boema et al, 2005).

Quando se trata de um tecido irradiado em longo prazo, o que se destaca é a morte por necrose. Todos os tecidos afetados por uma avançada fibrose induzida pela irradiação têm o risco de desenvolver radionecrose (Delanian e Lefaix, 2004; Delanian e Lefaix, 2007)

Alguns estudos demonstram que após a irradiação, o que se observa é a proliferação irregular de células endoteliais, conduzindo à formação de capilares, com irregularidades, no diâmetro e na forma. Porém com o passar dos dias observa-se uma redução do número de capilares, o que reflete na progressão da fibrose, por causa de um suprimento sanguíneo inadequado do parênquima (Baker e Krochack, 1989; Onoda et al, 1999; Basavaraju e Easterly, 2002; Boerma et al, 2004; Schultz-Hector e Trott, 2007; Wang et al, 2007) É oportuno ressaltar que, em todos os artigos, os autores sugerem que as lesões observadas são agravadas com o tempo e com a dose da irradiação. Foi observado neste trabalho que o infiltrado inflamatório era mais intenso nos grupos intermediários (5,10 e 15 dias), o que mostra que esse período é crítico para o processo de reparo tecidual, uma vez que uma fase inflamatória prolongada prejudica a cicatrização, além de ocasionar uma maior expressão da citocina TGF-beta1 pelos diversos tipos celulares. A persistência dessa fase inflamatória e expressão do TGF-beta1 ocorre pela sua ação quimiotática, ocasionando com isso um recrutamento de mais células inflamatórias, além de aumentar sua produção, devido a esse feedback positivo ocasionado pela sua concentração no local da injúria (Rube et al, 2002; Flanders et al, 2002; Flanders et al, 2003; Amadeu et al, 2008).

Os resultados visualizados no presente trabalho levam a crer que além da deposição anormal de MEC em algumas regiões, caracterizando fibrose, em outras é possível observar a escassez da mesma, indicando a participação de metaloproteases nessa região. As metaloproteases estariam degradando o colágeno presente nessa região (Oishi et al, 2002).

Através da análise ultraestrutural dos feixes de colágeno, indica a substituição de um tipo de colágeno mais resistente (Col I) por outro com fibrilas do tipo III mais finas. A fragilidade que esse adelgaçamento ocasionada na pele tende a prejudicar sua resistência, podendo desta forma inferir danos ao organismo dos pacientes, que serão submetidos a tratamento radiológico ou a exposição acidental, devido ao fato da pele exercer várias funções, dentre as quais destaca-se proteção, termorregulação, percepção, metabolização de hormônios entre outras. E conseqüentemente afetando a qualidade de vida dos pacientes e acidentados (Oishi et al, 2002; Bhavsar et al, 2009; Tang et al, 2010).

Neste trabalho foram visualizados o adelgaçamento de fibras de colágeno em todas as doses utilizadas, o mesmo foi mais expressivo nas doses de 40 e 60 Gy em virtude ao maior dano gerado por essas doses na pele irradiada. Esse resultado pode indicar uma fragilidade da pele irradiada, devido ao fato da pele ser composta por 75% de colágeno, além do mesmo ser responsável pela firmeza e integridade da pele. Esse resultado visualizado é corroborado pelos dados encontrados na literatura (Clark et al, 1993; Brasileiro et al, 2004)

O encurtamento visto nos grupos intermediários das doses utilizadas indica que essa pele não possui mais sua característica morfológica normal, o que pode acarretar a perda de sua função e conseqüentemente uma diminuição na sua capacidade de resistência a choques físicos, o que é visualizado em alguns acidentes radiológicos, onde o paciente é acometido por uma recidiva da lesão meses após a cicatrização (Valverde, 2003).

Foi visualizado encurtamento das fibras e a disposição mais perpendicular entre elas, caracterizando o processo de remodelamento tecidual em relação ao colágeno nos animais com doses mais altas e com número de dias elevados. Também foi visto a hialinização da matriz indicando uma modificação estrutural da mesma.

No presente trabalho foi observada uma curva dose-resposta em relação ao reparo tecidual cutâneo. Os resultados obtidos nos diferentes grupos de doses utilizadas demonstraram que a dose mais baixa devido ao discreto infiltrado inflamatório visualizado não houve o comprometimento da cicatrização das lesões radioinduzidas, o mesmo não ocorrendo nas doses mais altas. No grupo de animais irradiados com 40 Gy foram visualizadas lesões mais agressivas e com um significativo infiltrado inflamatório o que ocasionou um atraso na cicatrização dessas lesões. Neste caso puderam ser observadas regiões de acantose, além de alterações morfológicas no tecido irradiado, indicando a ocorrência de fibrose radioinduzida. No grupo 60 Gy o infiltrado inflamatório observado também foi muito significativo, acarretando atraso na cicatrização. Os resultados corroboram com dados descritos na literatura onde o prolongamento da fase de inflamação acarreta prejuízo ao processo de reparo tecidual cutâneo adequado (Amadeu et al, 2008; Bhavsar et al, 2009; Tang et al, 2010).

Classicamente, os efeitos tardios provocados pela radiação em um tecido normal eram vistos como inevitáveis, progressivos e não tratáveis. Atualmente os efeitos induzidos pela radiação são vistos como dinâmicos, onde várias células interagem e que podem ser modulados.

Em vista dos resultados obtidos, os quais encontram-se apoiados com o encontrado na literatura, entende-se que seja de extrema importância a elaboração de técnicas e/ou estratégias de proteção para a pele antes dos pacientes serem submetidos ao tratamento radioterápico. Estas estratégias podem ser de cunho biológico através de fitoterápicos, por exemplo, que preparem as células (ou tecidos) para receberem a radiação ionizante. Desta forma, com o órgão fortalecido é possível a redução dos efeitos radioinduzidos.

Desta forma, conhecendo-se a evolução de uma complicação, é possível fazer-se mais efetivo o desenvolvimento ou o aprimoramento de estratégias terapêuticas com a finalidade de minimizar os efeitos colaterais e proporcionar uma melhoria da qualidade de vida dos pacientes. E no momento em que se pretende reduzir os efeitos colaterais com um determinado tratamento, pode-se inferir que os gastos futuros serão minimizados.

5 CONCLUSÃO

Em ratos irradiados, a presença de reparo tecidual cutâneo é constatada.

As doses maiores (40 e 60 Gy) correspondem às mais deletérias. O estudo parece sugerir um limiar de dose para que as alterações macroscópicas e microscópicas se manifestem na pele.

As maiores doses utilizadas induziram um processo inflamatório significativo na pele, ativando o sistema imunológico e com isso promovendo um aumento na expressão da citocina prófibrótica TGF-beta1.

O prolongamento da fase inflamatória gerada pela radiação ionizante afetou o reparo tecidual cutâneo.

Ocorre adelgaçamento das fibras colágeno observados na microscopia de luz e corroborado na microscopia eletrônica de varredura.

REFERÊNCIAS

- Amadeu T, Seabra A, de Oliveira M, Monte-Alto-Costa A. Nitric Oxide Donor Improves Healing if Applied on Inflammatory and Proliferative Phase *Journal of Surgical Research*, 2008. 149(1), 84-93
- Amadeu TP, Coulomb B, Desmouliere A, et al. Cutaneous wound healing: Myofibroblastic differentiation and in vitro models. *Int J Low Extrem Wounds* 2003;2:60.
- Archambeau JO, Pezner R, Warsseman T. Pathophysiology of irradiated skin and breast. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 1995;31:1171-85
- Ashcroft GS, Yang X, Glick AB, Weinstein M, Letterio JL, Mizel DE, et al. Mice lacking Smad3 show accelerated wound healing and an impaired local inflammatory response. *Nat Cell Biol* 1999, 1:260–266
- Atamas SP. Complex cytokine regulation of tissue fibrosis. *Life Sci*. 2002. s27; 72(6):631-43
- Baker DG, Krochak RJ. The response of the microvascular system to radiation: a review. *Cancer Invest*. 1989, 7(3):287-94
- Barcellos-Hoff MH. How do tissues respond to damage at the cellular level? The role of cytokines in irradiated tissues. *Radiat Res*. 1998; 150(5 Suppl):S109–S120.
- Basavaraju SR, Easterly CE. Pathofisiological effects of radiation on atherosclerosis development and progression, and the incidence of cardiovascular complications. *Med Phys*. 2002, 29(10):2391-40 3
- Beck LS, DeGuzman L, Lee WP, Xu Y, Siegel MW, Amento EP: One systemic administration of transforming growth factor-beta 1 reverses age- or glucocorticoid-impaired wound healing. *J Clin Invest* 1993, 92:2841–9
- Berberich W, Schnabel K, Berg D, Lamprecht E. boost irradiation of breast carcinoma: teletherapy vs. brachytherapy. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2001, 94 (2):276-82
- Bergonie, J; Tribondeau, L. Interpretation – of some results of radiotherapy and an attempt at determining a logical technique of treatment. *Radial Res*; 11: 587, 1959.
- Berta L, Fazzari A, Ficco AM, Enrica PM, Catalano MG, Frairia R. Extracorporeal shock waves enhance normal fibroblast proliferation in vitro and activate mRNA expression for TGF-beta1 and for collagen types I and III. *Acta Orthop*. 2009 Oct;80(5):612-7.
- Bhavsar D, Shettko D, Tenenhaus M. Encircling the Tendon Repair Site with Collagen-GAG Reduces the Formation of Postoperative Tendon Adhesions in a Chicken Flexor Tendon Model. *J Surg Res*. 2009. 29: 1-7.
- Boerma M, Zurcher C, Esveldt I, Schutte-Bart CI, Wondergem J. Histopathology of ventricles, coronary arteries and mast cell accumulation in transverse and longitudinal sections of the rat heart after irradiation. *Oncol Rep*. 2004, 12 (2): 231-9

Boerma M, Wang J, Wondergem J, Joseph J, Qiu X, Kennedy RH, et al. Influence of mast cells on structural and functional manifestations of radiation-induced heart disease. *Cancer Res.* 2005, 15;65(8):3100-7

Branton MH, Kopp JB. TGF- β and fibrosis. *Microbes Infect.* 1999;1: 1349–65.

Brasileiro Filho G. *Bigliolo Patologia geral.* 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2004: 75-80.

Bujak M, Frangogiannis NG. The role of TGF- β signaling in myocardial infarction and cardiac remodeling. *Cardiovasc Res.* 2007, 1;74(2):184-95

Charniot JC, Zerhouni K, Kidouche R, Nascimbeni L, Gandjbakhch I, et al. Late cardiac complications of radiation therapy. *Presse Med.* 2006, 35(2 Pt 1):239-42.

Chen L, Brizel DM, Rabbani ZN, *et al.* The protective effect of recombinant human keratinocyte growth factor on radiation-induced pulmonary toxicity in rats. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2004;60:1520-29.

Chin D, Boyle GM, Parsons PG, Coman WB. What is transforming growth factor- β (TGF- β)? *Br J Plast Surg.* 2004, 57(3):215-21

Chung, YL; Wang, AJ; Yao, LF. Antitumor histone deacetylase inhibitors suppress cutaneous radiation syndrome: Implications for increasing therapeutic gain in cancer radiotherapy. *Molecular cancer Therapeutics.* 2004; 3(3): 317-25.

Clark RAF. Cutaneous tissue repair: basic biologic considerations. *J Am Acad Dermatol.* 1985;13:701-25.

_____. Biology of dermal wound repair dermatological clinics. *J. Invest. Dermatol.* 1993; 11: 647-61.

_____. *The molecular and cellular biology of wound repair.* New York: Plenum Press, 1996:3–50.

Cosgrove GP, Brown KK, Schiemann WP, et al. Pigment epithelium-derived factor in idiopathic pulmonary fibrosis: A role in aberrant angiogenesis. *Am J Respir Crit Care Med* 2004;170:242–51.

Cotran RS, Kumar V, Robbins, ST. *Patologia estrutural e funcional.* 6.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2000: 87-99.

Cox JD; Stetz J; Pajak TF. Toxicity criteria of the Radiation Therapy Oncology Group (RTOG) and the European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC). *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1995; 31(5):1341-6.

Dalerba P, Cho RW, Clarke MF. Cancer stem cells: models and concepts. *Annu Rev Med.* 2007;58;267-84

Delanian S, Lefaix JL. The radiation-induced fibroatrophic process: therapeutic perspective via the antioxidant pathway. *Radiother Oncol.* 2004, 73(2): 119-31

_____. Current management for late normal tissue injury: radiation-induced fibrosis and necrosis. *Semin Radiat Oncol.* 2007;17(2):99-107.

Dirier A, Akmansu M, Bora H, Gurer M. The effect of vitamin E on acute skin reaction caused by radiotherapy. *Clinical and Experimental Dermatology*, 2007. 32, 571–3

Epstein EH Jr. [α 1(III)]₃ human skin collagen, release by pepsin digestion and preponderance in fetal life. *J Biol Chem.* 1974, 249:3225-31

Flanders KC, Sullivan CD, Fujii M, Sowers A, Anzano MA, Arabshahi A, et al Transforming growth factor beta in tissue fibrosis. *N Engl J Med* 1994, 331:1286–92

_____. Mice Lacking Smad3 Are Protected Against Cutaneous Injury Induced by Ionizing Radiation. *American Journal of Pathology*, 2002. 160 (3): 1057-68

Flanders KC, Major CD, Arabshahi A, Aburime EE, Okada MH, Fujii M, et al. Interference with Transforming Growth Factor-beta Smad3 Signaling Results in Accelerated Healing of Wounds in Previously Irradiated Skin. *American Journal of Pathology.* 2003.163.(6):2247-57

Forrester JS, Bick-Forrester J. Persistence of inflammatory cytokines cause a spectrum of chronic progressive diseases: Implications for therapy. *Med Hypotheses* 2005;65:227–31.

Frank S, Madlener M, Werner S: Transforming growth factors beta1, beta2, and beta3 and their receptors are differentially regulated during normal and impaired wound healing. *J Biol Chem* 1996, 271: 10188–93

Frank S, Stallmeyer B, Kampfer H, et al. Nitric oxide triggers enhanced induction of vascular endothelial growth factor expression in cultured keratinocytes (HaCaT) and during cutaneous wound repair. *FASEB J* 1999;13:2002.

Fuchs J, Mehlhorn RJ, Packer L. Free radical reduction mechanisms in mouse epidermis skin homogenates. *J Invest Dermatol* 1989; 93: 633–40.

Gatenby RA; Gillies RJ. A microenvironmental model of carcinogenesis. *Nat Rev cancer.* 2008, 8(1):56-61.

Harper JL, Franklin LE, Jenrette JM, Aguero EG. Skin toxicity during breast irradiation: pathophysiology and management. *South Med* 2004; 97(10):989-93.

Hopewell JW. The skin: its structure and response to ionizing radiation. *Int J Radiat Biol.* 1990,57:751-773

INCA – Ministério da Saúde. Ações de Enfermagem para o controle do câncer – Uma proposta de integração Ensino-Serviço. 2. ed, 2002

International Atomic Energy Agency (IAEA). Disponível em: www.iaea.org.

Jammet, H; Gongora, R; Jockey, P. The 1978 Algerian accident: acute local exposure of two children. In Hübner KF, Fry SA. The medical basis for radiation accident preparedness. New York: Elsevier North/Innland, 1980; 229-45.

Kamamoto F, Paggiaro AO, Rodas A, Herson MR, Mathor MB, Ferreira MC. A wound contraction experimental model for studying keloids and wound-healing modulators. *Artificial Organs*. 2003, 27(8):701

Karagiannis, TC; El-Osta, A. The paradox of Histone Deacetylase Inhibitor-Mediated modulation of cellular responses to radiation. *Cell Cycle*. 2006; 5 (3) 288-295.

Katayama I, Yokozeki H, Nishioka K: Mast-cell-derived mediators induce epidermal cell proliferation: clue for lichenified skin lesion formation in atopic dermatitis. *Int Arch Allergy Immunol* 1992, 98:410-14

Kupper TS. The activated keratinocyte: a model for inducible cytokine production by non-bone marrow-derived cells in cutaneous inflammatory and immune responses. *J Invest Dermatol*. 1990, 94:146s-50s

Lijnen PJ, Petro VV, Fagard RH. Induction of cardiac fibrosis by transforming growth factor-beta(1). *Mol Genet Metab*. 2000, 71(1-2): 418-35

Magné N, Toillon RA, Bottero V, Didelot C, Houtte PV, Gérard JP, et al. NF-kappaB modulation and ionizing radiation: mechanisms and future directions for cancer treatment. *Cancer Lett*. 2006, 18;231(2):158-68

Martin M, Vozenin MC, Gault N, Crechet F, Pfarr CM, et al. Coactivation of AP-1 activity and TGF-b1 gene expression in the stress response of normal skin cells to ionizing radiation. *Oncogene*. 1997; 15:981-99

Martin M, Lefaix J, Delanian S: TGF-beta1 and radiation fibrosis: a master switch and a specific therapeutic target? *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2000, 47:277-90

Martin P: Wound healing—aiming for perfect skin regeneration. *Science* 1997, 276:75-81

McQuestion, M. Evidence Based Skin care management in radiation therapy. *Seminars in Oncology Nursing*. 22 (13), 2006; 163-73

Muller k, Meineke V. Radiation-induced alterations in cytokine production by skin cells. *Experimental Hematology*. 2007. 35:96-104

Nouailhetas, Y; de Almeida, CEB; Pestana, S. Radiações Ionizantes e a vida. Comissão Nacional de Energia Nuclear (CNEN), 2007.

Oishi Y, Fu ZW, Ohuki Y, Kato H, Noguchi J. cutaneous biology molecular basis of the alteration in skin collagen metabolism in response to in vivo dexamethasone treatment: effects on the synthesis of collagen type I and III, collagenase, and tissue inhibitors of metalloproteinases. *Br J Dermatol*. 2002; 147(5):859

Onoda JM, Katak SS, Diglio CA. Radiation induced endothelial cell retraction in vitro: correlation with acute pulmonary edema. *Pathol Oncol Res.* 1999, 5(1):49-55.

Pathak MA, Stratton K. Free radicals in human skin before and after exposure to light. *Arch Biochem Biophys* 1968; 123: 468–76.

Peled ZM, Chin GS, Liu W, et al. Response to tissue injury. *Clin Plast Surg* 2000;27:489.

Piek E, Ju WJ, Heyer J, Escalante-Alcalde D, Stewart CL, Weinstein M, Deng C, et al. Functional characterization of transforming growth factor beta signaling in Smad2- and Smad3-deficient fibroblasts. *J Biol Chem* 2001, 276:19945–53

Rajalalitha P, Vali S. Molecular pathogenesis of oral submucous fibrosis: A collagen metabolic disorder. *J Oral Pathol Med* 2005;34:321–328.

Randall K, Coggle JE: Long-term expression of transforming growth factor TGF beta 1 in mouse skin after localized beta-irradiation. *Int J Radiat Biol* 1996, 70:351–360

Record IR, Dreosti IE, Konstantinopoulos M, Buckley RA. The influence of topical and systemic vitamin E on ultraviolet light-induced skin damage in hairless mice. *Nutr Cancer* 1991; 16: 219–25.

Roberts AB, Piek E, Bottinger EP, Ashcroft G, Mitchell JB, Flanders KC: Is Smad3 a major player in signal transduction pathways leading to fibrogenesis? *Chest* 2001, 120:S43–S47

Roberts AB, Sporn MB: Transforming growth factor-beta. *The Molecular and Cell Biology of Wound Repair*. Edited by RAF Clark. New York, Plenum Press, 1996: 275–308

Rochkind S, Rousso M, Nissan M. Systemic effects of lowpower laser irradiation on the peripheral and central nervous system, cutaneous wounds, and burns. *Lasers Surg Med.* 1989;9:174-8.

Rodemann HP, Bamberg M. Cellular basis of radiation-induced fibrosis. *Radiother Oncol.* 1995, 35 (2): 83-90

Ross MH, Pawlina, W. *Histologia: texto e atlas*. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan. 5.ed. 2005

Rube CE, Uthe D, Schmid KW, Richter KD, Wessel J, Schuck A, et al. Dose-dependent induction of transforming growth factor-beta (TGF-beta) in the lung tissue of fibrosis-prone mice after thoracic irradiation. *Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys.* 2002. 47(4):1033–1042.

Rubin P, Johnston CJ, Williams JP, *et al.* A perpetual cascade of cytokines postirradiation leads to pulmonary fibrosis. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1995;33:99 –109.

Ruiz-Ortega M, Rodríguez-Vita J, Sanchez-Lopez E, Carvajal G, Egido J. TGF-beta signaling in vascular fibrosis. *Cardiovasc Res.* 2007 May 1;74(2):196-206.

Scharffetter K, Kulozik M, Stolz W, Lankat-Buttgereit B, Hatamochi A, Sohnchen R, et al. Localization of collagen alpha-1 (I) gene expression during wound healing by in situ hybridization. *J Invest Dermatol*. 1989;93:405-12.

Schmid P, Itin P, Cherry G, Bi C, Cox DA: Enhanced expression of transforming growth factor-beta type I and type II receptors in wound granulation tissue and hypertrophic scar. *Am J Pathol* 1998, 152:485– 93

Schultz-Hector S e Trott KR. Radiation-induced cardiovascular diseases: is the epidemiologic evidence compatible with the radiobiologic data? *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2007, 1:67(1): 10-8

Seares, MC; Ferreira, CA. A importância do conhecimento sobre radioproteção pelos profissionais da radiobiologia. CEFET/SC Núcleo de Tecnologia Clínica, 2001.

Shal WJ, Clever H. Cutaneous Scars: Part I. *Int J Dermatol*. 1994;33:681-91.

Sime, PJ; O'Reilly, MA. Fibrosis of the lung and other tissues: New concepts in pathogenesis and treatment. *Clinical Immunology*. 2001;99 (3): 308-319.

Singler AJ, Clark RA: Cutaneous wound healing. *N Engl J Med* 1999, 341:738–746

Sporn MB, Roberts AB, Shull JH, Smith JM, Ward JM, Sodek J: Polypeptide transforming growth factors isolated from bovine sources and used for wound ealing in vivo. *Science* 1983, 219:1329–31

Tang L, Cui T, Wu JJ, Liu-Mares W, Huang N, Li J. A rice-derived recombinant human lactoferrin stimulates fibroblast proliferation, migration, and sustains cell survival. *Wound Repair Regen*. 2010 Jan-Feb;18(1):123-31.

Tokarek R, Bernstein EF, Sullivan F, Uitto J, Mitchell JB: Effect of therapeutic radiation on wound healing. *Clin Dermatol* 1994, 12: 57–70

Tomasek JJ, Gabbiani G, Hinz B, et al. Myofibroblast and mechano-regulation of connective tissue remodeling. *Mol Cell Biol* 2002;3:349.

Uith J, Pulkkinen L, Chu ML. collagen in biology of extracellular matrix, blood vessels, and nerves. In: Fitzpatrick TB, editors. *Dermatology in general medicine*. 5th ed. New York: McGraw-Hill, 1999: 245-59

Usui ML, Underwood RA, Mansbridge JN, et al. Morphological evidence for the role of suprabasal keratinocytes in wound reepithelialization. *Wound Repair Regen* 2005;13:468.

Valverde NJL. Radiações ionizantes. In: Mendes R. *Patologia do trabalho*. São Paulo: Atheneu, 2. ed., (1), 2003:595-635.

Verrecchia F, Mauviel A. Transforming growth factor-beta and fibrosis. *World Journal of Gastroenterology* 2007 14; 13(22): 3056-62

Wang J, Boerma M, Fu Q, Hauer-Jensen M. Significance of endothelial dysfunction in the pathogenesis of early and delayed radiation enteropathy. *World J Gastroenterol.* 2007, 14;13(22):3047-55

Witte MB, Barbul A. General principles of wound healing. *Surg Clin North Am* 1997;77:509.

Wynn TA. Cellular and molecular mechanisms of fibrosis. *J Pathol.* 2008, 214(2):199-210

Xiao Z, Su Y, Yang S, Yin L, Wang W, Yi Y, et al. Protective effect of esculentoside A on radiation-induced dermatitis and fibrosis. *Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys.* 2006.65(3): 882-9.

Zitelli J. Wound healing for the clinician. *Adv Dermatol.* 1989;2:243-67.

ANEXO



UNIVERSIDADE DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE BIOLOGIA ROBERTO ALCANTARA GOMES



COMISSÃO DE ÉTICA PARA O CUIDADO E USO DE ANIMAIS EXPERIMENTAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº **CEA/248/2008** sobre "**Desenvolvimento de um modelo em ratos Wistar para análise de lesões de pele radioinduzidas**", sob a responsabilidade de **Carlos Eduardo Veloso de Almeida**, 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 **29/10/2008**. Este certificado expira em **29/10/2012**.

Rio de Janeiro, 29 de Outubro de 2008.

Prof. Israel Felzenszwalb

CEA/IBRAG/UERJ
Israel Felzenszwalb
Diretor
IBRAG - UERJ
Mat. 2887-8

Profa. Patricia Cristina Lisboa

CEA/IBRAG/UERJ

Profª Dra. Patricia Cristina Lisboa da Silva
Profª Adj. do Depto. Ciências Fisiológicas / IBRAG / UERJ
Matricula 34765-8

/ass