

**DESENVOLVIMENTO DE UM MODELO DE RETITE  
ACTÍNICA INDUZIDA POR BRAQUITERAPIA DE  
ALTA TAXA DE DOSE EM CAMUNDONGOS: ESTUDO  
DOS MECANISMOS ENVOLVIDOS**

**CARLOS HELI BEZERRA LEITE**

**Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação  
Interinstitucional (DINTER) em Oncologia da  
Fundação Antônio Prudente em parceria com o  
Instituto do Câncer do Ceará, para a obtenção do  
título de Doutor em Ciências**

**Área de Concentração: Oncologia**

**Orientadores: Prof. Dr. Ronaldo de Albuquerque  
Ribeiro (*in memoriam*), Prof. Dr. Roberto César  
Pereira Lima Júnior**

**Co-orientador: Prof. Dr. Paulo Roberto Carvalho  
de Almeida**

**São Paulo**

**2017**

## FICHA CATALOGRÁFICA

**Preparada pela Biblioteca da Fundação Antônio Prudente**

Leite, Carlos Heli Bezerra

**Desenvolvimento de um modelo de retite actínica induzida por braquiterapia de alta taxa de dose em camundongos: estudo dos mecanismos envolvidos /**

Carlos Heli Bezerra Leite – São Paulo 2017.

86p.

Tese (Doutorado)-Fundação Antônio Prudente e Escola Cearense de Oncologia-ECO. Programa de Pós-Graduação Interinstitucional (DINTER)

Curso de Pós-Graduação em Ciências - Área de concentração: Oncologia.

Orientador: Prof. Dr. Ronaldo de Albuquerque Ribeiro (in memoriam). Prof. Dr. Roberto César Pereira Lima Júnior

Descritores: 1. Radioterapia/Radiotherapy. 2. Proctite/Proctitis. 3. Braquiterapia/Brachytherapy. 4. Modelos Animais/Models, Animal. 5. Toxicidade/Toxicity.

A **DEUS**, por responder aos meus chamados nos momentos de angústia.

Ao eterno Prof. Dr. RONALDO DE ALBUQUERQUE RIBEIRO

“Saudade dentro do peito  
É qual fogo de monturo  
Por fora tudo perfeito  
Por dentro fazendo furo.”  
Patativa do Assaré

Ao camundongo

Percebemos que tua dor em nada difere da nossa  
e que buscavas o calor dos teus semelhantes para aliviar teu pavor quando, de alguma  
forma, sentias que o fim era iminente.  
Notamos tua assustadora semelhança conosco que, se por um lado validava o nosso  
esforço em prosseguir, por outro nos fazia pensar em desistir.  
Se, um dia, ficar claro que somos mesmo iguais, quem haverá de nos perdoar?

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, **JOSÉ HELI** e **MARIA DALVA**, pelo amor incondicional e por mostrarem o caminho do que é correto.

Aos meus irmãos **ELIAS**, **DALVELI** e **JÉSSICA**, por proporcionarem uma harmonia familiar, imprescindível para o meu bem-estar físico e mental.

À minha esposa e meu amor **LUCIANA CAMPOS**, pelo companheirismo, incentivo e motivação para caminhar pela árdua jornada deste doutorado, e por compreender minhas ausências.

Ao **Prof. Dr. RONALDO DE ALBUQUERQUE RIBEIRO** (*in memoriam*), pelos eternos ensinamentos que me acompanharão por toda a vida, e por sua valorosa contribuição para esta tese.

Ao **Prof. Dr. ROBERTO CÉSAR PEREIRA LIMA JÚNIOR**, por não hesitar em assumir a orientação desta tese, pela competência, profissionalismo, e pela maneira amigável e humana com a qual me tratou ao longo deste período, passando a me influenciar como profissional e ser humano.

Ao **Prof. Dr. PAULO ROBERTO CARVALHO DE ALMEIDA** pela importante co-orientação e pela sua disponibilidade e boa vontade em contribuir com as importantes análises histopatológicas, mesmo em meio à extenuante demanda que seu cargo acadêmico impõe.

Aos colegas Médicos e Físicos do Departamento de Radioterapia do ICC pela compreensão e apoio dado para a realização dos experimentos nesta instituição.

À **Dra. LÚCIA ALCÂNTARA** por sua contribuição na minha formação profissional e como ser humano e por ter me incentivado a aceitar o desafio deste doutorado.

Ao colega e amigo **Dr. JOSÉ FERNANDO BASTOS DE MOURA** por sua influência na ideia deste trabalho a partir de sua dissertação e de sua tese e pelo seu incentivo.

Aos Físicos **SOLANGE PINCELLA** e **CLÁUDIO FLORINDO** pela contribuição direta no planejamento da braquiterapia deste estudo.

Aos colegas e alunos da iniciação científica **DIEGO HOLANDA, DULCE ANDRADE, GABRIEL SILVA e JÉSSICA FREITAS** por tornarem possível a execução dos experimentos deste trabalho sempre de forma disciplinada e amigável.

Ao colega e amigo **Dr. CAIO ABNER VITORINO GONÇALVES LEITE** pela relevante e laboriosa tarefa de realizar as tão importantes colonoscopias, sempre de maneira cordial e demonstrando boa vontade.

Ao **Prof. Dr. FERNANDO DE QUEIROZ CUNHA** por gentilmente ceder o aparelho de colonoscopia.

À **Prof. Dra. DEYSI VIVIANA TENAZOA WONG** pela valiosa contribuição com as dosagens de citocinas.

À técnica **VANDINHA FRANÇA PINHEIRO** pelo valoroso suporte dado sempre que solicitado.

Ao técnico de laboratório e histologia **ALCEU MACHADO DE SOUSA** pela contribuição fundamental no preparo das lâminas para análise histopatológica.

À técnica em histologia **JOSYANE MARTINS** pela realização da imunohistoquímica de maneira prestativa e eficaz.

Ao **Robson** do biotério da UNIFOR pela versatilidade em disponibilizar os animais.

À funcionária do HDR – ICC **JOSELEIDE DOS SANTOS SOUSA (JÔ)** pelo suporte no setor de braquiterapia para a irradiação dos animais.

Aos colegas pós-graduandos do LAFICA que de alguma forma contribuíram com conselhos para a melhoria da realização deste trabalho.

Aos funcionários do LAFICA e NPDM que sempre de forma cortês deram o suporte adequado, em especial à técnica de laboratório **ADENILDE DE SOUZA AMORIM** pela presteza em preparar o material necessário para os experimentos.

À colega e amiga **Dra PATTY SALDANHA** pelas contribuições com as análises histopatológicas.

À Médica Veterinária do Biotério do Departamento de Farmacologia e Fisiologia da UFC, **Dra GABRIELA MARIÂNGELA FARIAS DE OLIVEIRA**, pelo apoio

Ao **Dr. ROBERT WILLIAM DE A. BRINGEL** pelas fotos de colonoscopia cedidas para a ilustração desta tese.

À bibliotecária do ICC **LARISSA MACÊDO DE ALMEIDA** pela contribuição com os artigos de referência.

À Escola Cearense de Oncologia, nas pessoas do Superintendente Executivo **Prof Dr MANFREDO LUIZ LINS E SILVA**, do Coordenador da Divisão de Ensino **Prof Dr MARCOS VENÍCIO ALVES LIMA**, da Coordenadora Acadêmica **LUCIANA SILVA DA COSTA** e da Secretária Acadêmica **PRISCILA SILVA SANTOS BERNARDO**, pelo apoio dado ao longo deste doutorado.

Às instituições NETTO, FunCap e CNPQ pelo suporte financeiro que tornou viável este trabalho.

Ao Instituto do Câncer do Ceará e ao AC Camargo Cancer Center por terem tornado possível a realização deste sonho.

## RESUMO

Leite CHB. **Desenvolvimento de um modelo de retite actínica induzida por braquiterapia de alta taxa de dose em camundongos: estudo dos mecanismos envolvidos.** [Tese de Doutorado-Programa de Pós-Graduação Interinstitucional (DINTER) em Oncologia da Fundação Antônio Prudente em Parceria com o Instituto do Câncer do Ceará].

**INTRODUÇÃO:** A radioterapia, incluindo a teleterapia e a braquiterapia, é uma modalidade de tratamento antineoplásico com mecanismo de morte celular através da radiação ionizante. É utilizada em cerca de 65% dos pacientes com câncer. A retite actínica é uma toxicidade comum (5-20%) em pacientes irradiados por neoplasias de próstata, reto e tumores ginecológicos, com impacto negativo na qualidade de vida dos mesmos. Os mecanismos de dano são pouco conhecidos devido à ausência de um modelo animal que reproduza esta toxicidade. O presente trabalho visa a desenvolver um modelo de retite actínica em camundongos induzida por braquiterapia de alta taxa de dose e estudar o papel de mediadores inflamatórios. **METODOLOGIA:** Camundongos machos C57BL/6 (20-25g, n = 5 a 7) foram submetidos à braquiterapia endorretal (HDR – Ir 192) com aplicador cilíndrico de 3,1mm de diâmetro, introduzido por uma extensão de 2,0 cm da margem anal. Utilizou-se três frações diárias e consecutivas de 7,5 Gy ou 9,5 Gy em duas diferentes profundidades: “dose superficial” (DS), a 0,45mm da superfície do aplicador e uma “dose profunda” (DP) a 3,0mm da mesma referência. O grupo controle recebeu o mesmo aplicador e igual tempo, mas sem irradiação (“sham cateter”). A curva de sobrevida, variação ponderal, escores de diarreia e colonoscopia foram realizadas 24h, 48h, 7 e 30 dias após o término da irradiação. Após a eutanásia amostras de reto foram coletadas para análise histopatológica, dosagem de citocinas (IL-10, IL-6 e KC), MPO e IHQ para i-NOS, COX-2 e TNF-  $\alpha$ . Na fase de modulação, utilizaram-se inibidores específicos: aminoguanidina para NO e infliximab para TNF- $\alpha$ . **RESULTADOS:** Maior perda ponderal e redução da sobrevida foi observada apenas após 30 dias da irradiação com 3 x 9,5 Gy (DP). Não houve aumento de escores de diarreia ou na dosagem de MPO.



Maiores alterações colonoscópicas, quando comparado ao controle, foram vistas nos regimes 3x9,5Gy(DS)/48h-7dias-30dias; 3x7,5Gy(DS)/30dias e 3x9,5Gy(DP)/7dias. Um aumento nos escores histopatológicos ocorreu nos protocolos 3x9,5Gy(DS)/7dias; 3x7,5Gy(DS)/30dias e 3x9,5(DP)Gy/24h-48h-7dias em relação ao sham catéter. Dosagens superiores de KC e IL-6 foram observadas em 3x9,5(DP)Gy/7dias, além de maior expressão de i-NOS, COX-2 e TNF- $\alpha$  à IHQ, sendo eleito o regime modelo a ser utilizado na modulação. Nesta fase, não houve redução das alterações colonoscópicas ou histopatológicas por nenhum dos inibidores (aminoguanidina ou Infliximab). CONCLUSÕES: Padronizamos um modelo de retite actínica por braquiterapia de alta taxa de dose. Contudo, a modulação farmacológica de NO ou TNF- $\alpha$  não preveniu o dano tecidual.

## SUMMARY

Leite CHB. **[Development of a mouse model of radiation proctitis induced by high dose rate brachytherapy: a mechanistic study]**. São Paulo; 2017. [Tese de Doutorado-Programa de Pós-Graduação Interinstitucional (DINTER) em Oncologia da Fundação Antônio Prudente em Parceria com o Instituto do Câncer do Ceará].

INTRODUCTION: Radiotherapy, including external beam radiotherapy and brachytherapy, is one modality of anticancer treatment, which is based on ionizing radiation to induce tumor cell death. Such therapeutic approach is employed in approximately 65% of all cancers. In the brachytherapy modality, the radiation source is positioned in contact with the tumor mass. Radiation proctitis is a common toxicity (5-20%) related to irradiation of prostate, gynecological and rectum cancers with a known negative impact on patient's quality of life. The underlying mechanisms are unknown due to the lack of an adequate animal model that mimics clinical radiation proctitis. Then, the present study aimed to develop an animal model of HDR brachytherapy-induced proctitis in mice and to study the role of key inflammatory mediators. METHODS: C57BL/6 male mice (20-25 g, n=6/group) were subjected to high dose rate radiotherapy [radiation source: iridium-192 (Ir-192)] through a cylindrical propylene tube with a 3.1 mm outer diameter and the tip inserted 2 cm far from anal sphincter into the rectum. The radiation doses used were three daily and consecutive fractions of 7.5 or 9.5 Grays (Gy) in two different depths: the “superficial dose” (SD) at 0.45mm from applicator surface and the “deep dose” (DD), at 3.0mm. The sham group received only the applicator with same time but no radiation source. Survival rate, body weight variations, diarrhea scores and colonoscopy were performed at 24 and 48 hours and on seventh and thirtieth days after animal irradiation. Following euthanasia, samples of rectum were collected for histopathologic analysis, dosage of cytokines (IL-1, IL-6 and KC), MPO and immunohistochemistry assays (i-NOS, COX-2 and TNF- $\alpha$ ). In the modulation phase, aminoguanidine, to block NO and infliximab to TNF-  $\alpha$  were used. RESULTS: The animals that received radiation at 3x9.5 Gy(DD) showed a greater mortality and

significant weight loss on day 30 versus sham group. No changes on diarrhea scores or MPO dosage were observed. An increasing in colonoscopic lesions was noted in 3x9.5Gy(SD)/48h-7days-30days; 3x7.5Gy(SD)/30days and 3x9.5Gy(DD)/7days protocols as compared to control. Greater microscopic damage scores were observed in 3x9.5Gy(SD)/7days; 3x7.5Gy(SD)/30days and 3x9.5(DD)Gy/24h-48h-7days schemes. An increasing in KC and IL-6 dosages occurred in 3x9.5Gy(DD)/7days and also increased i-NOS, COX-2 and TNF- $\alpha$  expression at immunohistochemistry assay. In the pharmacological modulation phase, no colonoscopic or histopathologic changes were observed by using any inhibitors (aminoguanidina or infliximab). CONCLUSION: We developed a new animal model of radiation proctitis induced by high-dose rate brachytherapy. However, the modulation of NO or TNF- $\alpha$  did not prevent tissue damage.

## LISTA DE FIGURAS

|                  |                                                                                                                                                        |    |
|------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 1</b>  | Sobreviventes do câncer e taxas de prevalência nos Estados Unidos.....                                                                                 | 2  |
| <b>Figura 2</b>  | O mecanismo de ação da radioterapia.....                                                                                                               | 4  |
| <b>Figura 3</b>  | O tratamento da retite actínica com laser de argônio.....                                                                                              | 11 |
| <b>Figura 4</b>  | A inserção do aplicador de braquiterapia.....                                                                                                          | 22 |
| <b>Figura 5</b>  | O sistema de braquiterapia de alta taxa de dose HDR Microselectron (Nucletron®).....                                                                   | 22 |
| <b>Figura 6</b>  | Esquema da anatomia da região pélvica do camundongo e inserção do aplicador de braquiterapia.....                                                      | 23 |
| <b>Figura 7</b>  | Esquema da irradiação, grupo controle e tempo para colonoscopia, eutanásia e coleta.....                                                               | 24 |
| <b>Figura 8</b>  | A avaliação colonoscópica.....                                                                                                                         | 25 |
| <b>Figura 9</b>  | Comparações das curvas de sobrevida.....                                                                                                               | 31 |
| <b>Figura 10</b> | Comparações dos escores colonoscópicos 24h após irradiação superficial.....                                                                            | 32 |
| <b>Figura 11</b> | Dosagem de MPO dose superficial 24h após irradiação.....                                                                                               | 33 |
| <b>Figura 12</b> | Comparações das curvas de sobrevida.....                                                                                                               | 33 |
| <b>Figura 13</b> | Comparação das dosagens de MPO entre o grupo controle e os grupos irradiados com dose superficial de 3 x 7,5 Gy e 3 x 9,5 Gy 48h após a exposição..... | 34 |
| <b>Figura 14</b> | Comparações dos escores colonoscópicos 48h após irradiação superficial.....                                                                            | 35 |
| <b>Figura 15</b> | Comparações das curvas de sobrevida.....                                                                                                               | 35 |
| <b>Figura 16</b> | Comparações das curvas de sobrevida .....                                                                                                              | 37 |

|                  |                                                                                                                                                            |    |
|------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 17</b> | Comparações dos escores colonoscópicos 30 dias após irradiação superficial.....                                                                            | 38 |
| <b>Figura 18</b> | Comparações dos danos histopatológicos 30 dias após irradiação superficial.....                                                                            | 38 |
| <b>Figura 19</b> | Comparação das dosagens de MPO entre o grupo controle e os grupos irradiados com dose superficial de 3 x 7,5 Gy e 3 x 9,5 Gy 30 dias após a exposição..... | 39 |
| <b>Figura 20</b> | Comparações das curvas de sobrevida.....                                                                                                                   | 39 |
| <b>Figura 21</b> | Comparações das curvas de sobrevida.....                                                                                                                   | 41 |
| <b>Figura 22</b> | Comparações das curvas de sobrevida.....                                                                                                                   | 43 |
| <b>Figura 23</b> | As alterações perineais sete dias após a irradiação com dose profunda de 3 x 9,5 Gy.....                                                                   | 44 |
| <b>Figura 24</b> | A colonoscopia sete dias após dose profunda em animal controle.....                                                                                        | 45 |
| <b>Figura 25</b> | As alterações macroscópicas do reto sete dias após a irradiação com dose profunda de 3 x 9,5 Gy.....                                                       | 46 |
| <b>Figura 26</b> | A comparação dos danos histopatológicos (HE) entre o grupo controle (sham catéter) e o grupo irradiado com dose profunda de 3 x 9,5 Gy após sete dias..... | 47 |
| <b>Figura 27</b> | Os danos histopatológicos em detalhe (HE), sete dias após dose profunda de 3 x 9,5 Gy.....                                                                 | 48 |
| <b>Figura 28</b> | Comparações das curvas de sobrevida.....                                                                                                                   | 49 |
| <b>Figura 29</b> | Dosagem de KC do estudo de desenvolvimento do modelo.....                                                                                                  | 50 |
| <b>Figura 30</b> | Dosagem de IL-6 do estudo de desenvolvimento do modelo.....                                                                                                | 51 |
| <b>Figura 31</b> | Dosagem de IL-10 do estudo de desenvolvimento do modelo.....                                                                                               | 52 |

|                  |                                                                                                                                                  |    |
|------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 32</b> | Análise estatística dos escores de imunohistoquímica para COX-2, 7 dias após dose profunda de 3 x 9,5 Gy. Avaliação na mucosa .....              | 53 |
| <b>Figura 33</b> | A IHQ para COX-2 sete dias após dose profunda de 3 x 9,5 Gy.....                                                                                 | 54 |
| <b>Figura 34</b> | Análise estatística dos escores de imunohistoquímica para TNF- $\alpha$ , sete dias após dose profunda de 3 x 9,5 Gy.....                        | 55 |
| <b>Figura 35</b> | A IHQ para TNF- $\alpha$ sete dias após dose profunda de 3 x 9,5 Gy.....                                                                         | 56 |
| <b>Figura 36</b> | Análise estatística dos escores de imunohistoquímica para iNOS, sete dias após dose profunda de 3 x 9,5 Gy.....                                  | 57 |
| <b>Figura 37</b> | A IHQ para i-NOS sete dias após dose profunda de 3 x 9,5 Gy.....                                                                                 | 58 |
| <b>Figura 38</b> | A comparação dos escores colonoscópicos entre os grupos controle e os grupos irradiados sem e com a modulação com Aminoguanidina.....            | 61 |
| <b>Figura 39</b> | A comparação dos escores de danos histopatológicos entre os grupos controle e os grupos irradiados sem e com a modulação com Aminoguanidina..... | 61 |
| <b>Figura 40</b> | Alterações histológicas na modulação com aminoguanidina.....                                                                                     | 62 |
| <b>Figura 41</b> | A comparação dos escores colonoscópicos entre os grupos controle e os grupos irradiados sem e com a modulação com Infliximab.....                | 63 |
| <b>Figura 42</b> | A comparação dos escores de danos histopatológicos entre os grupos controle e os grupos irradiados sem e com a modulação com Infliximab..        | 63 |
| <b>Figura 43</b> | Alterações histológicas na modulação com Infliximab.....                                                                                         | 64 |

## LISTA DE TABELAS

|                  |                                                                        |    |
|------------------|------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Tabela 1</b>  | Escores de diarreia 24h após irradiação superficial.....               | 31 |
| <b>Tabela 2</b>  | Danos histopatológicos 24h após irradiação superficial.....            | 32 |
| <b>Tabela 3</b>  | Escores de diarreia 48h após irradiação superficial.....               | 34 |
| <b>Tabela 4</b>  | Danos histopatológicos 48h após irradiação superficial.....            | 34 |
| <b>Tabela 5</b>  | Escores de diarreia sete dias após irradiação superficial.....         | 36 |
| <b>Tabela 6</b>  | Escores colonoscópicos sete dias após irradiação superficial.....      | 36 |
| <b>Tabela 7</b>  | Danos histopatológicos sete dias após irradiação superficial.....      | 36 |
| <b>Tabela 8</b>  | Escores de diarreia 30 dias após irradiação superficial.....           | 37 |
| <b>Tabela 9</b>  | Escores de diarreia 24 horas após irradiação com dose profunda.....    | 40 |
| <b>Tabela 10</b> | Escores colonoscópicos 24 horas após irradiação com dose profunda..... | 40 |
| <b>Tabela 11</b> | Danos histopatológicos 24 horas após irradiação profunda.....          | 40 |
| <b>Tabela 12</b> | Escores de diarreia 48 horas após irradiação profunda.....             | 41 |
| <b>Tabela 13</b> | Escores colonoscópicos 48 horas após irradiação profunda.....          | 41 |
| <b>Tabela 14</b> | Danos histopatológicos 48 horas após irradiação profunda.....          | 42 |
| <b>Tabela 15</b> | Escores de diarreia sete dias após irradiação profunda.....            | 43 |
| <b>Tabela 16</b> | Escores colonoscópicos sete dias após irradiação profunda.....         | 45 |
| <b>Tabela 17</b> | Danos histopatológicos sete dias após irradiação profunda.....         | 48 |
| <b>Tabela 18</b> | Resumo dos resultados do estudo de desenvolvimento do modelo.....      | 59 |

## LISTA DE SIGLAS, SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

|                                |                                                       |
|--------------------------------|-------------------------------------------------------|
| <b>2D</b>                      | Bidimensional                                         |
| <b>3D</b>                      | Tridimensional                                        |
| <b>AP-1</b>                    | Proteína ativadora - 1                                |
| <b>BED</b>                     | Dose biologicamente equivalente                       |
| <b>BP</b>                      | Proteína ligante                                      |
| <b>CD</b>                      | Grupo de diferenciação                                |
| <b>cGy</b>                     | Centigray                                             |
| <b>COX</b>                     | Cicloxigenase                                         |
| <b>DMSO</b>                    | Dimetilsulfóxido                                      |
| <b>DP</b>                      | Dose profunda                                         |
| <b>DS</b>                      | Dose superficial                                      |
| <b>ELISA</b>                   | Ensaio de imunoabsorção enzimática                    |
| <b>FSU</b>                     | Subunidades funcionais                                |
| <b>Gy</b>                      | Gray                                                  |
| <b>HDR</b>                     | Alta taxa de dose                                     |
| <b>HE</b>                      | Hematoxilina-eosina                                   |
| <b>ICAM</b>                    | Molécula de adesão intercelular                       |
| <b>IHQ</b>                     | Imunohistoquímica                                     |
| <b>IL</b>                      | Interleucina                                          |
| <b>IMRT</b>                    | Radioterapia de intensidade modulada                  |
| <b>INF-<math>\gamma</math></b> | Interferon gama                                       |
| <b>i-NOS</b>                   | Óxido nítrico sintase induzida                        |
| <b>IP</b>                      | Intraperitoneal                                       |
| <b>Ir 192</b>                  | Iridium 192                                           |
| <b>KC</b>                      | Quimiocina derivada de queratinócito                  |
| <b>KDa</b>                     | Kilodalton                                            |
| <b>LAFICA</b>                  | Laboratório de Farmacologia da Inflamação e do Câncer |
| <b>MCP</b>                     | Proteína quimioatrativa de monócitos                  |
| <b>mg</b>                      | Miligrama                                             |



|                       |                                           |
|-----------------------|-------------------------------------------|
| <b>MIP</b>            | Proteína inflamatória de macrófago        |
| <b>MPO</b>            | Mieloperoxidase                           |
| <b>Nd:YAG</b>         | Neodymium-doped Yttrium Aluminum Garnet   |
| <b>NK</b>             | Células matadoras naturais                |
| <b>NFκB</b>           | Fator nuclear kappa B                     |
| <b>NH<sub>2</sub></b> | Grupo amino                               |
| <b>NO</b>             | Óxido nítrico                             |
| <b>PAF</b>            | Fator ativador de plaquetas               |
| <b>PDGF</b>           | Fator de crescimento derivado de plaqueta |
| <b>pg</b>             | Picograma                                 |
| <b>SC</b>             | Subcutâneo                                |
| <b>Th</b>             | T auxiliar                                |
| <b>TNF-α</b>          | Fator de necrose tumoral alfa             |
| <b>VCAM</b>           | Molécula de adesão vaso-célula            |
| <b>VO</b>             | Via oral                                  |

# ÍNDICE

|          |                                                                                                                                        |           |
|----------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1</b> | <b>INTRODUÇÃO.....</b>                                                                                                                 | <b>1</b>  |
| 1.1      | Efeitos Tóxicos da Radioterapia em Geral .....                                                                                         | 4         |
| 1.2      | A Retite Actínica.....                                                                                                                 | 7         |
| 1.3      | O Processo Inflamatório na Retite Actínica.....                                                                                        | 12        |
| 1.4      | O Modelo Experimental de Retite Actínica com uso de Braquiterapia<br>de Alta Taxa .....                                                | 16        |
| 1.5      | Justificativa .....                                                                                                                    | 18        |
| <b>2</b> | <b>OBJETIVOS.....</b>                                                                                                                  | <b>19</b> |
| 2.1      | Objetivo Geral.....                                                                                                                    | 19        |
| 2.2      | Objetivos Específicos.....                                                                                                             | 19        |
| <b>3</b> | <b>MATERIAL E MÉTODOS .....</b>                                                                                                        | <b>20</b> |
| 3.1      | Animais .....                                                                                                                          | 20        |
| 3.2      | Drogas e Diluentes .....                                                                                                               | 20        |
| 3.3      | Irradiação .....                                                                                                                       | 21        |
| 3.4      | Avaliação de Variação Ponderal e Diarreia .....                                                                                        | 24        |
| 3.5      | Colonoscopia.....                                                                                                                      | 25        |
| 3.6      | Avaliação dos Danos Histopatológicos .....                                                                                             | 26        |
| 3.7      | Ensaio de Mieloperoxidase (MPO).....                                                                                                   | 27        |
| 3.8      | Dosagem de Citocinas Il-10, Il-6 e KC por Elisa .....                                                                                  | 27        |
| 3.9      | Imunohistoquímica para Detecção de I-Nos, Cox-2 E TNF-A.....                                                                           | 28        |
| 3.10     | Protocolos da Fase de Modulação.....                                                                                                   | 29        |
| 3.11     | Análise Estatística .....                                                                                                              | 30        |
| <b>4</b> | <b>RESULTADOS .....</b>                                                                                                                | <b>31</b> |
| 4.1      | O Estudo de Desenvolvimento do Modelo .....                                                                                            | 31        |
| 4.1.1    | Análise dos resultados da irradiação com dose prescrita a 2,0mm do eixo<br>(dose superficial) e 24h após o término da irradiação ..... | 31        |

|          |                                                                                                                                               |           |
|----------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 4.1.2    | Análise dos resultados da irradiação com dose prescrita a 2,0 mm do eixo (dose superficial) e 48h após o término da irradiação .....          | 33        |
| 4.1.3    | Análise dos resultados da irradiação com dose prescrita a 2,0 mm do eixo (dose superficial) e sete dias após o término da irradiação .....    | 35        |
| 4.1.4    | Análise dos resultados da irradiação com dose prescrita a .....2,0 mm do eixo (dose superficial) e 30 dias após o término da irradiação ..... | 37        |
| 4.1.5    | Análise dos resultados da irradiação com dose prescrita a 4,55 mm do eixo (dose profunda) e 24 horas após o término da irradiação .....       | 39        |
| 4.1.6    | Análise dos resultados da irradiação com dose prescrita a 4,55 mm do eixo (dose profunda) e 48 horas após o término da irradiação .....       | 41        |
| 4.1.7    | Análise dos resultados da irradiação com dose prescrita a 4,55 mm do eixo (dose profunda) e sete dias após o término da irradiação .....      | 42        |
| 4.1.8    | Análise dos resultados da irradiação com dose prescrita a 4,55 mm do eixo (dose profunda) e 30 dias após o término da irradiação .....        | 49        |
| 4.1.9    | Dosagens das citocinas KC, IL-6 e IL-10 .....                                                                                                 | 49        |
| 4.1.10   | Imunohistoquímica para COX-2, TNF- $\alpha$ e i-NOS .....                                                                                     | 52        |
| 4.1.11   | Resumo do estudo de desenvolvimento do modelo .....                                                                                           | 59        |
| 4.2      | A Modulação .....                                                                                                                             | 60        |
| 4.2.1    | A modulação com Aminoguanidina .....                                                                                                          | 60        |
| 4.2.2    | A modulação com Infliximab .....                                                                                                              | 63        |
| <b>5</b> | <b>DISCUSSÃO .....</b>                                                                                                                        | <b>65</b> |
| <b>6</b> | <b>CONCLUSÕES .....</b>                                                                                                                       | <b>75</b> |
| <b>7</b> | <b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>                                                                                                       | <b>76</b> |

## **ANEXOS**

**Anexo 1** Carta de Aprovação da Comissão de Ética em Pesquisa Animal-UFC

**Anexo 2** Autorização Comissão de Ética no uso de Animais

**Anexo 3** Escores de Danos Histopatológicos

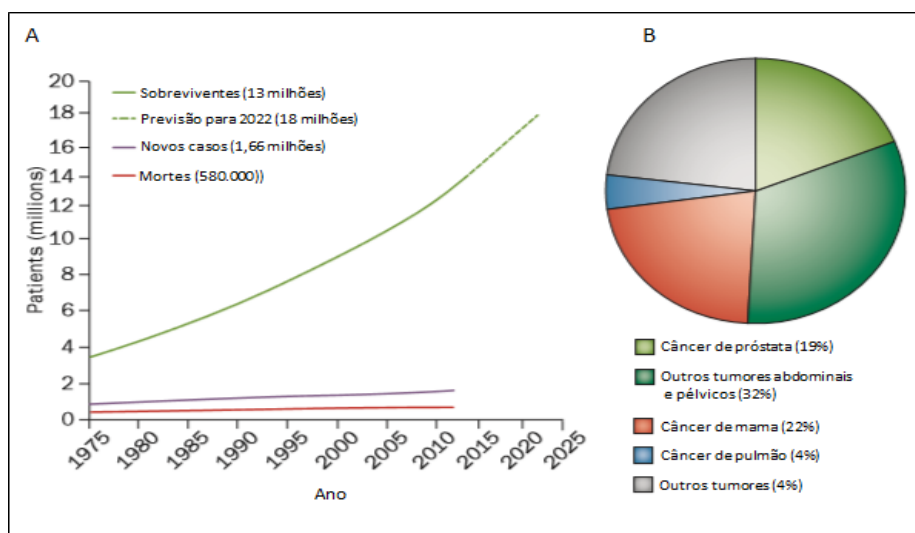
## 1 INTRODUÇÃO

O câncer é uma doença genética que pode decorrer de alterações como mutações, tipo deleções, inserções, amplificações, instabilidades cromossômicas, perda de heterozigose ou translocações (JAIN e DUDA 2013). A inatividade de genes supressores de tumor contribui como mecanismo epigenético na carcinogênese (WEINBERG 2007). Fatores externos como o tabaco, infecções virais, exposição à luz solar, dentre vários outros, também estão implicados na etiologia do câncer (SOUNG et al. 2008).

Com o aumento da expectativa de vida da população pela redução da mortalidade por afecções de grande impacto, como doenças infectocontagiosas e cardiovasculares, e pela exposição ainda marcante a fatores de risco, o câncer vem ocupando posição de destaque nas estatísticas gerais de saúde, tendo em vista sua crescente incidência. Em contrapartida, devido principalmente aos avanços na terapia antineoplásica, sua mortalidade vem sendo progressivamente reduzida, com aumento das chances de cura e da sobrevida global (HALPERIN et al. 2013).

Esta maior probabilidade de um tempo livre de doença prolongado significa um número crescente de sobreviventes do câncer e implica numa atenção crescente às toxicidades ou sequelas da terapêutica empregada (HAUER-JENSEN et al. 2014) (Figura 1), repercutindo na decisão clínica no momento da escolha da modalidade de tratamento e também na necessidade de compreensão dos mecanismos fisiopatológicos, prevenção e tratamento destes efeitos adversos.

A radioterapia é uma modalidade de terapia antineoplásica que utiliza a radiação ionizante como agente no mecanismo da morte celular tumoral. Os fótons são o principal tipo de radiação ionizante utilizada na prática clínica, quer sejam produzidos em aparelhos elétricos como aceleradores lineares (raios X), quer sejam provenientes de radioisótopos como em unidades de telecobalto ou braquiterapia com irídio 192 (raios gama). Os fótons são radiação do tipo indiretamente ionizante, ou seja, a lesão da sua principal estrutura alvo, o DNA, dá-se através da formação de elementos intermediários, os radicais livres (HALL e GIACCIA 2012).



**Fonte:** Adaptado de HAUER-JENSEN et al. (2014).

**Legenda:** A - Incidência e a mortalidade do câncer têm permanecido quase estável ao longo das décadas, porém o coorte de sobreviventes do câncer tem aumentado cerca de 2 a 3% por ano, superando 13 milhões de pessoas em 2013 e com expectativa de 18 milhões para 2022. Cerca de metade destes sobreviventes tiveram tumores abdominais ou pélvicos, muitos dos quais foram tratados com radioterapia. B – Taxas de prevalência dos tumores.

**Figura 1** - Sobreviventes do câncer e taxas de prevalência nos Estados Unidos.

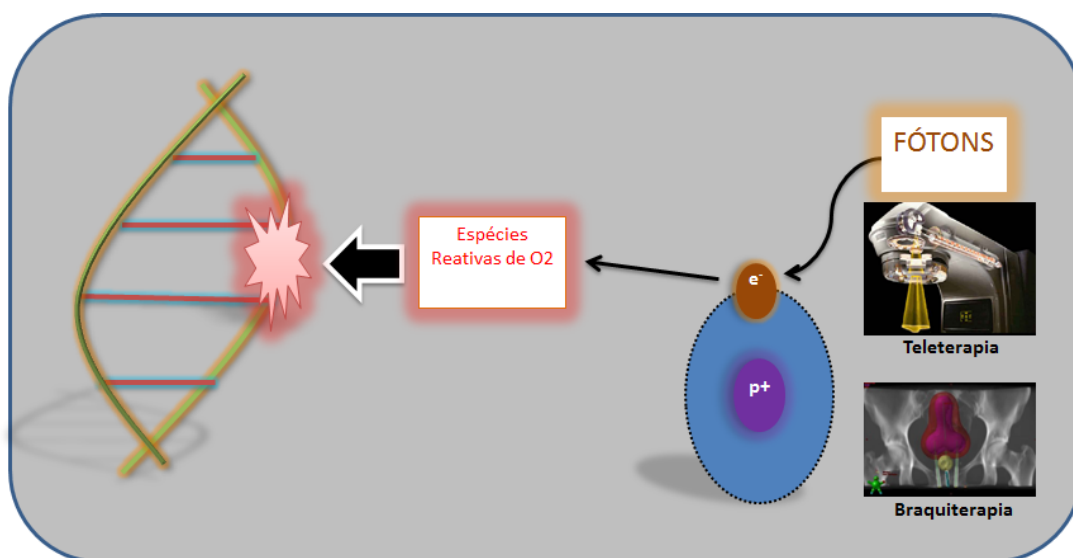
A radioterapia é indicada em cerca de 65% de todos os pacientes portadores de câncer, seja como tratamento primário, neoadjuvante, adjuvante, paliativo (dor, hemorragia, compressão medular, obstrução de vias aéreas, dentre outros) ou no tratamento de condições benignas associadas (profilaxia de ginecomastia, ablação ovariana actínica, esplenomegalia com sequestro celular, dentre outros). Pode ser indicada de forma exclusiva ou combinada à quimioterapia, hormonioterapia ou terapia-alvo (HALPERIN et al. 2013).

Quanto à forma de tratamento a radioterapia pode ser dividida em teleterapia e braquiterapia. Na primeira, a fonte de radiação se encontra distante do meio absorvedor (paciente/tumor), devendo o feixe de radiação percorrer certa distância no ar após ser gerado. Permite o tratamento de áreas relativamente grandes (tumor primário e sítios de drenagem, por exemplo) e na grande maioria das vezes não é invasiva. Vem evoluindo drasticamente acompanhando os avanços principalmente da tecnologia da informação, desde a radioterapia convencional ou 2D, onde a delimitação da área a ser irradiada é baseada apenas em estruturas ósseas ou radiopacas, passando pela radioterapia conformacional – 3D, onde o planejamento se dá a partir de imagens obtidas por tomografia da região a ser irradiada, melhorando a precisão e conhecimento da distribuição da dose, até a radioterapia com modulação da intensidade do feixe ou IMRT, em que se permite esculpir mais ainda a forma da distribuição da dose, possibilitando o tratamento seguro em situações clínicas complexas, como na necessidade de escalonamento de dose ou proximidade do alvo a estruturas normais sensíveis (CHAO et al. 2013).

Na braquiterapia a fonte de radiação é colocada dentro ou em contato do tumor ou da área de risco, seja através de cavidades naturais (braquiterapia

intracavitária) como vagina, cavidade oral ou esôfago, dentre outros, seja com uso de agulhas-guia, abrindo-se caminho através do interstício (braquiterapia intersticial) (THOMADSEN 2007).

É fundamental se ter em mente que o mecanismo de dano ao DNA é basicamente o mesmo, seja na modalidade de teleterapia, seja na braquiterapia (Figura 2). A radiação (fótons como exemplo) proveniente da teleterapia ou braquiterapia provoca a formação de espécies reativas de  $O_2$ , que por sua vez lesará diferentes moléculas da célula alvo, dentre as quais o DNA (HALL e GIACCIA 2012).



**Fonte:** Adaptado de HALL e GIACCIA (2012).

**Figura 2** - O mecanismo de ação da radioterapia

## 1.1 EFEITOS TÓXICOS DA RADIOTERAPIA EM GERAL

A toxicidade à radioterapia é, de forma geral, evento comum, com impacto na qualidade de vida do paciente e nos custos financeiros subsequentes com sobrecarga

para o sistema de saúde, seja com avaliações médicas, procedimentos ou internamentos. Mais ainda, a possibilidade de redução na produtividade ou mesmo incapacidade total do indivíduo em realizar suas atividades de trabalho trazem prejuízo extra ao sistema (ELTING et al. 2007).

Em um estudo retrospectivo de coorte avaliando as repercussões da mucosite oral actínica em 204 pacientes irradiados por neoplasia de cabeça e pescoço, observou-se que o evento ocorreu em 91% dos casos, sendo de grau severo em 66% e que está associado a dor, perda de peso, aumento do uso de recursos e aumento nos custos financeiros, que variaram de U\$1,700 a U\$6,000, dependendo do grau da toxicidade (ELTING et al. 2007).

Avaliando o impacto nos custos por mucosite oral e esofagite em pacientes irradiados por câncer de pulmão do tipo não-pequenas células e por câncer de cabeça e pescoço, MCCAFFREY et al. (2005) observaram que os gastos, nos casos em que a toxicidade foi observada, deu-se em média \$16,930 a mais para o grupo tratado por câncer de cabeça e pescoço e \$11,077 a mais para o grupo tratado por câncer de pulmão. Concluíram que este aumento foi de 2 a 2,6 vezes quando comparado ao grupo que não apresentou tais toxicidades e que medidas que venham a reduzir a incidência ou severidade destas reações adversas teriam impacto na redução de custos.

Um corte norueguês com 535 pacientes tratados por câncer retal e com tempo médio de seguimento de 4,8 anos demonstrou que a radioterapia estava associada a efeitos deletérios tardios consideráveis nas funções anorretais quanto à frequência e incontinência fecal, com impacto negativo na vida social e na qualidade de vida (BRUHEIM et al. 2010).



A toxicidade da radioterapia pode ser dividida em dois tipos: aguda ou tardia. A primeira se dá em dias ou semanas após a exposição e resulta principalmente da irradiação de grandes áreas de tecidos com alta renovação celular, como é o caso da pele, mucosa do trato gastrointestinal ou sistema hematopoiético. Já os efeitos tardios podem se manifestar meses ou anos após a irradiação e são mais sensíveis ao aumento do tamanho da fração empregada. Ocorrem preferencialmente em tecidos de proliferação lenta ou sem proliferação, como rim, pulmão, sistema nervoso central, coração e fígado. Podem resultar de uma combinação de dano vascular associado à perda celular do parênquima que quase nunca é totalmente restabelecida, diferente do que ocorre nos tecidos relacionados aos efeitos agudos (HALL e GIACCIA 2012).

Há uma conhecida relação entre a dose absorvida, o volume do órgão irradiado e a probabilidade de ocorrência do efeito adverso correspondente naquele órgão, ou seja, quanto maior o volume de órgão normal irradiado ou quanto maior a dose recebida, maior a chance de toxicidade. A tolerância de determinado órgão ou tecido à irradiação depende da habilidade das células clonogênicas em manter um nível mínimo de células maduras. A organização estrutural do tecido também interfere em tal tolerância. As subunidades funcionais (FSU) são estruturas anatomicamente relacionadas à função do órgão, como por exemplo, o néfron e o rim. A forma como estas FSU's estão dispostas no tecido ou órgão, se em série como na medula espinhal ou em paralelo, como no fígado, repercutem na tolerância à radioterapia (HALL e GIACCIA 2012).

## 1.2 A RETITE ACTÍNICA

É inquestionável que a radioterapia tem papel fundamental no manejo de diversas neoplasias malignas pélvicas, entretanto a toxicidade decorrente é relevante, podendo, em casos extremos, o tratamento ser tão difícil e desafiador quanto o da doença neoplásica em si (ASHBURN e KALADY 2016).

Aproximadamente 300.000 pessoas em todo o mundo realizam radioterapia pélvica anualmente (ANDREYEV 2007a). As principais indicações ocorrem por câncer de próstata, neoplasias ginecológicas, câncer de reto e canal anal. Segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA) estima-se um total de 61.200 novos casos de câncer de próstata para o Brasil em 2016 (Ministério da Saúde 2016). A retite induzida pela radioterapia é um problema clínico comum. Tem sido reportado que entre 5 e 20% dos sobreviventes a longo prazo de câncer que haviam sido submetidos à irradiação abdominal ou pélvica desenvolveram mudanças em seus hábitos intestinais que afetaram sua qualidade de vida (HAYNE et al. 2001).

YEOH et al. (2012), em um estudo prospectivo e randomizado comparando diferentes regimes de irradiação em pacientes com câncer de próstata, demonstraram que após 5 anos a taxa de urgência fecal e sangramento retal foi de 44% e 21% respectivamente, e que 48% dos pacientes tiveram repercussão negativa nas suas atividades de vida diária. Tais resultados foram independentes do regime de radioterapia empregado.

CIEZKI et al. (2011) avaliaram as toxicidades tardias e seus custos em 137.427 pacientes portadores de câncer de próstata tratados com prostatectomia radical ou radioterapia externa (teleterapia) ou braquiterapia. Com tempo médio de

seguimento de 71 meses, cerca de 7,3% dos pacientes apresentaram toxicidade com necessidade de intervenção, sendo 6,9% após cirurgia, 8,8% após teleterapia e 3,7% após braquiterapia. Cauterização por retite actínica hemorrágica foi a intervenção gastrointestinal mais comum (0,8% de todos os pacientes). Concluiu-se que a teleterapia foi a modalidade mais tóxica e com maior custo por paciente por ano, que foi de U\$ 6,412.29, versus U\$ 3,205.71 da prostatectomia e \$ 2,557.36 da braquiterapia (CIEZKI et al. 2011).

Por seus resultados em termos de sobrevida global e câncer-específica semelhantes à prostatectomia radical e com taxas aceitáveis de toxicidade retal e gênito-urinária, a radioterapia, seja na modalidade de teleterapia ou braquiterapia, seja exclusiva ou combinada à hormonioterapia, tem apresentado crescente indicação como primeira opção de tratamento no câncer de próstata localizado (ANDREYEV 2007b). A necessidade de escalonamento de dose num alvo anatomicamente próximo ao reto associada à elevada sobrevida dos pacientes tornam a retite actínica, apesar de seus níveis aceitáveis, um evento ainda muito presente na rotina da radioterapia (KUBAN et al. 2008).

As neoplasias de colo uterino, com elevada prevalência em países subdesenvolvidos ou em desenvolvimento como o Brasil (BRASIL 2016), têm a radioterapia como opção de tratamento em diversos cenários, seja no tratamento primário da doença localmente avançada, quando é utilizada concomitante à quimioterapia radiosensibilizante (EIFEL et al. 2004), seja na adjuvância, após a cirurgia radical (ROTMAN et al. 2006), com taxas de retite actínica que podem chegar a 15% após 20 anos de tratamento (EIFEL et al. 1995).

Ainda em relação a pacientes portadoras de neoplasia de colo uterino, LEE et al. (2002), utilizando teleterapia com fração de 3 Gy concluíram que uma dose biologicamente equivalente (BED) no reto de 142,7 Gy<sup>3</sup> foi associada a maior seqüela retal que uma BED menor que 131 Gy<sup>3</sup> (LEE et al. 2002).

Os fatores de risco para toxicidade retal actínica ainda não estão totalmente compreendidos. No que diz respeito aos especificamente ligados à radioterapia, a relação entre a dose recebida por determinado volume do órgão tem sido apontada como importante fator em diversos estudos, e tem ditado regras para o planejamento radioterápico (ANDREYEV 2007b). Outros possíveis fatores incluem cirurgia prévia, índice de massa corpórea (obesidade protege enquanto que baixo índice de massa corpórea predispõe à toxicidade retal e intestinal) (WEDLAKE et al. 2010), quimioterapia concomitante, tabagismo (EIFEL et al. 2002), suscetibilidade genética (WEST e BARNETT 2011), diabetes (HEROLD et al. 1999), hipertensão arterial sistêmica, infecção por HIV e doença inflamatória intestinal (WILLETT et al. 2000), sendo esta última contraindicação relativa à radioterapia abdominal ou pélvica. A deficiência de vitamina D está associada a uma maior gravidade na retite actínica (GHORBANZADEH-MOGHADDAM et al. 2015).

A toxicidade retal aguda ocorre durante ou logo após o tratamento radioterápico e pode ser caracterizada por diarreia, puxo, tenesmo, dor ou desconforto local e ocasionalmente hematoquezia. Reações tardias ocorrem normalmente de oito a 12 meses após a irradiação (HAYNE et al. 2001). Podem se manifestar como estenose, diminuição da complacência retal e também hematoquezia. Em pacientes submetidos à radioterapia, os achados endoscópicos são, na sua grande maioria, secundários às alterações actínicas, sendo a biópsia não

realizada de rotina pelo risco de infecção crônica, deficiência na cicatrização ou ulceração (HAYNE et al. 2001).

Fundamental ressaltar que dentre os pacientes irradiados por câncer de próstata, aqueles que experimentaram retite actínica aguda têm cerca de cinco vezes mais chance de desenvolver retite actínica tardia que aqueles assintomáticos (CAMPOSTRINI et al. 2013), ficando claro o elo entre o evento agudo e o crônico. Subtende-se a importância de se compreender os mecanismos fisiopatológicos da inflamação na retite aguda como pré-requisito para também se entender a tardia.

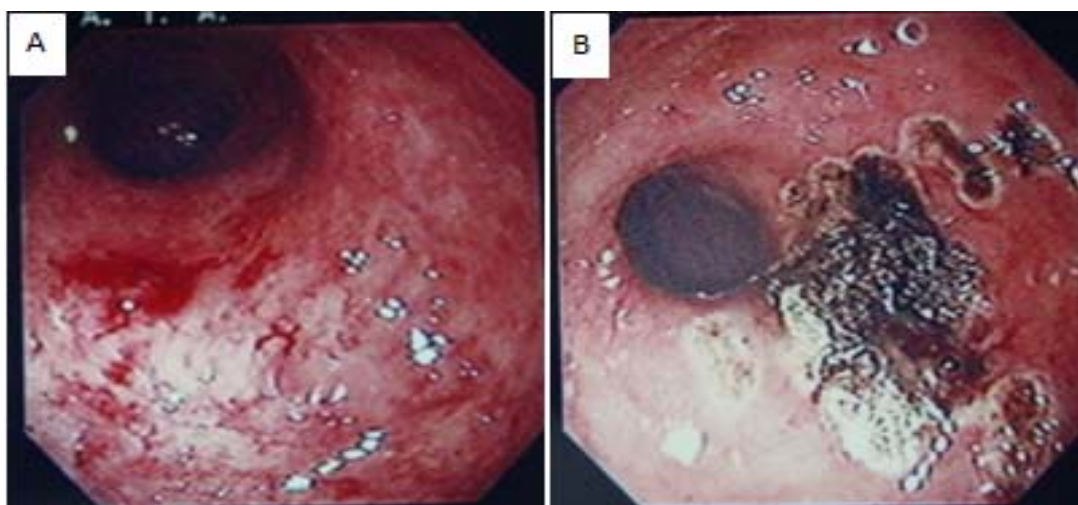
Chama a atenção, na prática clínica, a ocorrência de retite crônica mesmo em casos em que foram utilizadas técnicas mais aprimoradas de planejamento da radioterapia (como a conformacional-3D ou IMRT), com respeito aos limites de dose e volume de reto irradiado. E ainda, o padrão colonoscópico observado da retite muitas vezes não é de um dano localizado na parede retal anterior, onde o planejamento acusava maior dose, e sim de uma retite circunferencial, ocorrendo mesmo em áreas de reto que receberam baixas doses, presumindo uma radiosensibilidade individual em tais pacientes.

Numerosos agentes foram testados, tanto como profiláticos quanto como terapêuticos, após o diagnóstico da retite actínica. Na abordagem profilática, amifostina tópica parece ter tido um modesto efeito (SIMONE et al. 2008), sucralfato não foi eficaz (HOVDENAK et al. 2005) e mesalazina tópica mostrou ser danosa (SANGUINETI et al. 2003). Esteróides, aminosalicilatos, ácidos graxos de cadeia curta, sucralfato e oxigenioterapia hiperbárica são prescritos para o tratamento da retite actínica (O'BRIEN et al. 1997; GUL et al. 2002; ANDREYEV 2007b). Há alguma evidência de alívio sintomático associado ao uso desses dois últimos agentes.

Entretanto, para a maioria dessas terapias a eficácia é ainda incerta (HAYNE et al. 2001; COTTI et al. 2003).

Existem poucas modalidades de tratamento da retite actínica hemorrágica já estabelecida, incluindo formaldeído tópico, coagulação endoscópica, Nd:YAG laser, coagulação com plasma de argônio (Figura 3) ou eletrocoagulação, contudo a eficácia destes tratamentos também parece ser incompleta e geralmente estão associados a complicações significativas (DENTON et al. 2002).

Considerando os resultados insatisfatórios dos tratamentos atuais acima descritos para retite actínica, intervir profilaticamente com moduladores da via do dano rádio induzido parece ser uma estratégia mais racional e, portanto, resolutiva.



**Fonte:** Cortesia do Dr Robert William de A. Bringel – Serviço de Endoscopia do Instituto do Câncer do Ceará.

**Figura 3** - O tratamento da retite actínica com laser de argônio. A retite na sua forma hemorrágica (A) e após o tratamento endoscópico (B).

### 1.3 O PROCESSO INFLAMATÓRIO NA RETITE ACTÍNICA

Tecnicamente o termo retite, per si, refere-se à inflamação do órgão, todavia o evento inicial a que tem se atribuído a patogênese da retite actínica tem sido caracterizado como a morte celular e a perda do epitélio e criptas (PARIS et al. 2001; DÖRR 2009), que funcionaria como gatilho para os fenômenos inflamatórios posteriores, como edema, mucosite (DENTON et al. 2002), ulceração e invasão de bactérias residentes no lúmen. Estas agressões desencadeariam uma resposta ao nível de submucosa, com tentativa de reparo, mas também desenvolvimento de fibrose, ulceração e estenose. Os sintomas clássicos de hematoquezia, diarreia, puxo e tenesmo correspondem às manifestações clínicas da endarterite obliterativa, fibrose submucosa e neoformação vascular (LEIPER e MORRIS 2007).

É possível que o desencadeamento da resposta inflamatória na retite actínica se dê por vias paralelas àquela da morte celular. As espécies reativas de oxigênio, por exemplo, formados nos momentos iniciais da interação da radiação com o tecido absorvedor, antes mesmo de provocarem a morte celular poderiam ser gatilhos extras para a inflamação. Estes agentes, em níveis não diretamente letais para a célula, podem agir na sinalização pró-inflamatória, assim como ativar fatores de transcrição como NF-kB, AP-1, reconhecidamente moduladores da expressão de genes importantes na resposta inflamatória (CONNER et al. 1996).

O papel da migração de neutrófilos na resposta inflamatória intestinal à radiação tem sido estudado em modelos experimentais. MOLLÀ et al. (2003) mostraram a participação de moléculas de adesão leucocitária (ICAM-1 na fase aguda e VCAM-1 na fase tardia, principalmente) em camundongos submetidos à

irradiação abdominal. PANÉS et al. (1995), em um modelo experimental utilizando ratos também após irradiação abdominal, concluíram que a adesão e a migração leucocitária radio induzidas envolvem uma interação entre moléculas de superfície leucocitária CD11/CD18 e moléculas de adesão intercelular (ICAM-1) no endotélio vascular.

A citocina KC é membro da família de quimiocinas CXC e possui outras denominações como CXCL1, SCYB1 e N51, e se assemelha estrutural e funcionalmente à IL-8. É traduzida como um polipeptídeo simples, com 72 aminoácidos e tem peso molecular de aproximadamente 8 kDa. O gene murino foi caracterizado como de resposta aguda, induzido por PDGF. Seu mRNA foi identificado a partir de fibroblastos de hamsters chineses. Pode ser obtida também de melanócitos, queratinócitos, hepatócitos, fibroblastos, neutrófilos e células endoteliais (SINGER e SANSONETTI 2004).

A expressão de KC é normalmente baixa nos tecidos, entretanto, em condições como doenças autoimunes ou neoplasias, seus níveis podem estar elevados. Tem como fatores inibidores o INF- $\gamma$ , IL-10, corticóide e rapamicina (MODI e YOSHIMURA 1999).

KC age como ligante de receptores de mCXCR2, presentes em células como neutrófilos, linfócitos, monócitos e melanócitos. Seu papel fundamental é a regulação da migração de neutrófilos, linfócitos e monócitos, sendo um reconhecido agente quimiotático na inflamação (ROVAI et al. 1998).

A interleucina 6 (IL-6) é uma citocina pró-inflamatória que também tem um papel importante na imunidade. A IL-6 humana recombinante é uma proteína de peso molecular de 22 kDa e contém 189 aminoácidos. Promove crescimento e



diferenciação de células B, secreção de imunoglobulinas, diferenciação e ativação de células T e macrófagos e indução de proteínas de resposta de fase aguda (KAMIMURA et al. 2003).

Muitos tipos de células, incluindo macrófagos, células T, fibroblastos e células endoteliais produzem IL-6 em resposta a estímulos, tais como bactérias, vírus e outras citocinas, particularmente IL-1 e TNF. Tem o Tocilizumab, um anticorpo anti-receptor de IL-6, como seu inibidor e com eficácia demonstrada na melhoria dos sintomas, sinais bem como na redução do dano articular em pacientes portadores de artrite reumatóide (NISHIMOTO e KISHIMOTO 2008).

A interleucina IL-10 é uma citocina com potentes propriedades anti-inflamatórias e papel fundamental na prevenção da inflamação e de doenças autoimunes. Inicialmente foi descrita como uma citocina derivada de linfócitos T-helper, entretanto, atualmente, aceita-se que a IL-10 não é restrita a apenas alguns subtipos de linfócitos, mas também produzida em quase todos os leucócitos. As principais fontes in vivo são os linfócitos T helper, monócitos, macrófagos, células dendríticas, mastócitos e granulócitos (neutrófilos e eosinófilos) (IYER e CHENG 2012).

O mecanismo regulatório da IL-10 pode sofrer interferência de patógenos, de modo a escaparem da defesa imune, promovendo um ambiente favorável à infecção crônica (ROJAS et al. 2017).

O óxido nítrico (NO) é produzido a partir de L-arginina e oxigênio pela enzima NOS que, por sua vez, existe em três formas: induzível (iNOS) e as formas constitutivas endotelial (eNOS) e neuronal (nNOS). As NOS são flavoproteínas

diméricas que contêm tetra-hidrobiopterina e apresentam homologia com o citocromo P450 (LIRK et al. 2002).

O óxido nítrico exerce papel importante em inúmeras condições fisiológicas e patológicas, como regulação da pressão arterial, inflamação, infecção e mesmo progressão neoplásica, colocando a iNOS em posição de marcador e também potencial alvo de terapias (LECHNER et al. 2005).

A aminoguanidina é um fármaco que tem como ação a inibição da produção de NO, agindo como um falso-substrato na reação catalisada pela iNOS, sendo um importante modulador dos efeitos inflamatórios do NO (ZHENG et al. 2010).

Diferentemente da COX-1, a COX-2 não está presente na maioria dos tecidos, e tem sua indução exercida por fenômenos inflamatórios, daí o fato desta última ser preferencialmente alvo de terapias anti-inflamatórias (DE LEVAL et al. 2000).

A COX-2 catalisa a formação de endoperóxidos a partir de oxigênio e araquidonato, com posterior formação de prostaglandinas e tromboxanos, os produtos finais bioativos que invariavelmente acompanham o processo da inflamação (PARENTE e PERRETTI 2003).

As prostaglandinas são vasodilatadores potentes e atuam sinergicamente com outros vasodilatadores como histamina e bradicinina, levando ao eritema e edema local. Algumas prostaglandinas, como aquelas da série E, são também pirogênicas, enquanto que outras podem ter um efeito paradoxal anti-inflamatório (BERTOLINI et al. 2002).

O TNF- $\alpha$  é uma citocina que se liga aos receptores TNFR-55 e TNFR-75, que são expressos em todas as células somáticas. É produzido principalmente por monócitos ativados. É pirogênico por ação direta ou por intermédio do estímulo na

produção de IL-1, sendo também relacionado à caquexia. Pode ainda, em certas condições, estimular a proliferação e diferenciação celular (SIEGEL et al. 1995).

A liberação do TNF- $\alpha$  em resposta ao estímulo inflamatório leva à iniciação da cascata de citocinas, aumento da permeabilidade vascular e posterior recrutamento de macrófagos e neutrófilos ao local de infecção, seja bacteriana, viral, fúngica ou parasitária (ZIDI et al. 2010).

Tem como inibidor o Infliximab, um anticorpo monoclonal quimérico que se liga com uma elevada afinidade tanto à forma solúvel como transmembranar do TNF- $\alpha$  (ZIDI et al. 2010).

Contudo, até o momento, não se tem conhecimento quanto à participação de mediadores inflamatórios na patogênese da retite actínica. Considerando o papel específico de citocinas e enzimas pró-inflamatórias em diversas patologias, torna-se crucial o estudo desses mediadores nas fases mais precoces e tardias de desenvolvimento da retite actínica.

Para o estudo da participação de tantos potenciais mediadores da inflamação na retite actínica é necessário um modelo animal de adequada reprodutibilidade.

#### **1.4 O MODELO EXPERIMENTAL DE RETITE ACTÍNICA COM USO DE BRAQUITERAPIA DE ALTA TAXA**

Por ser um órgão de formato cilíndrico o reto pode ser irradiado de forma bastante factível com o uso de aplicadores de braquiterapia, com distribuição homogênea da dose empregada, grande facilidade técnica e praticidade no manuseio por se tratar de procedimento intracavitário sem o caráter cruento da braquiterapia

intersticial. O tempo total curto de entrega de dose permite a irradiação de um número considerável de animais de forma rápida.

WHITE et al. (1997) demonstraram um modelo experimental de toxicidade retal tardia em ratos irradiados com braquiterapia intracavitária de diferentes tipos quanto à taxa de dose.

Também utilizando ratos, JOHANNESSEN et al. (1996) desenvolveram um modelo de irradiação retal intracavitária com braquiterapia de alta taxa de dose, tendo o Irídio 192 como fonte.

SYMON et al. (2010) estabeleceram um modelo de retite induzida por braquiterapia de alta taxa de dose em camundongos BALB/c e C57BL/6, com a proposta de ser de fácil exequibilidade e reprodutibilidade, além de evidenciar alterações histopatológicas que em muito se assemelham àquelas observadas na correspondente patologia humana. Foi também possível evidenciar neste trabalho a expressão aumentada das citocinas pró-inflamatórias IL-1, IL-6 e TNF- $\alpha$ , e sua correlação com achados histopatológicos tipo inflamação, ulceração e congestão vascular. Entretanto, aspectos técnicos (como o diâmetro do aplicador endorretal) e dosimétricos (profundidade de prescrição da dose) comprometeram a real reprodutibilidade do modelo proposto.

Adicionalmente, nem o trabalho de SYMON et al. (2010) nem os outros dois estudos em ratos demonstraram a cascata de mediadores inflamatórios ou as vias de sinalização celular envolvidas na retite induzida por braquiterapia de alta taxa de dose. É importante salientar, que a modulação farmacológica para mediadores inflamatórios específicos é a abordagem mais adequada para demonstrar a

participação destes em determinada doença, o que, no caso da retite actínica, não foi realizada até então.

## **1.5 JUSTIFICATIVA**

A retite actínica é, portanto, entidade clínica prevalente e com repercussões negativas para a qualidade de vida do paciente e potencialmente impactante do ponto de vista financeiro para o sistema de saúde. A eficácia do seu tratamento é motivo de controvérsia e pouco se sabe sobre os mecanismos da cascata inflamatória envolvida neste processo. Conhecer sua fisiopatologia abre caminho para a otimização da prevenção e do tratamento. Para tanto, é importante o desenvolvimento de um modelo animal que sirva de ferramenta.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 OBJETIVO GERAL**

Desenvolver um modelo de retite actínica pelo uso de braquiterapia de alta taxa de dose em camundongos.

### **2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- I. Padronizar o modelo de retite actínica pelo uso de braquiterapia de alta taxa de dose em camundongos de acordo com parâmetros de lesão macroscópicos, histopatológicos e inflamatórios.
- II. Avaliar, por meio da modulação farmacológica com inibidores específicos, o papel do óxido nítrico (NO), e da citocina pró-inflamatória TNF- $\alpha$ .

### **3 MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 ANIMAIS**

Foram utilizados camundongos C57BL/6 machos, pesando entre 20 e 25 g. Os animais foram colocados em caixas, num ambiente com temperatura de  $22 \pm 2^\circ \text{C}$  e ciclo de 12h claro/12h escuro, com livre acesso a água e ração padrão. Os animais foram fornecidos pelo biotério setorial do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará (UFC) e do biotério da Universidade de Fortaleza (UNIFOR). Os ensaios experimentais desenvolvidos estão de acordo com os padrões de uso de animais experimentais recomendados pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal da UFC, com aprovação sob o protocolo de número 50/13 (Anexo 1).

#### **3.2 DROGAS E DILUENTES**

Água destilada q.s.p

Soro fisiológico 0,9%

Xilazina 2% (Agener União)

Quetamina 10% (Agener União)

Tribromoetanol (Sigma)

Xilocaína gel (Xylestesin®, Cristália)

Álcool etílico 70% (Reagen)

Formaldeído 10% (Reagen)

Hematoxilina (Reagen)

Eosina (Merck)

Anticorpos primários anti-iNOS, anti-COX-2 e anti TNF- $\alpha$  (Santa Cruz – Biotechnology, California - USA)

Anticorpo secundário IgG cabra e coelho (Santa Cruz – Biotechnology, California - USA)

Solução PBS-BSA 5%: PBS (ph 7,3) e Albumina bovina 0,5mg

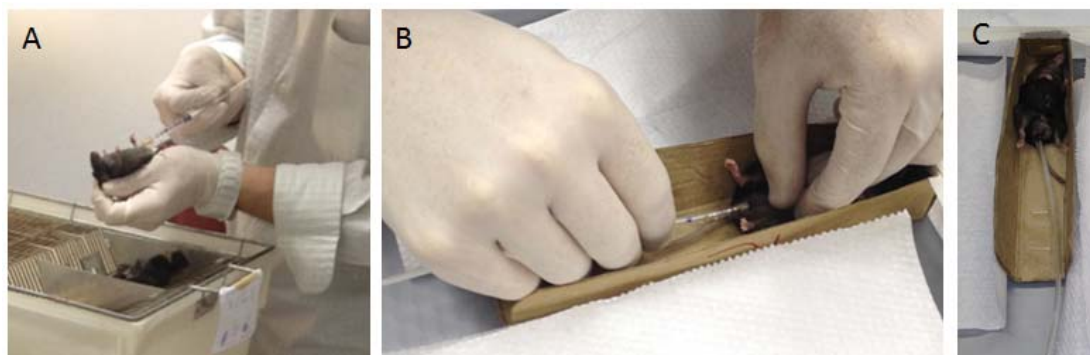
Infliximabe (Remicade®, Plough)

Aminoguanidina (Sigma)

### **3.3 IRRADIAÇÃO**

A irradiação dos animais se deu sob anestesia com quetamina (50mg/kg) e xilazina (2mg/kg) ou tribromo (solução a 2,5% 1 mL / 100g de peso), todos por via IP. Um animal por vez foi anestesiado e imobilizado em decúbito dorsal. Um aplicador individual e cilíndrico de 3,1 mm de diâmetro foi embebido em xilocaína gel e introduzido no reto até penetrar a extensão de 20 mm da margem anal (Figura 4).





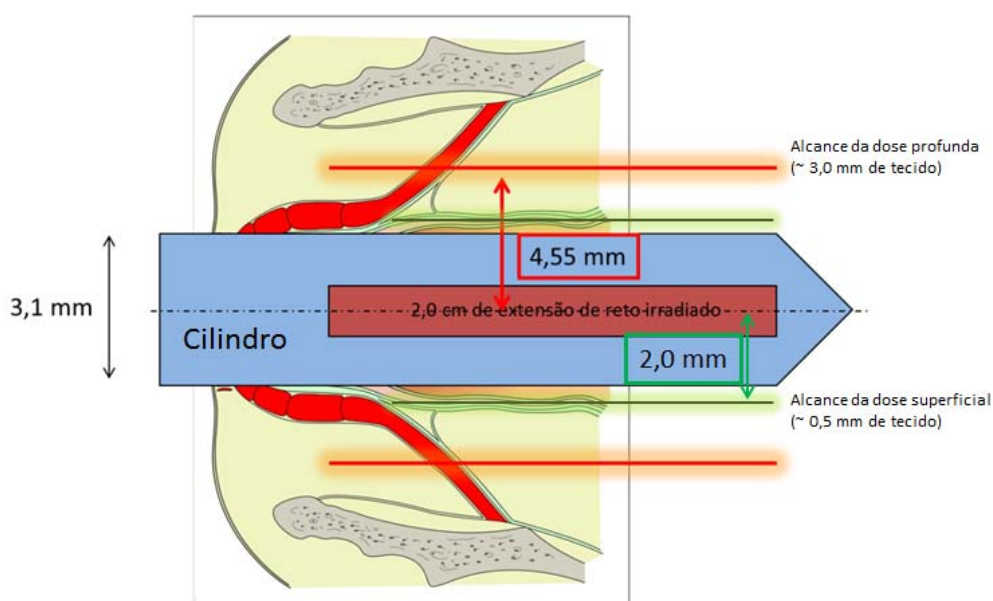
**Figura 4** - A inserção do aplicador de braquiterapia. Anestesia (A), introdução do aplicador(B) e o camundongo pronto para a irradiação (C).

O sistema de braquiterapia de alta taxa de dose foi o HDR Microselectron (Nucletron®) com fonte de Irídio 192 ( $^{192}\text{Ir}$ ) e espaçamento entre fontes de 2,5 mm (Figura 5).

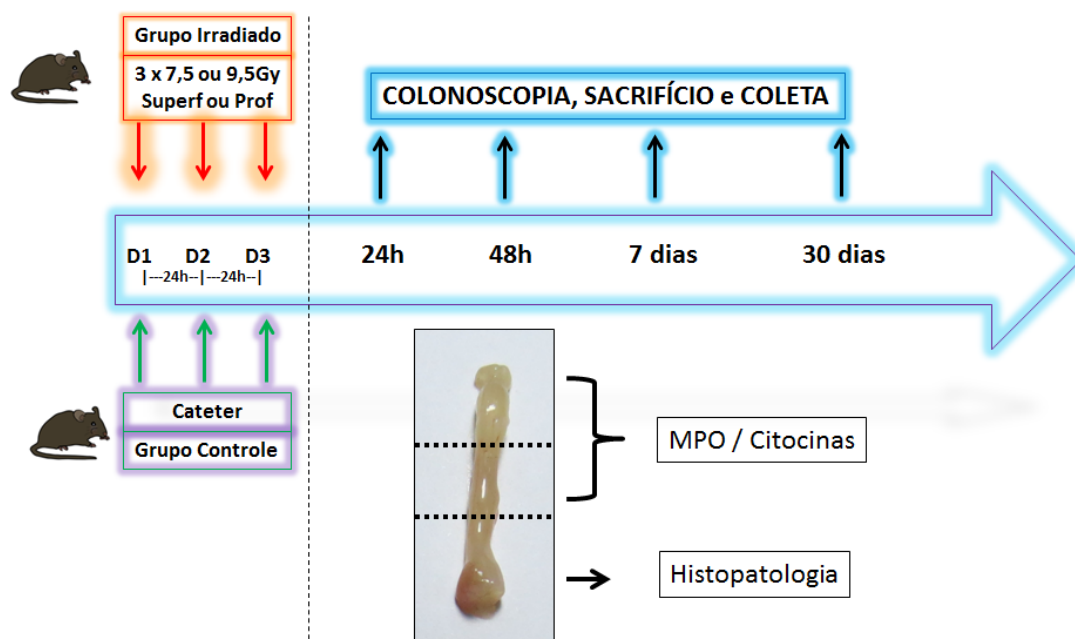


**Figura 5** - O sistema de braquiterapia de alta taxa de dose HDR Microselectron (Nucletron®).

Para o estudo de desenvolvimento do modelo utilizamos grupos com cinco a sete animais e testamos 2 esquemas diferentes de dose com 3 frações diárias e consecutivas de 7,5 ou 9,5 Gy e 2 profundidades diferentes de prescrição, quais sejam a 4,55 ou 2,0 mm do eixo central do aplicador, que representam respectivamente cerca de 3,0 e 0,5 mm de espessura de tecido englobado pela dose prescrita (Figura 6), e diferentes tempos entre o último dia de irradiação e a colonoscopia, eutanásia e coleta de amostras do reto: 24h, 48h, 7 dias ou 30 dias. O grupo controle, denominado “sham catéter” recebeu o mesmo aplicador cilíndrico endorretal pelo mesmo período de tempo do grupo experimental, contudo sem ativação da fonte de radiação (Figura 7). Do estudo de desenvolvimento do modelo escolhemos o esquema de irradiação utilizado na fase de modulação.



**Figura 6** - Esquema da anatomia da região pélvica do camundongo e inserção do aplicador de braquiterapia.



**Figura 7** - Esquema da irradiação, grupo controle e tempo para colonoscopia, eutanasia e coleta.

### 3.4 AVALIAÇÃO DE VARIAÇÃO PONDERAL E DIARREIA

A partir do primeiro dia após o término da irradiação os animais passaram a ser pesados diariamente, bem como passou-se a quantificar os escores de diarreia, considerando-se os seguintes escores (KURITA et al. 2000):

Escore 0 : fezes com aspecto normal

Escore 1: fezes levemente alteradas, pouco umedecidas

Escore 2: fezes úmidas com pouca sujidade perianal

Escore 3: fezes úmidas com bastante sujidade perianal

### 3.5 COLONOSCOPIA

A avaliação colonoscópica (Figura 7) foi realizada imediatamente antes da eutanásia, por um mesmo examinador, utilizando o equipamento de microendoscopia (TELE PACK VET X, Karl Storz®), o qual consiste de uma câmera, fonte de luz, monitor, cabo de iluminação com fibra ótica, endoscópio rígido (Karl Storz Hopkins®) com 30 graus de inclinação, diâmetro de 1,9 mm e comprimento de 10 cm, camisa endoscópica com 2,33 mm de diâmetro, com o animal sob anestesia com quetamina (50mg/kg) e xilazina (2mg/kg) ou tribromoetanol (solução a 2,5% 1mL / 100g de peso), todos por via IP.



**Figura 8** - A avaliação colonoscópica

Para a quantificação colonoscópica da retite, foram avaliados quatro parâmetros e adotados escores para cada alteração: achados perianais, 0 (sem achados), +1 (diarreia), +2 (sangue), +3 (prolapso retal); transparência da parede do reto, 0 (vasos de todos os calibres visíveis, sem espessamento), +1 (grandes e médios vasos visíveis), +2 (grandes vasos pouco visíveis), +3 (sem vasos visíveis, espessamento máximo); sangramento, 0 (sem sangramentos), +1 (sangramento devido o contato do endoscópio), +3 (sangramento espontâneo); lesões, 0 (sem lesões), +1 (edema em mucosa), +2 (erosões), +3 (úlceras). Os escores de retite variam de 0 a 12, sendo 0 a ausência de retite e 12 a retite máxima observada (KODANI et al. 2013).

### **3.6 AVALIAÇÃO DOS DANOS HISTOPATOLÓGICOS**

O terço distal do reto foi processado em blocos de parafina, sendo, em seguida, realizados cortes transversais do órgão e corados com a técnica do HE para posterior análise dos seguintes parâmetros de acordo com o escores de danos pela radiação (LANGBERG et al. 1992 – Anexo 2): espessamento de serosa, ulceração de mucosa, atipia epitelial, esclerose vascular, fibrose de parede intestinal, congestão linfática e retite cística profunda. Cada parâmetro foi graduado de zero (sem alterações ou normal) até 3 (alteração mais severa).

### **3.7 ENSAIO DE MIELOPEROXIDASE (MPO)**

A atividade de MPO, uma enzima encontrada nos grânulos azurófilos de neutrófilos, é utilizada como marcador da presença de neutrófilos no tecido inflamado, cuja presença foi determinada por método colorimétrico e a leitura final realizada em leitor de placas. Uma porção de intestino foi coletada e incubada em solução de HTAB 0,5% (Brometo de hexadeciltrimetilamonio), na proporção de 50mg de tecido por mL, e homogeneizada e centrifugada (1500 g/15 min a 4°C). O sobrenadante foi transferido para um eppendorf e novamente centrifugado (10 min) para melhor remoção de contaminantes. Após plaqueamento de 7 µL do sobrenadante (placas de 96 wells) 200 µL da solução de leitura (5 mg tetrametilbenzidina; 15 µL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1%; 3 mL tampão fosfato; 27 mL H<sub>2</sub>O) foram adicionados para leitura a 460nm (t<sub>0</sub>=0 min e t<sub>1</sub>=1 min). A mudança na absorbância foi obtida, plotada em curva padrão de neutrófilos e expressa em neutrófilos/mg de tecido (ALVES-FILHO et al. 2006).

### **3.8 DOSAGEM DE CITOCINAS IL-10, IL-6 E KC POR ELISA**

Amostras do reto foram retiradas para análise de citocinas e estocadas em freezer - 70° C até o momento do ensaio. O tecido coletado foi homogeneizado e processado como descrito por SAFIEH-GARABEDIAN et al. (1995). A detecção das citocinas foi determinada por ELISA, como descrito previamente (CUNHA et al. 1993). Resumidamente, placas para ELISA de 96 poços foram incubadas por 12h a 4° C com anticorpo anti-KC, anti-IL-6 ou anti-IL-10 murino (2 µg/mL). Após

bloqueio das placas, as amostras e a curva padrão foram adicionadas em duplicata em várias diluições e incubadas por 24h a 40°C. As placas foram então lavadas três vezes com solução tampão e incubadas com anticorpo monoclonal biotilado anti-KC, anti-IL-6 ou anti-IL-10 diluídos (1:1000 com o tampão de ensaio com BSA 1%). Após o período de incubação à temperatura ambiente por 1h, as placas foram lavadas e 50 µL do complexo HRP-avidina diluído 1:5000 adicionados. O reagente de cor tetrametilbenzidina (TMB, 50 µL) foi adicionado 15 min depois e as placas incubadas no escuro a 37° C por 15 a 20 min. A reação enzimática foi parada com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e a absorvância medida a 450 nm. O resultado foi expresso em pg/mg tecido.

### **3.9 IMUNOHISTOQUÍMICA PARA DETECÇÃO DE I-NOS, COX-2 E TNF- $\alpha$**

A imunohistoquímica para INOS2, COX2, TNF $\alpha$  foi realizada utilizando o método de estreptavidina-biotina-peroxidase (HSU e RAINE 1981). A seguir, os tecidos foram desidratados em álcool sendo, então, incluídas em parafina. Após este procedimento, foram feitos cortes seriados de 4 µm em micrótomo apropriado e colocados em lâminas de L-polilisina, apropriadas para a realização de imunohistoquímica. Os cortes foram desparafinizados, hidratados em xilol e álcool e imersos em tampão citrato 0,1 M (pH 6,0), sob aquecimento em banho maria, por 30 minutos para a recuperação antigênica a 95°C. Após o resfriamento, obtido em temperatura ambiente durante 20 minutos, foram feitas lavagens com solução tamponada de fosfato (PBS), intercaladas com o bloqueio da peroxidase endógena com solução de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 3% por 20 minutos. Em seguida foi feito bloqueio de

proteína com BSA 5%( albumina bovina) por 10 minutos. Os cortes foram incubados overnight com anticorpo primário de cabra anti-INOS (Santa Cruz), diluído 1:200, COX2 diluído 1:200, TNF $\alpha$  (Abcam) 1:100 diluído em antibody diluente. Após a lavagem em PBS, foi feita a incubação com secundário (de detecção) bitinilado IgG anti-cabra e anti-coelho diluído 1:400 (Santa Cruz), por 30 minutos. Depois de lavado, os cortes foram incubados com o complexo estreptoavidina peroxidase conjugada (complexo ABC Santa Cruz) por 30 minutos. Após nova lavagem com PBS, seguiu-se coloração com o cromógeno 3,3' diaminobenzidine-peróxido (DAB) seguida por contra-coloração com hematoxilina de Mayer. Por fim, foi realizada a desidratação das amostras e montagem das lâminas. Controles negativos foram processados simultaneamente como descrito acima, sendo que o anticorpo primário foi substituído por PBS-BSA 5%.

### **3.10 PROTOCOLOS DA FASE DE MODULAÇÃO**

- I Modulação do NO com Aminoguanidina: Camundongos C57BL/6 foram divididos em grupos (n = 5 a 7). Grupo “Sham total”: grupo controle sem qualquer intervenção ou manipulação; Grupo “Sham catéter”: introdução de aplicador (catéter) sem ativação da irradiação; Grupo “Radioterapia”: animais submetidos à braquiterapia; Grupo “RT + Aminoguanidina”: animais tratados com Aminoguanidina (50 mg/kg S.C. a cada 12h do 1º ao 9º dia da irradiação) e submetidos à braquiterapia.
- II Modulação do TNF- $\alpha$  com Infliximab: Camundongos C57BL/6 foram divididos em grupos (n = 5 a 7). Grupo “Sham total”: grupo controle sem



qualquer intervenção ou manipulação; Grupo “Sham catéter”: introdução de aplicador (catéter) sem ativação da irradiação; Grupo “Radioterapia”: animais submetidos à braquiterapia; Grupo “RT + Infliximab”: animais tratados com Infliximab (5mg/kg I.P. no 1º dia da irradiação) e submetidos à braquiterapia.

### **3.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA**

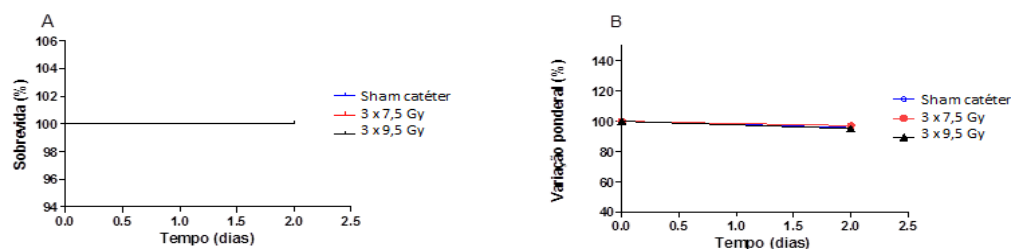
A análise estatística foi realizada com o software GraphPadPrism®, versão 5.0, empregando o teste t de Student para variáveis não pareadas ou o teste Mann-Whitney, conforme propriedade, respectivamente para dados paramétricos e não-paramétricos. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  E.P.M (variáveis com distribuição normal) ou pela mediana (mínimo-máximo) (variáveis sem distribuição normal), sendo as diferenças consideradas estatisticamente significativas quando  $p < 0,05$ .

## 4 RESULTADOS

### 4.1 O ESTUDO DE DESENVOLVIMENTO DO MODELO

#### 4.1.1 Análise dos resultados da irradiação com dose prescrita a 2,0 mm do eixo (dose superficial) e 24h após o término da irradiação

Comparando as irradiações com três frações de 7,5 Gy ou 9,5 Gy com o grupo controle (“sham cateter”) não foram observadas diferenças significativas ( $p>0,05$ ) quanto à sobrevida, variação ponderal (Figura 8) ou escores de diarreia (Tabela 1).



**Figura 9** - Comparações das curvas de sobrevida (A) e da variação de peso (B) 24h após irradiação superficial.

**Tabela 1** - Escores de diarreia 24h após irradiação superficial

| Grupo          | Escore    |
|----------------|-----------|
| “Sham Cateter” | 0 (0 – 0) |
| 3 x 7,5 Gy     | 0 (0 – 0) |
| 3 x 9,5 Gy     | 0 (0 – 0) |

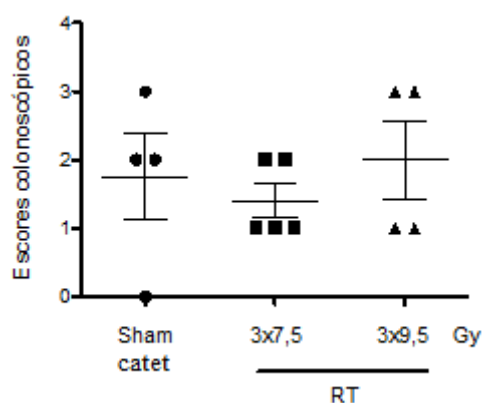
A tabela revela que não houve diferença entre os grupos estudados quanto ao grau de diarreia 24h após irradiação superficial.

Em relação aos danos histopatológicos (Tabela 2) ou escores colonoscópicos (Figura 9) não houve diferença ( $p>0,05$ ) entre os três grupos.

**Tabela 2** - Danos histopatológicos 24h após irradiação superficial

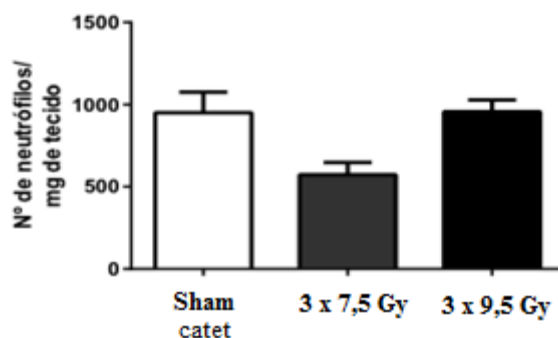
| Grupo          | Escore      |
|----------------|-------------|
| “Sham Cateter” | 2 (0 – 3)   |
| 3 x 7,5 Gy     | 2,5 (1 – 5) |
| 3 x 9,5 Gy     | 3,5 (1 – 5) |

A tabela evidencia não haver diferença entre os grupos estudados quanto aos escores de danos histopatológicos 24h após irradiação superficial.



**Figura 10** - Comparações dos escores colonoscópicos 24h após irradiação superficial.

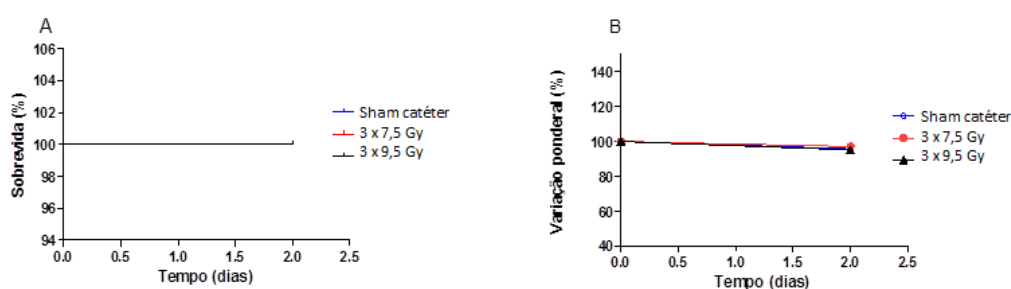
Quanto à dosagem de MPO, não houve diferença entre os três grupos estudados ( $p>0,05$ , Figura 11).



**Figura 11** - Dosagem de MPO dose superficial 24h após irradiação.

#### 4.1.2 Análise dos resultados da irradiação com dose prescrita a 2,0 mm do eixo (dose superficial) e 48h após o término da irradiação

Não houve diferença entre sobrevida ou variação ponderal (Figura 12), nem quanto aos escores de diarreia (Tabela 3) entre os grupos avaliados ( $p>0,05$ ).



**Figura 12** - Comparações das curvas de sobrevida (A) e da variação de peso (B) 48h após irradiação superficial.

**Tabela 3** - Escores de diarreia 48h após irradiação superficial

| <b>Grupo</b>   | <b>Escore</b> |
|----------------|---------------|
| “Sham Cateter” | 0 (0 – 1)     |
| 3 x 7,5 Gy     | 0 (0 – 1)     |
| 3 x 9,5 Gy     | 0 (0 – 1)     |

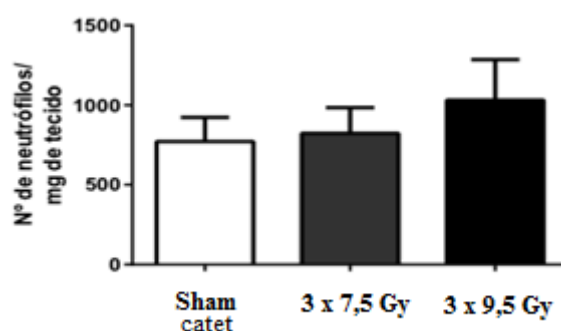
A tabela revela que não houve diferença entre os grupos estudados quanto ao grau de diarreia 48h após irradiação superficial.

Em relação aos danos histopatológicos (Tabela 4) ou dosagem de MPO (Figura 13) não houve diferença entre os três grupos ( $p>0,05$ ).

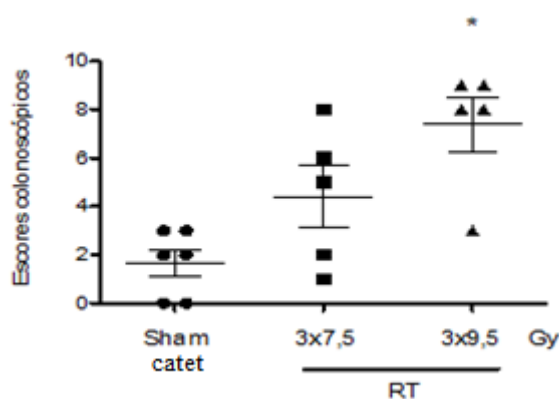
**Tabela 4** - Danos histopatológicos 48h após irradiação superficial

| <b>Grupo</b>   | <b>Escore</b> |
|----------------|---------------|
| “Sham Cateter” | 3,5 (1 – 6)   |
| 3 x 7,5 Gy     | 3 (2 – 6)     |
| 3 x 9,5 Gy     | 5 (2 – 8)     |

A tabela evidencia não haver diferença entre os grupos estudados quanto aos escores de danos histopatológicos 48h após irradiação superficial.

**Figura 13** - Comparação das dosagens de MPO entre o grupo controle e os grupos irradiados com dose superficial de 3 x 7,5 Gy e 3 x 9,5 Gy 48h após a exposição.

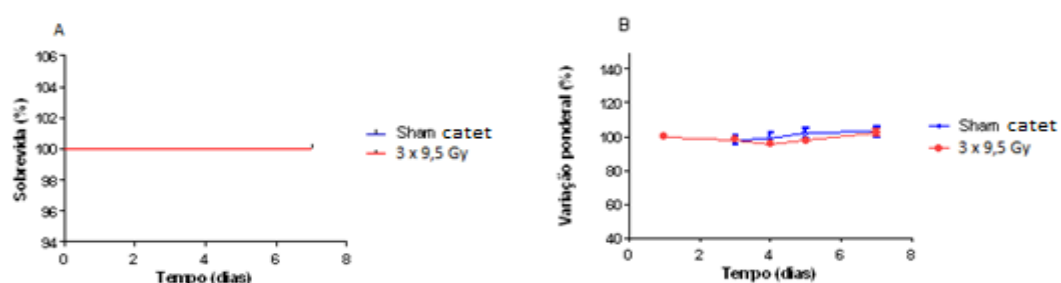
Os escores colonoscópicos foram maiores ( $p<0,05$ ) no grupo irradiado com 3 x 9,5 Gy quando comparado aos demais (3 x 7,5 Gy e “sham catéter”) (Figura 14).



**Figura 14** - Comparações dos escores colonoscópicos 48h após irradiação superficial.

#### 4.1.3 Análise dos resultados da irradiação com dose prescrita a 2,0 mm do eixo (dose superficial) e sete dias após o término da irradiação

Foi testado um regime de dose de 3 x 9,5 Gy. Não houve diferença entre sobrevida ou variação ponderal (Figura 15), bem como quanto aos escores de diarreia (Tabela 5) quando comparado ao grupo sham cateter.



**Figura 15** - Comparações das curvas de sobrevida (A) e da variação de peso (B) sete dias após irradiação superficial.

**Tabela 5** - Escores de diarreia sete dias após irradiação superficial

| <b>Grupo</b>   | <b>Escore</b> |
|----------------|---------------|
| “Sham Cateter” | 0 (0 – 0)     |
| 3 x 9,5 Gy     | 0(0 – 0)      |

A tabela revela que não houve diferença entre os grupos estudados quanto ao grau de diarreia sete dias após irradiação superficial.

Foram observados maiores escores colonoscópicos (Tabela 6) e de danos histopatológicos (Tabela 7) no grupo irradiado com dose superficial de 3 x 9,5 Gy quando comparado ao grupo sham cateter ( $p < 0,05$ ).

**Tabela 6** - Escores colonoscópicos sete dias após irradiação superficial

| <b>Grupo</b>   | <b>Escore</b> |
|----------------|---------------|
| “Sham Cateter” | 0 (0 – 2)     |
| 3 x 9,5 Gy     | 5 (2 – 9)**   |

A tabela evidencia maior dano colonoscópico sete dias após irradiação superficial com dose de 3 x 9,5 Gy quando comparado ao grupo controle.

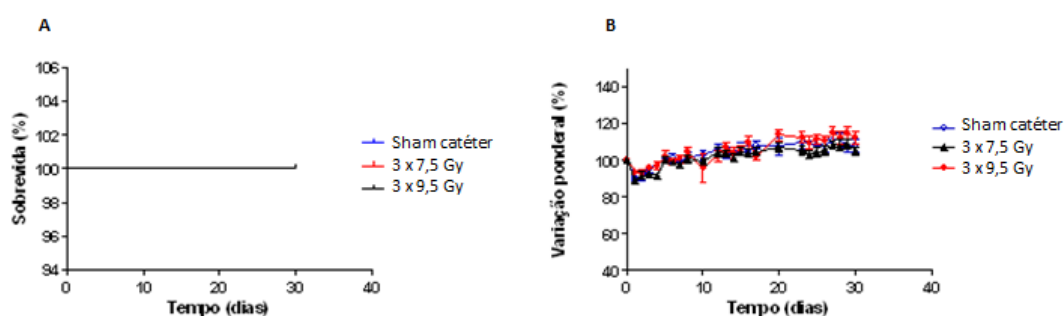
**Tabela 7** - Danos histopatológicos sete dias após irradiação superficial

| <b>Grupo</b>   | <b>Escore</b> |
|----------------|---------------|
| “Sham Cateter” | 0 (0 – 3)     |
| 3 x 9,5 Gy     | 5 (0 – 8)**   |

A tabela evidencia maior dano histopatológico sete dias após irradiação superficial com dose de 3 x 9,5 Gy quando comparado ao grupo controle.

#### 4.1.4 Análise dos resultados da irradiação com dose prescrita a 2,0 mm do eixo (dose superficial) e 30 dias após o término da irradiação

Analizando dois esquemas de 3 frações de 7,5 ou 9,5 Gy, foi observado que não houve diferença ( $p>0,05$ ) entre sobrevida ou variação ponderal (Figura 16), bem como quanto aos escores de diarreia (Tabela 8), entre os grupos experimentais e o controle.



**Figura 16** - Comparações das curvas de sobrevida. (A) e da variação de peso (B) 30 dias após irradiação superficial.

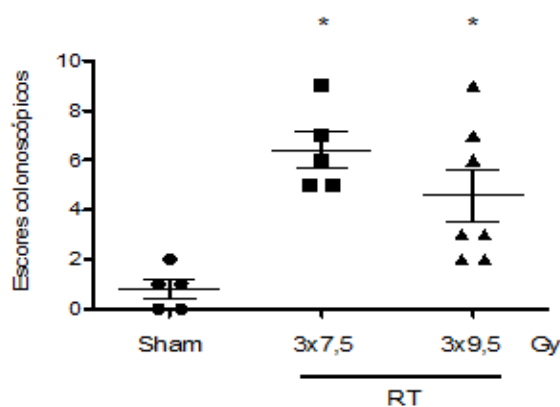
**Tabela 8** - Escores de diarreia 30 dias após irradiação superficial

|    | Sham catéter | 7,5Gy  | 9,5Gy  |
|----|--------------|--------|--------|
| D2 | 0(0-1)       | 0(0-1) | 0(0-1) |
| D3 | 0(0-0)       | 0(0-0) | 0(0-0) |
| D4 | 0(0-0)       | 0(0-0) | 0(0-0) |
| D6 | 1(0-1)       | 0(0-1) | 1(0-2) |
| D7 | 0(0-0)       | 1(0-1) | 0(0-1) |
| D8 | 0(0-0)       | 0(0-2) | 0(0-2) |
| D9 | 0(0-1)       | 0(0-1) | 0(0-1) |

A tabela revela que não houve diferença entre os grupos estudados quanto ao grau de diarreia 30 dias após irradiação superficial.

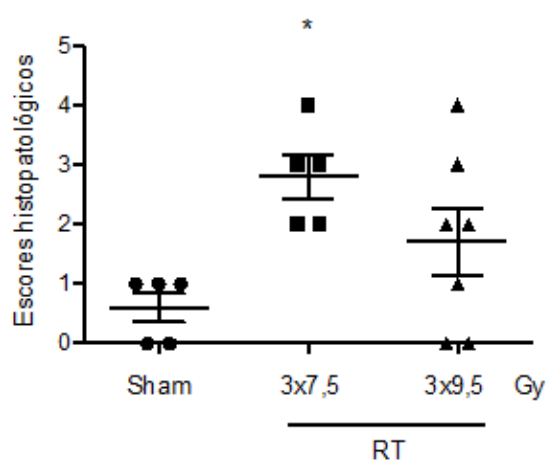


A Figura 16 mostra que os grupos irradiados com doses de 3 x 7,5 Gy e 3 x 9,5 Gy apresentaram maiores escores colonoscópicos quando comparados ao controle.



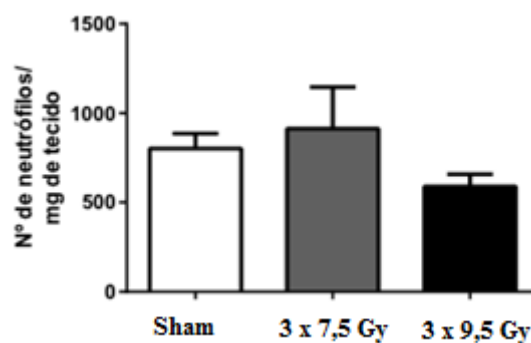
**Figura 17** - Comparações dos escores colonoscópicos 30 dias após irradiação superficial.

Dentre os grupos irradiados, foram observados maiores danos histopatológicos apenas no grupo com dose de 3 x 7,5 Gy se comparado ao controle, o que está ilustrado na Figura 18.



**Figura 18** - Comparações dos danos histopatológicos 30 dias após irradiação superficial.

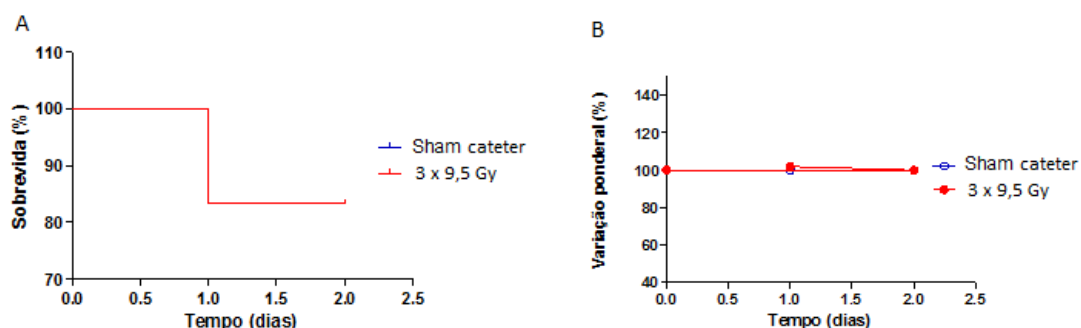
A Figura 19 ilustra a comparação das dosagens de MPO entre o grupo controle e os grupos irradiados com dose superficial de 3 x 7,5 Gy e 3 x 9,5 Gy, não sendo observada diferença ( $p>0,05$ ).



**Figura 19** - Comparação das dosagens de MPO entre o grupo controle e os grupos irradiados com dose superficial de 3 x 7,5 Gy e 3 x 9,5 Gy 30 dias após a exposição.

#### 4.1.5 Análise dos resultados da irradiação com dose prescrita a 4,55 mm do eixo (dose profunda) e 24 horas após o término da irradiação

Não houve diferença entre o grupo controle e o grupo irradiado com dose de 3 x 9,5 Gy quanto à sobrevivência e variação ponderal (Figura 20), bem como em relação aos escores de diarreia (Tabela 9) e colonoscópicos (Tabela 10).



**Figura 20** - Comparações das curvas de sobrevivência. (A) e da variação de peso (B) 24 horas após irradiação com dose profunda.

**Tabela 9** - Escores de diarreia 24 horas após irradiação com dose profunda

| <b>Grupo</b>   | <b>Escore</b> |
|----------------|---------------|
| “Sham Cateter” | 0 (0 – 0)     |
| 3 x 9,5 Gy     | 0 (0 – 0)     |

A tabela revela que não houve diferença entre os grupos estudados quanto ao grau de diarreia 24h após irradiação profunda.

**Tabela 10** - Escores colonoscópicos 24 horas após irradiação com dose profunda

| <b>Grupo</b>   | <b>Escore</b> |
|----------------|---------------|
| “Sham Cateter” | 0 (0 – 1)     |
| 3 x 9,5 Gy     | 1 (0 – 5)     |

A tabela revela que não houve diferença entre os grupos estudados quanto aos escores colonoscópicos 24h após irradiação profunda.

Em relação aos danos histopatológicos, foram observados maiores escores no grupo irradiado com dose de 3 x 9,5 Gy quando comparado ao controle ( $p < 0,05$ , Tabela 11).

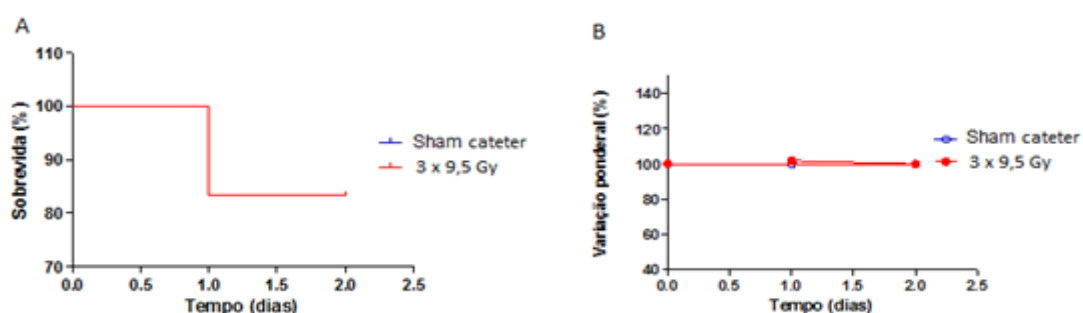
**Tabela 11** - Danos histopatológicos 24 horas após irradiação profunda

| <b>Grupo</b>   | <b>Escore</b> |
|----------------|---------------|
| “Sham Cateter” | 0 (0 – 1)     |
| 3 x 9,5 Gy     | 5 (1 – 9)**   |

A tabela evidencia maior dano histopatológico 24h após irradiação profunda com dose de 3 x 9,5 Gy quando comparado ao grupo controle.

#### 4.1.6 Análise dos resultados da irradiação com dose prescrita a 4,55 mm do eixo (dose profunda) e 48 horas após o término da irradiação

Não houve diferença entre o grupo controle e o grupo irradiado com dose de 3 x 9,5 Gy ( $p>0,05$ ) quanto à sobrevida e variação ponderal (Figura 20), bem como em relação aos escores de diarreia (Tabela 12) e colonoscópicos (Tabela 13).



**Figura 21** - Comparações das curvas de sobrevida. (A) e da variação de peso (B) 48 horas após irradiação profunda.

**Tabela 12** - Escores de diarreia 48 horas após irradiação profunda

| Grupo          | Escore    |
|----------------|-----------|
| “Sham Cateter” | 0 (0 – 0) |
| 3 x 9,5 Gy     | 0 (0 – 1) |

A tabela revela que não houve diferença entre os grupos estudados quanto ao grau de diarreia 48h após irradiação profunda.

**Tabela 13** - Escores colonoscópicos 48 horas após irradiação profunda

| Grupo          | Escore      |
|----------------|-------------|
| “Sham Cateter” | 0 (0 – 1)   |
| 3 x 9,5 Gy     | 0,5 (0 – 2) |

A tabela revela que não houve diferença entre os grupos estudados quanto aos escores colonoscópicos 48h após irradiação profunda.

Em relação aos danos histopatológicos, foram observados maiores escores no grupo irradiado com dose de 3 x 9,5 Gy quando comparado ao controle ( $p < 0,05$ , Tabela 14).

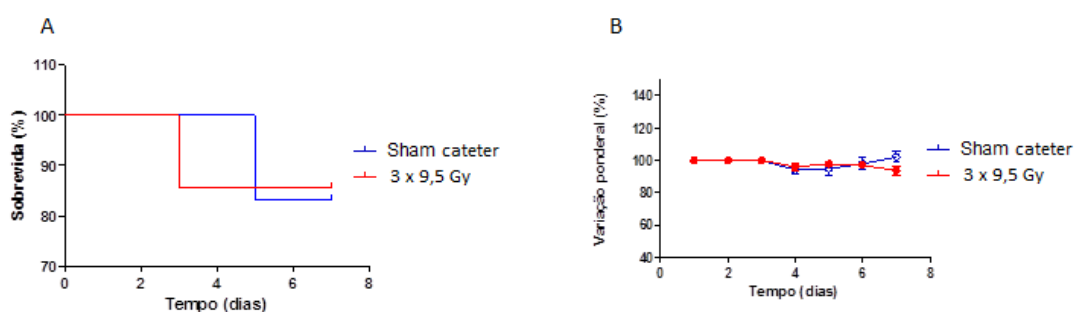
**Tabela 14** - Danos histopatológicos 48 horas após irradiação profunda

| <b>Grupo</b>   | <b>Escore</b> |
|----------------|---------------|
| “Sham Cateter” | 0 (0 – 4)     |
| 3 x 9,5 Gy     | 4,5 (3 – 6)** |

A tabela evidencia maior dano histopatológico 48h após irradiação profunda com dose de 3 x 9,5 Gy quando comparado ao grupo controle.

#### **4.1.7 Análise dos resultados da irradiação com dose prescrita a 4,55 mm do eixo (dose profunda) e sete dias após o término da irradiação**

Não houve diferença ( $p > 0,05$ ) entre o grupo controle e o grupo irradiado com dose de 3 x 9,5 Gy quanto à sobrevida e variação ponderal (Figura 22), bem como em relação aos escores de diarreia (Tabela 15).



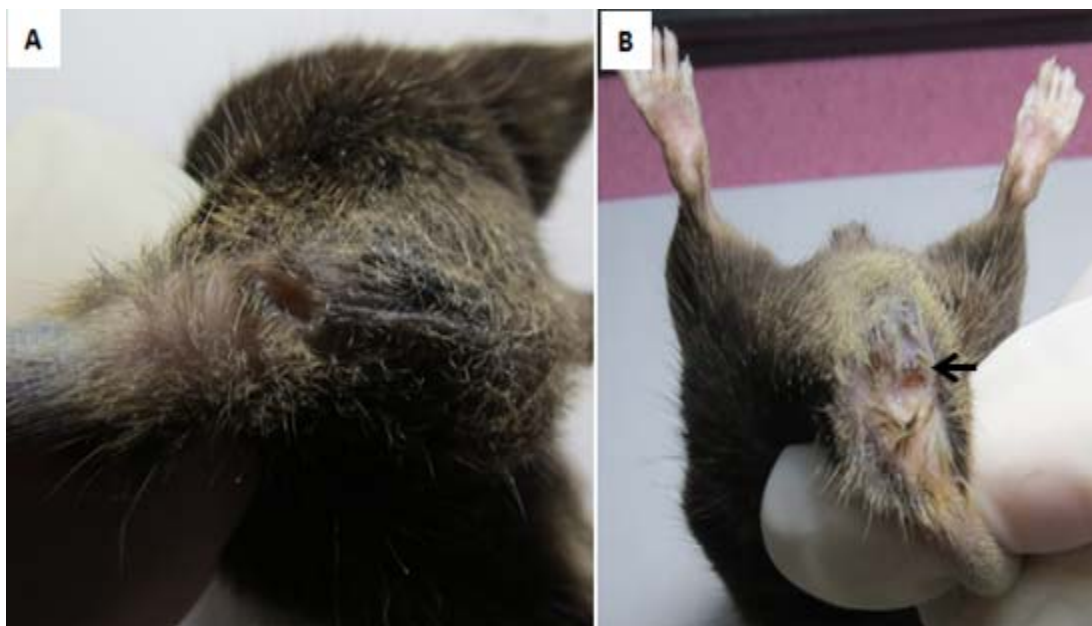
**Figura 22** - Comparações das curvas de sobrevida (A) e da variação de peso (B) 48 horas após irradiação profunda.

**Tabela 15** - Escores de diarreia sete dias após irradiação profunda

| Grupo          | Escore    |
|----------------|-----------|
| “Sham Cateter” | 0 (0 – 1) |
| 3 x 9,5 Gy     | 0 (0 – 1) |

A tabela revela que não houve diferença entre os grupos estudados quanto ao grau de diarreia sete dias após irradiação profunda.

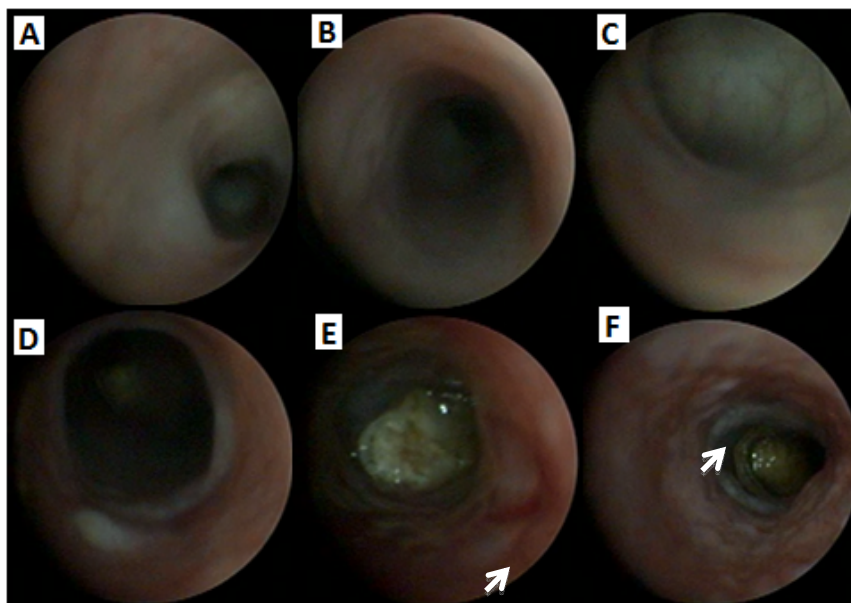
No sétimo dia após o término da exposição, que correspondia ao momento da eutanásia, eram nítidas alterações perineais nos animais do grupo experimental (grupo irradiado), caracterizadas por alopecia úmida da região e por vezes lesões crostosas (Figura 23).



**Legenda:** A - Períneo normal do animal do grupo controle. B - Períneo do animal irradiado com alopecia e umidade por provável exsudação, com pequena lesão em crosta (seta).

**Figura 23** - As alterações perineais sete dias após a irradiação com dose profunda de 3 x 9,5 Gy.

Em relação aos achados colonoscópicos foi observado maior dano no grupo irradiado, o que está ilustrado na Figura 25, resultando numa maior contagem de escores para este grupo quando comparado ao controle ( $p < 0,05$ , Tabela 16).



**Legenda:** (A, B e C) e no grupo irradiado com dose de 3 x 9,5 Gy (D, E e F). No grupo controle se observam mucosas normais e no grupo irradiado é nítida a ocorrência de placas esbranquiçadas ou eritematosas (seta branca).

**Figura 24** - A colonoscopia sete dias após dose profunda em animal controle.

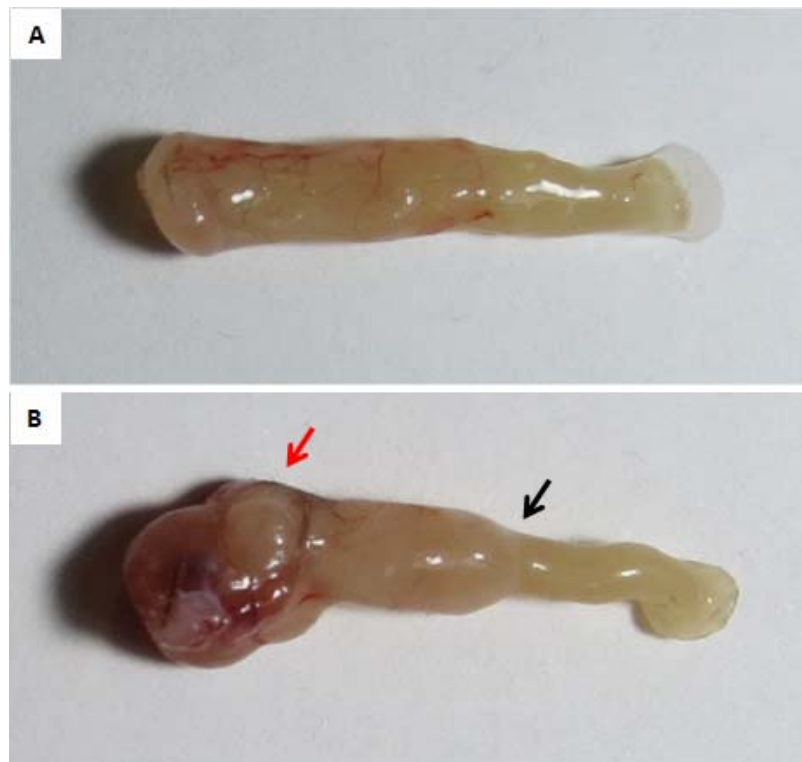
**Tabela 16** - Escores colonoscópicos sete dias após irradiação profunda

| Grupo          | Escore        |
|----------------|---------------|
| “Sham Cateter” | 0 (0 – 0)     |
| 3 x 9,5 Gy     | 9 (7 – 12)*** |

A tabela evidencia maior dano colonoscópico sete dias após irradiação profunda com dose de 3 x 9,5 Gy quando comparado ao grupo controle.

Os retos excisados do grupo irradiado normalmente se apresentavam dismórficos, com pouco brilho e de consistência endurecida (Figura 25).

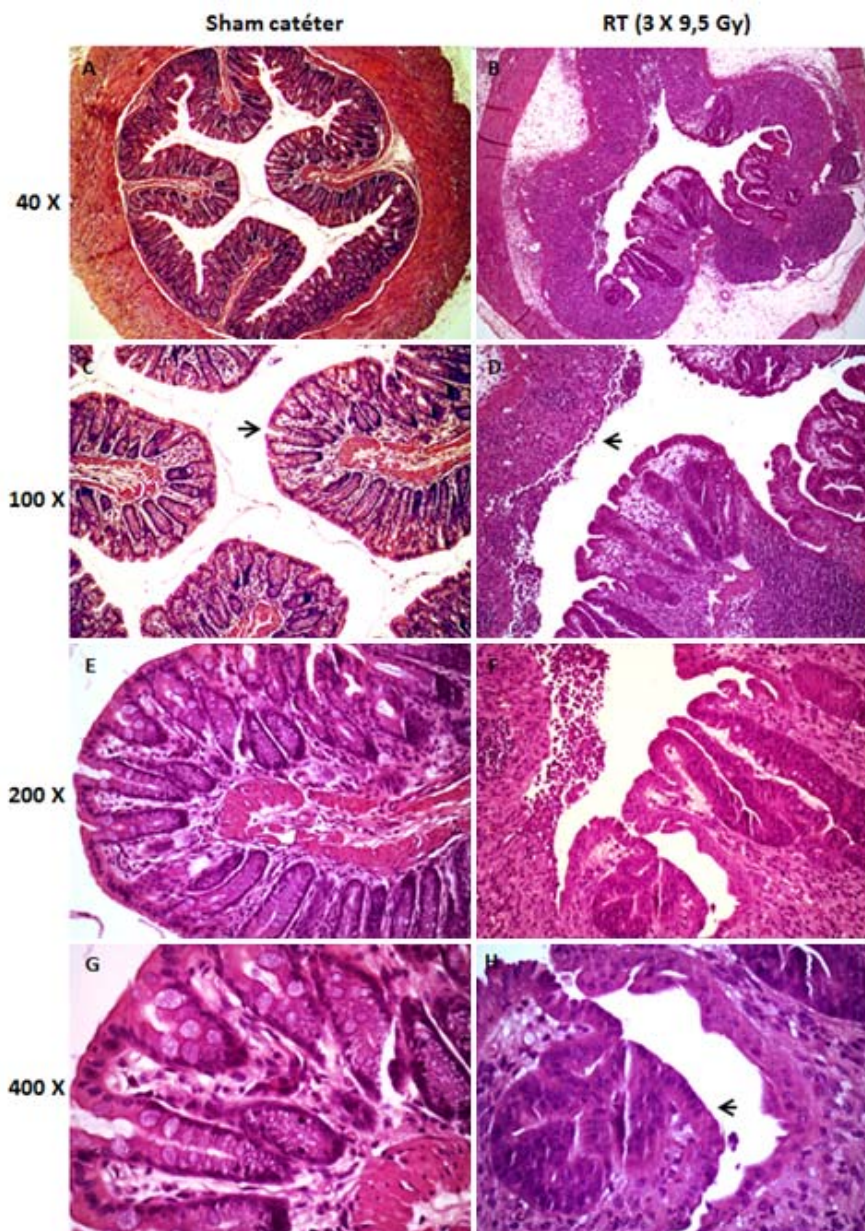




**Legenda:** A – amostra de um animal do grupo controle. B – O reto excisado de um animal irradiado, com distorção e de aspecto opaco, com edema do órgão (seta vermelha) e estenose (seta negra).

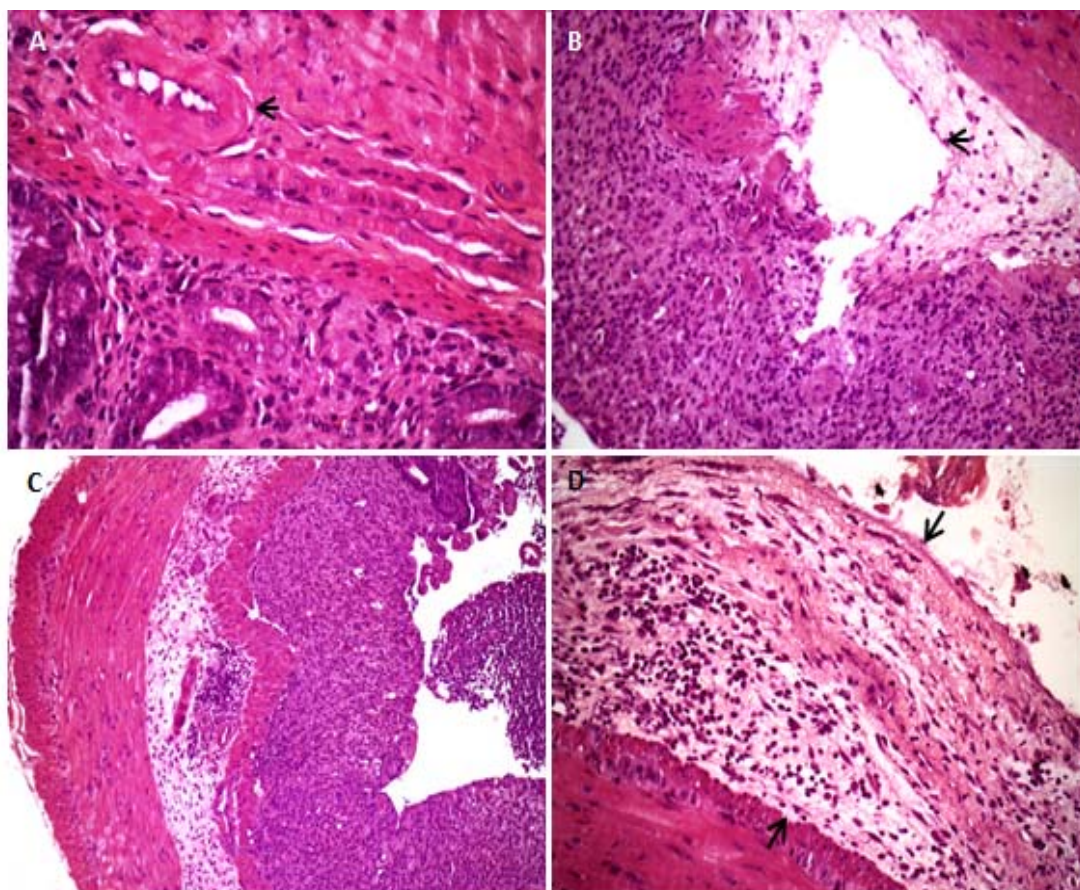
**Figura 25** - As alterações macroscópicas do reto sete dias após a irradiação com dose profunda de 3 x 9,5 Gy.

A Figura 25 ilustra os achados histopatológicos (HE) estudados em diferentes aumentos dos grupos. Os detalhes dos danos histopatológicos como estenose vascular, dilatação de vaso linfático, ulceração de mucosa e espessamento de serosa estão ilustrados na Figura 26.



**Legenda:** SHAM CATÉTER: A - Corte histológico de mucosa retal histologicamente normal. C - Detalhe de A. E - Maior magnitude da área apontada em C, onde já se observam células caliciformes. G - Detalhe de E. GRUPO IRRADIADO: B - Corte histológico de mucosa retal irradiada. Observa-se nítido edema na submucosa. D - Detalhe de B. Chama atenção a perda de estruturas glandulares à esquerda da luz (seta). F - Detalhe de D. Observar a perda de glândulas à esquerda e epitélio regenerativo glandular à direita. H - Regeneração epitelial glandular com atipias (seta).

**Figura 26** - A comparação dos danos histopatológicos (HE) entre o grupo controle (sham catéter) e o grupo irradiado com dose profunda de 3 x 9,5 Gy após sete dias.



**Figura 27** - Os danos histopatológicos em detalhe (HE), sete dias após dose profunda de 3 x 9,5 Gy.

Os escores de danos histopatológicos foram maiores no grupo irradiado que no grupo controle (Tabela 17).

**Tabela 17** - Danos histopatológicos sete dias após irradiação profunda

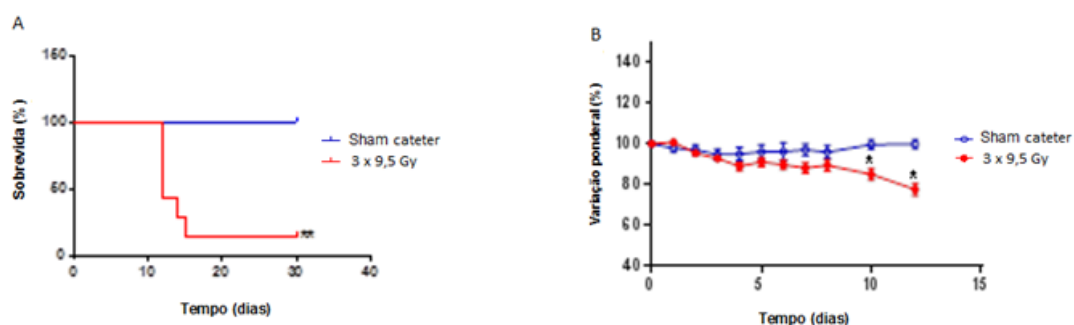
| <b>Grupo</b>   | <b>Escore</b>   |
|----------------|-----------------|
| “Sham Cateter” | 1 (0 – 5)       |
| 3 x 9,5 Gy     | 11,5 (8 – 12)** |



A tabela evidencia maior dano histopatológico sete dias após irradiação profunda com dose de 3 x 9,5 Gy quando comparado ao grupo controle.

#### 4.1.8 Análise dos resultados da irradiação com dose prescrita a 4,55 mm do eixo (dose profunda) e 30 dias após o término da irradiação

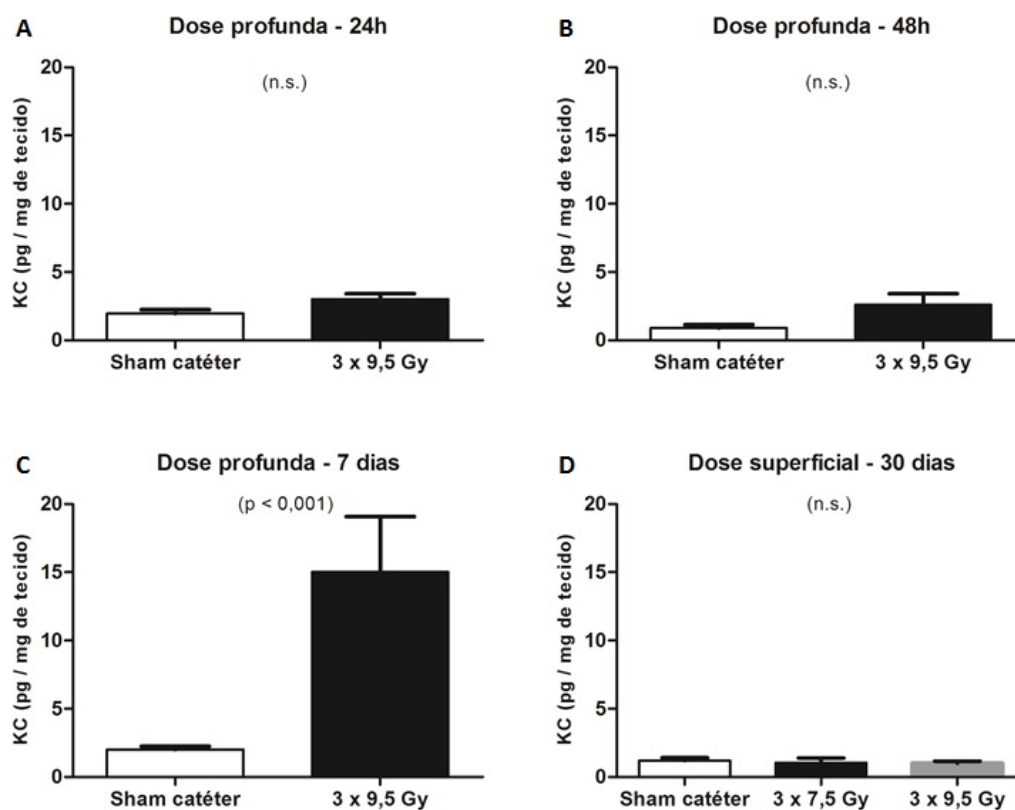
Apenas dois animais sobreviveram até o momento da coleta dentre aqueles irradiados com dose de 3 x 9,5 Gy, tendo havido maior perda ponderal neste grupo quando comparado ao controle (Figura 28). Não houve, portanto, número suficiente para análise estatística quanto aos achados colonoscópicos ou de danos histopatológicos.



**Figura 28** - Comparações das curvas de sobrevida (A) e da variação de peso (B) 30 dias após irradiação profunda.

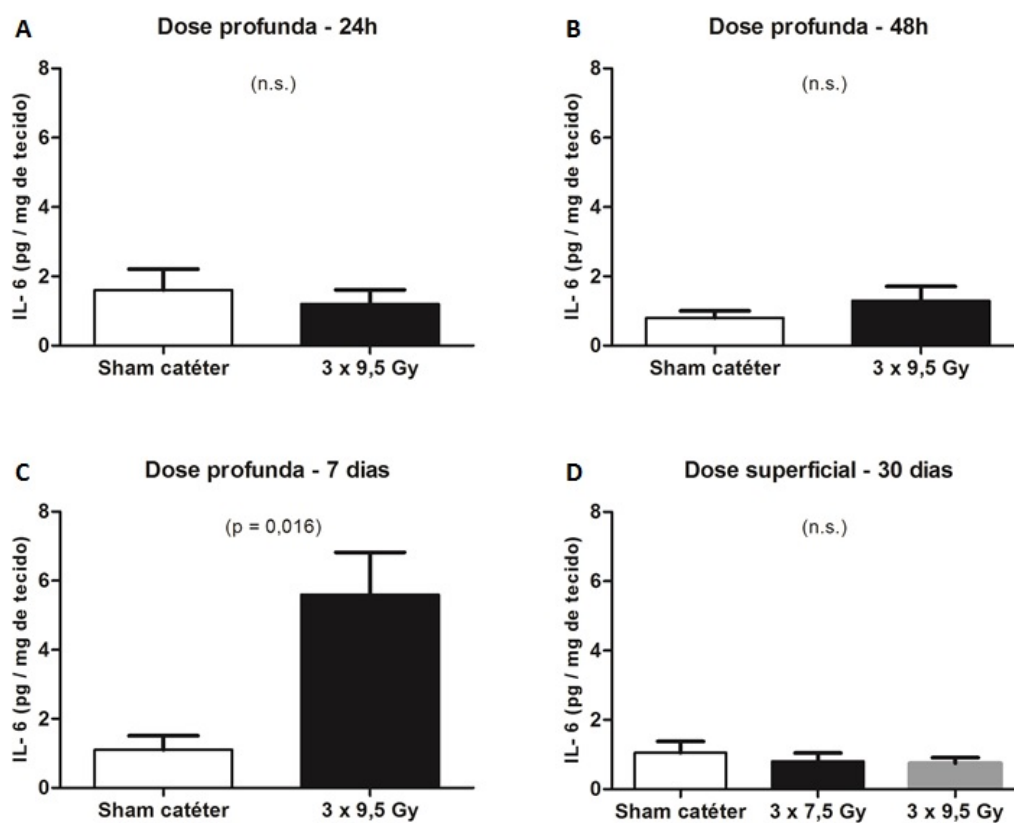
#### 4.1.9 Dosagens das citocinas KC, IL-6 e IL-10

Dentre os grupos experimentais pesquisados quanto à dosagem de KC, observou-se um aumento significativo deste mediador quando comparado ao grupo controle após sete dias de irradiação com dose profunda de 3 x 9,5 Gy ( $p < 0,05$ , Figura 28).



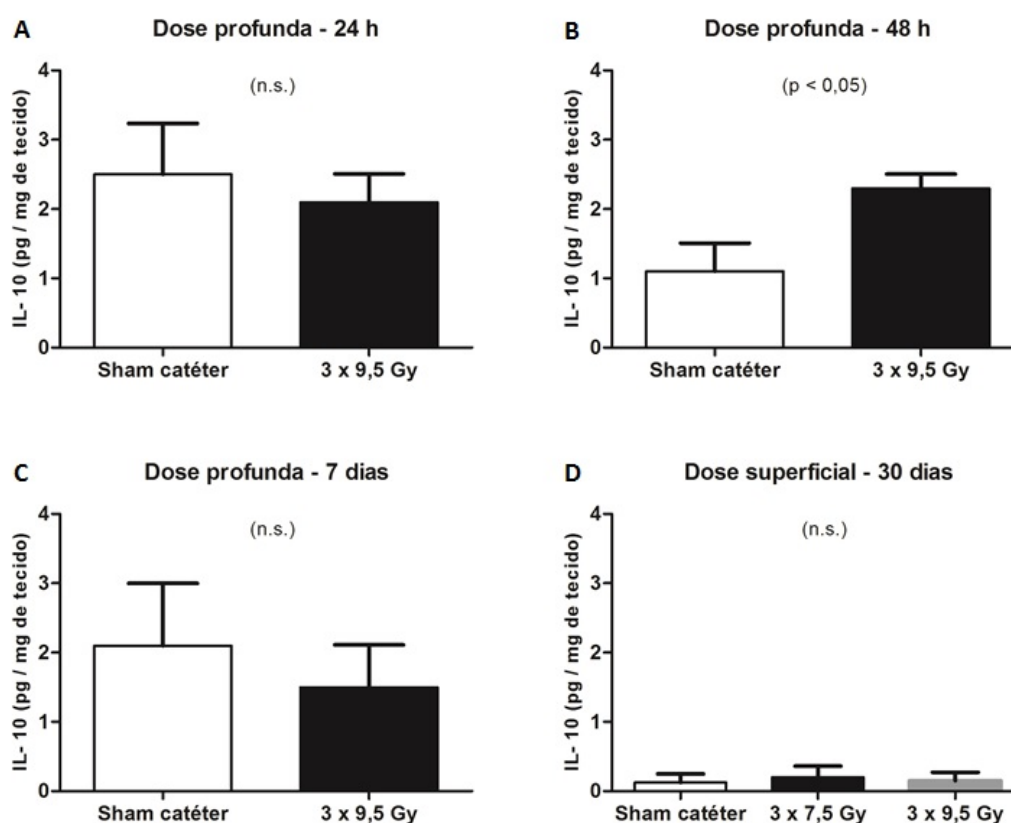
**Figura 29** - Dosagem de KC do estudo de desenvolvimento do modelo.

Em relação à dosagem de IL-6, apenas o grupo irradiado com dose profunda de 3 x 9,5 Gy no tempo de sete dias demonstrou aumento em relação ao grupo controle (Figura 30).



**Figura 30** - Dosagem de IL-6 do estudo de desenvolvimento do modelo.

Em relação à dosagem de IL-10, houve um aumento 48h após a irradiação com dose profunda de 3 x 9,5 Gy quando comparado ao grupo controle (Figura 31).

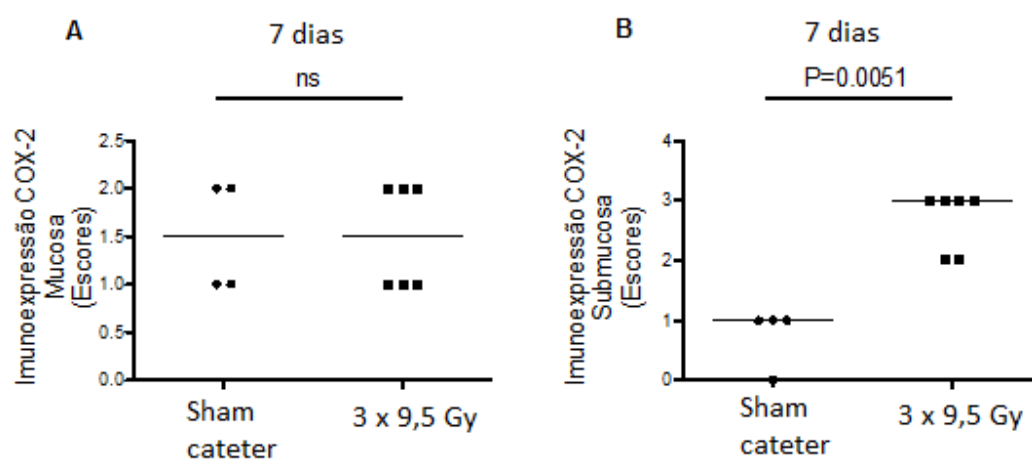


**Figura 31** - Dosagem de IL-10 do estudo de desenvolvimento do modelo.

Um aumento de IL-10 foi observado 48h após exposição com uma dose profunda de 3 x 9,5 Gy quando comparado ao controle (C).

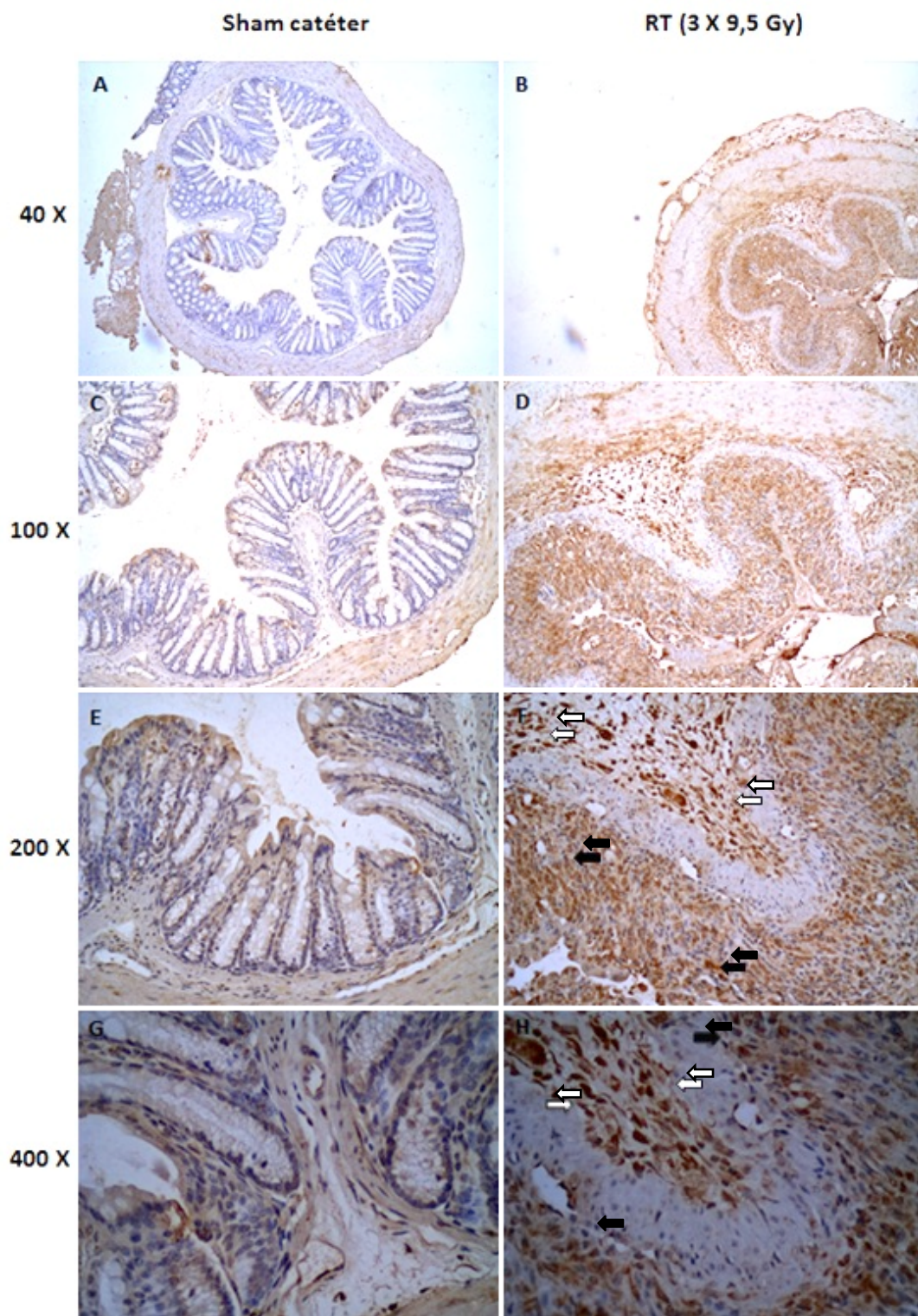
#### 4.1.10 Imunohistoquímica para COX-2, TNF- $\alpha$ e i-NOS

Quanto à IHQ para COX-2 houve maior contagem de escores na submucosa sete dias após irradiação com dose profunda de 3 x 9,5 Gy quando comparado ao grupo controle (Figura 32). A Figura 33 ilustra a diferenças de expressão do grupo experimental versus o grupo controle em diferentes aumentos.



**Figura 32** - Análise estatística dos escores de imunohistoquímica para COX-2, 7 dias após dose profunda de 3 x 9,5 Gy. Avaliação na mucosa (A) e submucosa (B).

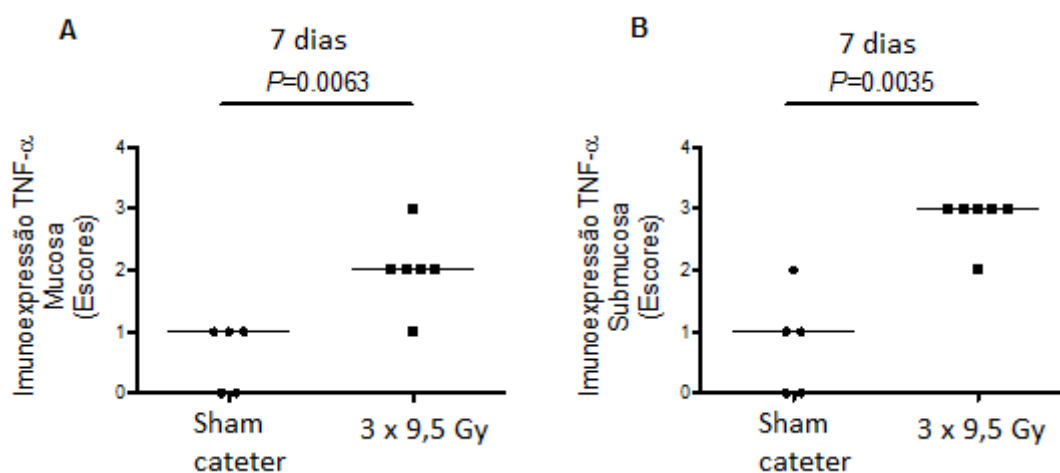




**Figura 33** - A IHC para COX-2 sete dias após dose profunda de 3 x 9,5 Gy.

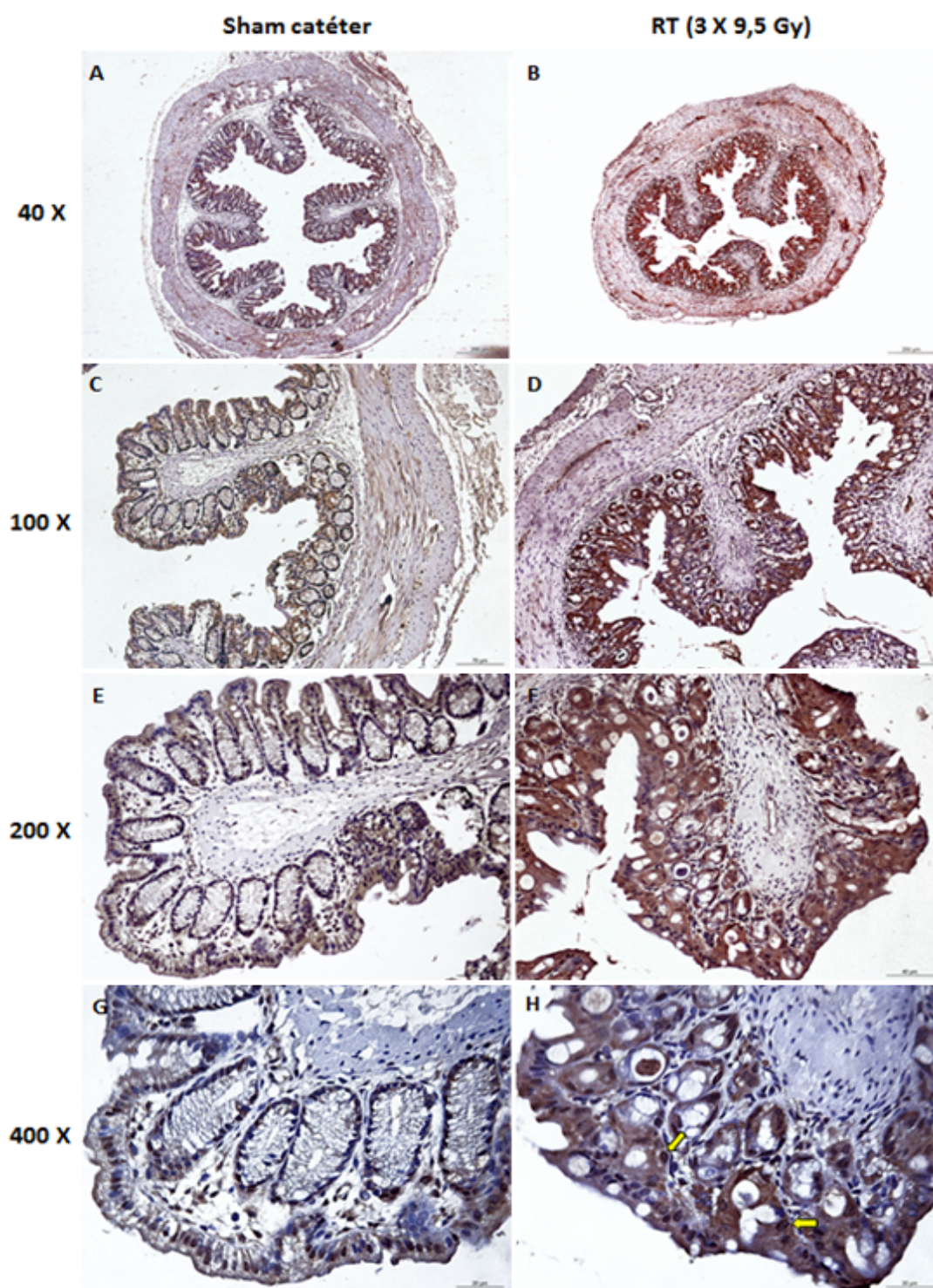
**Legenda:** A, C, E e G: Sham catéter: ausência de imunomarcagem na mucosa e parede intestinal, exceto leve coloração de fundo (40 a 400X) B, D, F e H: RT (3 X 9, 5 Gy): coloração acentuada em células inflamatórias da mucosa (coloração marrom, setas negras) e submucosa (setas brancas) mais evidente em 200X e 400X.

A Figura 34 mostra uma maior contagem dos escores da IHQ para TNF- $\alpha$  no grupo experimental (sete dias após dose profunda de 3 x 9,5 Gy) comparado ao grupo controle. A Figura 35 ilustra as diferenças da expressão nos dois grupos em diferentes aumentos.



**Figura 34** - Análise estatística dos escores de imunohistoquímica para TNF- $\alpha$ , sete dias após dose profunda de 3 x 9,5 Gy. Avaliação na mucosa (A) e submucosa (B).

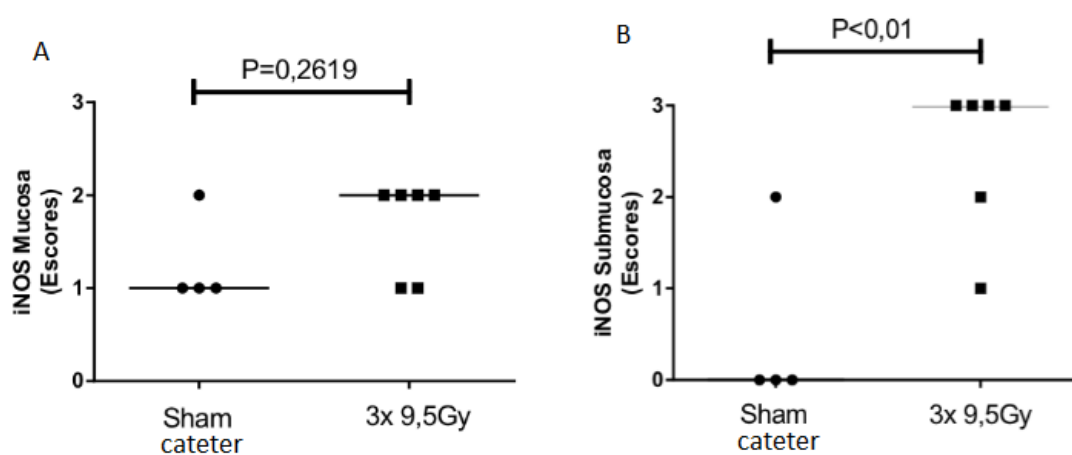




**Figura 35** - A IHQ para TNF- $\alpha$  sete dias após dose profunda de 3 x 9,5 Gy.

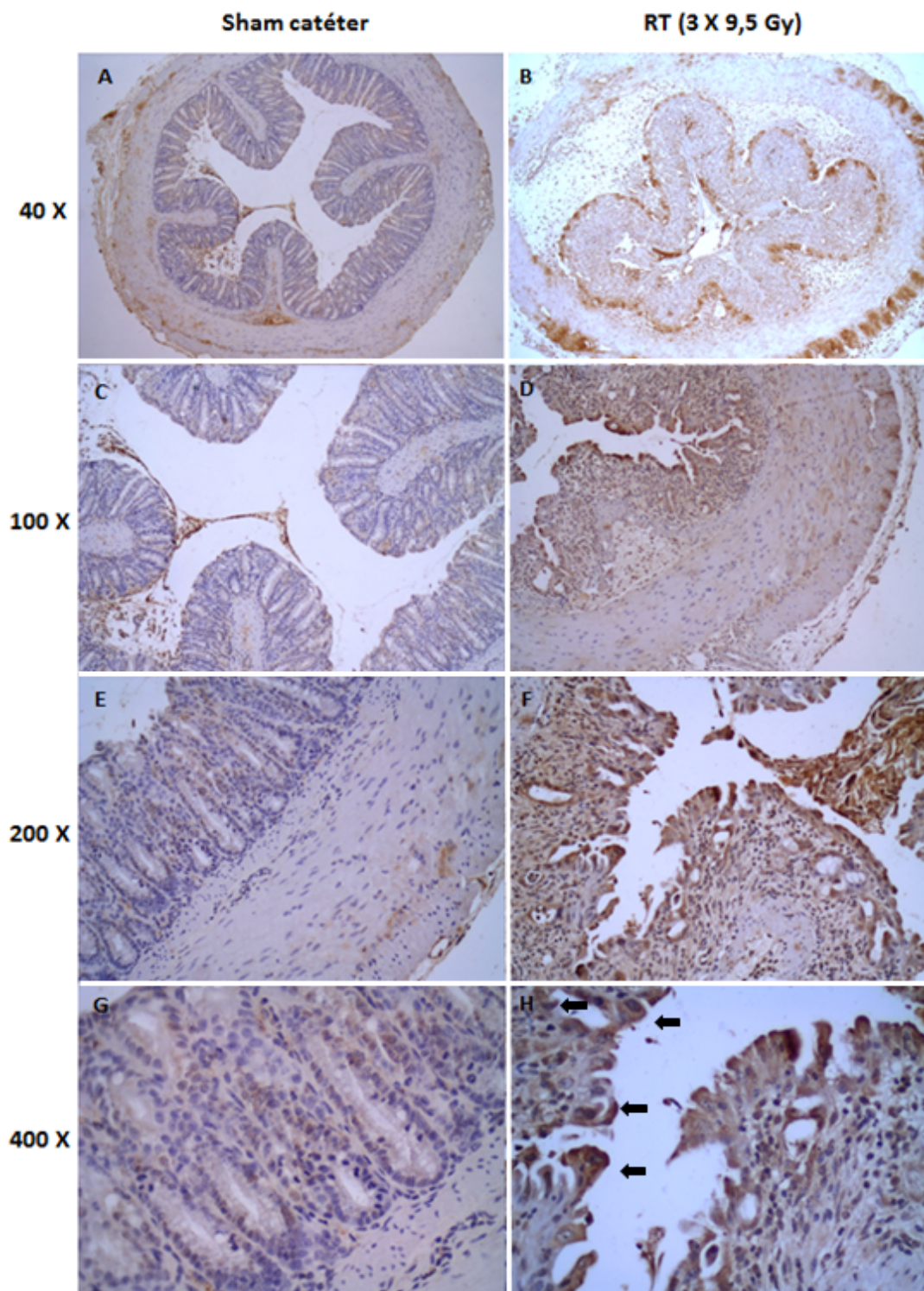
**Legenda:** A, C, E e G: Sham catéter: menor imunomarcagem na mucosa e parede intestinal e leve coloração de fundo (40 a 400X) B, D, F e H: RT (3 X 9,5 Gy): coloração acentuada em células inflamatórias da mucosa (coloração marrom, setas amarelas) mais evidente em 400X.

Na IHQ para i-NOS, houve maior expressão na mucosa e submucosa do grupo irradiado com dose profunda de 3 x 9,5 Gy e avaliados sete dias após a exposição (Figura 36), o que está ilustrado em diferentes aumentos na Figura 37.



**Figura 36** - Análise estatística dos escores de imunohistoquímica para iNOS, sete dias após dose profunda de 3 x 9,5 Gy. Avaliação na mucosa (A) e submucosa (B).





**Figura 37** - A IHQ para i-NOS sete dias após dose profunda de 3 x 9,5 Gy.

**Legenda:** A, C, E e G: Sham catéter: ausência de imunomarcagem na mucosa e parede intestinal (40 a 400X) B, D, F e H: RT (3 X 9,5 Gy) : presença de imunomarcagem moderada a acentuada em células epiteliais regenerativas superficiais e glandulares na mucosa (coloração marrom , setas ) mais evidentes em 200X e 400X.

#### 4.1.11 Resumo do estudo de desenvolvimento do modelo

Baseados nos resultados do estudo modelo (Tabela 18), no tocante à capacidade de produzir o dano em parcela considerável de animais à custa de aceitável morbimortalidade, elegemos como modelo de retite actínica aguda o esquema de fracionamento com dose profunda de 3 x 9,5 Gy, com análise de danos sete dias pós o fim da exposição, para fins de uso na fase de modulação.

**Tabela 18** - Resumo dos resultados do estudo de desenvolvimento do modelo.

| TEMPO                          | DOSE SUPERFICIAL |       |       |              |              | DOSE PROFUNDA |              |              |              |              |         |              |
|--------------------------------|------------------|-------|-------|--------------|--------------|---------------|--------------|--------------|--------------|--------------|---------|--------------|
|                                | 24 h             |       | 48 h  |              | 7 dias       | 30 dias       |              | 24 h         | 48 h         | 7 dias       | 30 dias |              |
|                                | 3 x              | 3 x   | 3 x   | 3 x          | 3 x          | 3 x           | 3 x          | 3 x          | 3 x          | 3 x          | 3 x     |              |
| DOSE                           | 7,5Gy            | 9,5Gy | 7,5Gy | 9,5Gy        | 9,5Gy        | 7,5Gy         | 9,5Gy        | 9,5Gy        | 9,5Gy        | 9,5Gy        | 9,5Gy   |              |
| <b>Sobrevida</b>               | igual            | igual | igual | igual        | igual        | igual         | igual        | igual        | igual        | igual        | igual   | <b>menor</b> |
| <b>Perda de peso</b>           | igual            | igual | igual | igual        | igual        | igual         | igual        | igual        | igual        | igual        | igual   | <b>maior</b> |
| <b>Diarreia</b>                | igual            | igual | igual | igual        | igual        | igual         | igual        | igual        | igual        | igual        | igual   | igual        |
| <b>Colono</b>                  | igual            | igual | igual | <b>maior</b> | <b>maior</b> | <b>maior</b>  | <b>maior</b> | igual        | igual        | <b>maior</b> |         |              |
| <b>Histopat</b>                | igual            | igual | igual | igual        | <b>maior</b> | <b>maior</b>  | igual        | <b>maior</b> | <b>maior</b> | <b>maior</b> |         |              |
| <b>MPO</b>                     | igual            | igual | igual | igual        |              | igual         | igual        |              |              |              |         |              |
| <b>KC</b>                      |                  |       |       |              |              | igual         | igual        | igual        | igual        | <b>maior</b> |         |              |
| <b>IL-6</b>                    |                  |       |       |              |              | igual         | igual        | igual        | igual        | <b>maior</b> |         |              |
| <b>IL-10</b>                   |                  |       |       |              |              | igual         | igual        | igual        | <b>maior</b> | igual        |         |              |
| <b>COX-2</b>                   |                  |       |       |              |              |               |              |              |              | <b>maior</b> |         |              |
| <b>TNF-<math>\alpha</math></b> |                  |       |       |              |              |               |              |              |              | <b>maior</b> |         |              |
| <b>i-NOS</b>                   |                  |       |       |              |              |               |              |              |              | <b>maior</b> |         |              |

A comparação dos grupos irradiados com os respectivos controles quanto à sobrevida, perda ponderal, escores de diarreia, colonoscopia, danos histopatológicos, dosagem de MPO, citocinas e IHQ

A tabela resume os resultados dos onze experimentos realizados na fase inicial do estudo de desenvolvimento do modelo. Destaque para o protocolo de sete dias após irradiação profunda com 3 x 9,5 Gy, que mostrou diferença quanto aos

parâmetros macroscópicos, microscópicos e inflamatórios, sem, contudo, levar a um aumento de mortalidade, perda ponderal ou de diarreia.

## **4.2 A MODULAÇÃO**

Considerando os resultados do protocolo eleito como modelo a partir do estudo de desenvolvimento do modelo, optamos pela modulação do óxido nítrico (NO) com Aminoguanidina pela elevada expressão da enzima i-NOS observada na IHQ. Para a modulação do TNF- $\alpha$ , cuja expressão elevada também foi observada na IHQ, utilizamos o Infliximab.

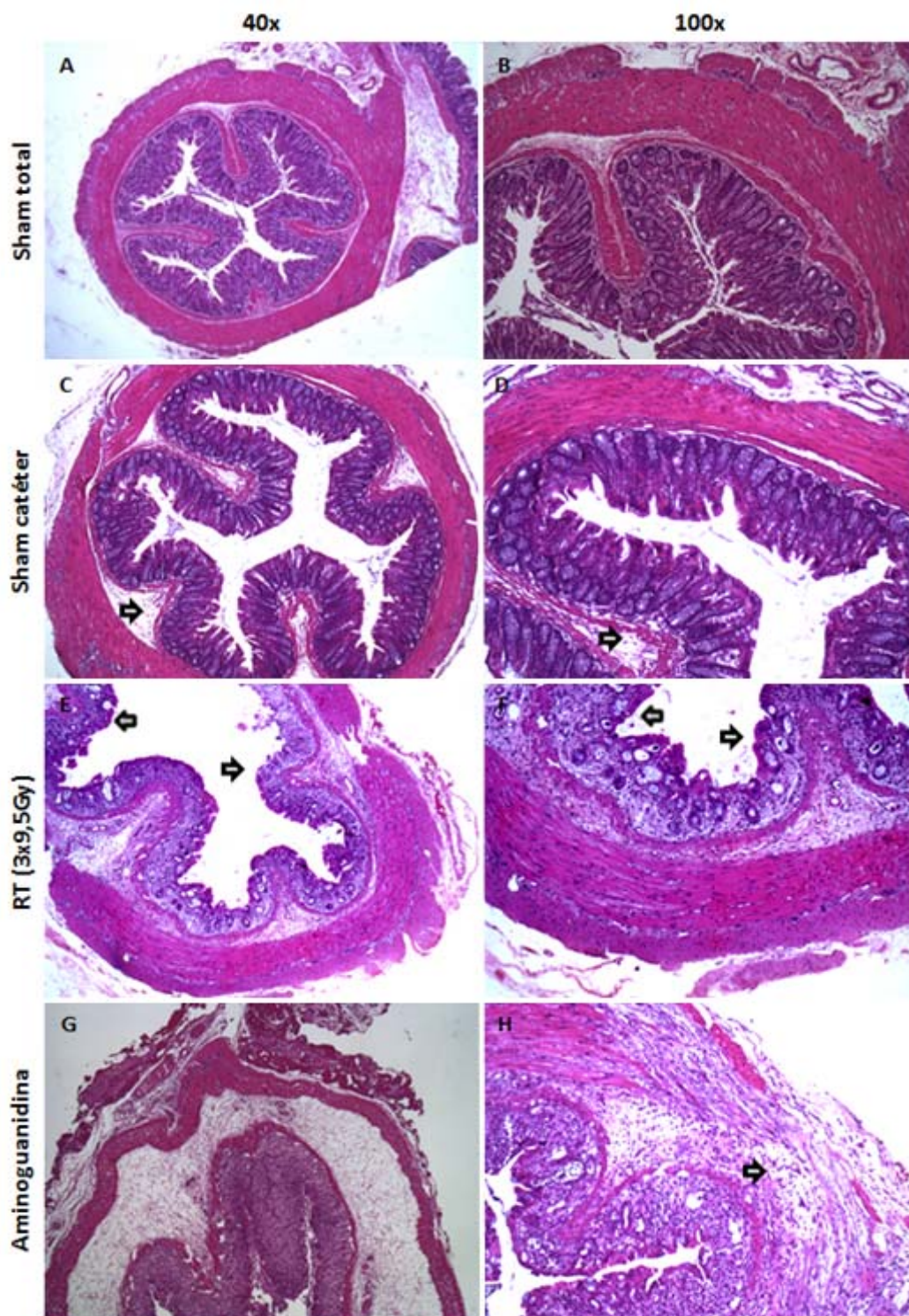
Não foi observada diferença de danos colonoscópicos ou histopatológicos entre o grupo sham total e o sham catéter, sendo que o regime escolhido como modelo foi capaz de provocar tais alterações quando comparado aos grupos controle (Figuras 37, 38, 40, 41, 43 e 44).

### **4.2.1 A modulação com Aminoguanidina**

A Aminoguanidina não foi capaz de reduzir os danos colonoscópicos (Figura 37) ou histopatológicos (Figuras 38 e 39) em comparação ao grupo irradiado ( $p>0,05$ ).



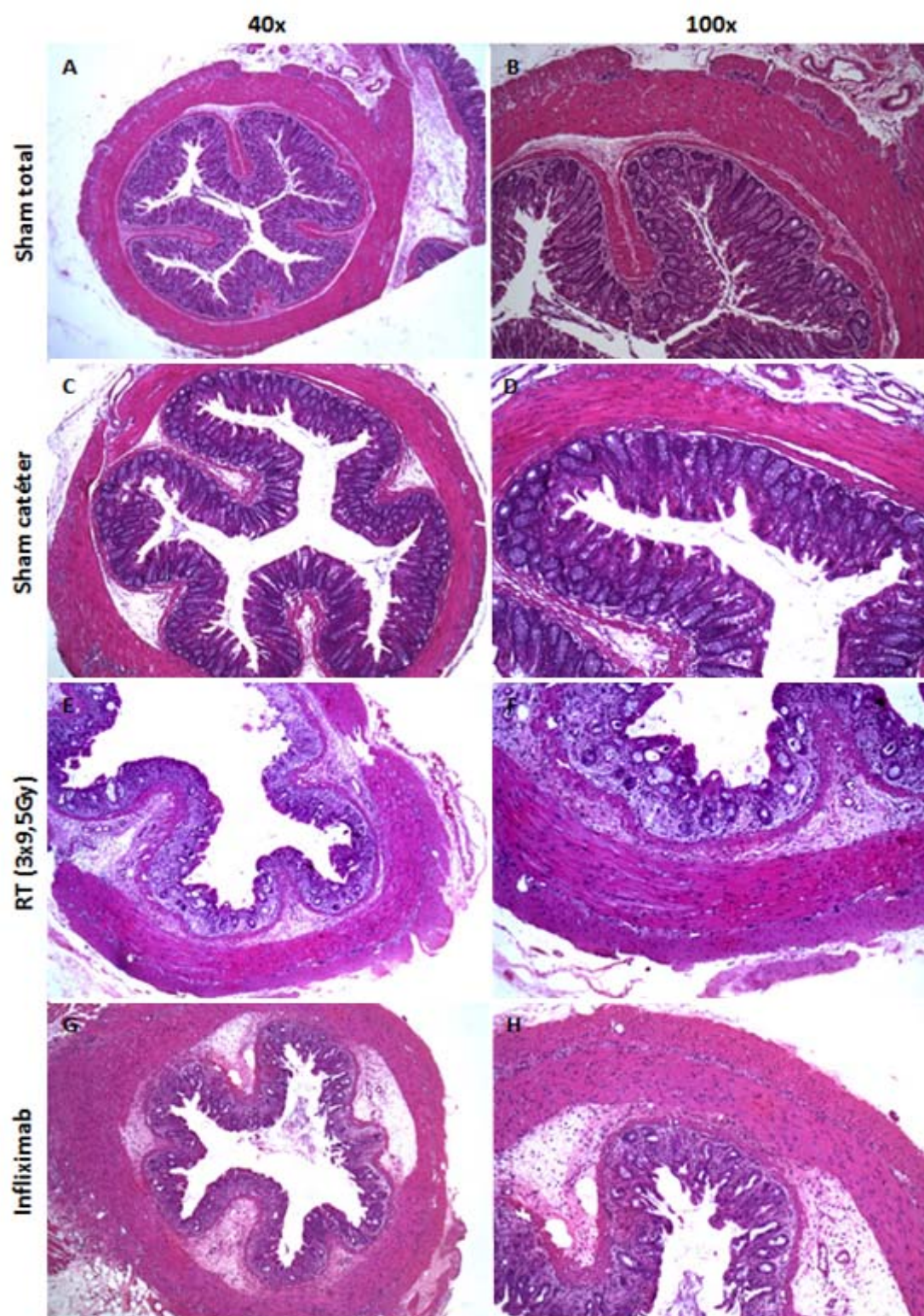




**Figura 40** - Alterações histológicas na modulação com aminoguanidina. A e B – Sham total: ausência de alterações histológicas. C e D – Sham catéter: discreto edema na submucosa (seta). E e F – RT (3X 9,5 Gy). Intensa destruição e regeneração na mucosa, além de edema moderado na submucosa. G e H - aminoguanidina: destruição e regeneração na mucosa, associado a intenso edema da submucosa e infiltrado inflamatório que se estende à parede muscular em H (seta).







**Figura 43** - Alterações histológicas na modulação com Infliximab.

**Legenda:** A e B – Sham total: ausência de alterações histológicas. C e D – Sham catéter: discreto edema na submucosa (seta). E e F – RT (3X 9,5 Gy). Intensa destruição e regeneração na mucosa, além de edema moderado na submucosa. G e H – Infliximab.

## 5 DISCUSSÃO

No presente estudo, desenvolvemos um modelo experimental de retite actínica induzida por braquiterapia de alta taxa de dose, caracterizada por uma intensa resposta inflamatória mediada pela quimiocina KC, citocinas TNF-alfa e IL-6, além de enzimas i-NOS e COX-2.

É relevante o aumento progressivo, ao longo das décadas, da participação da radioterapia como modalidade de tratamento dentro de um cenário curativo de diversas neoplasias pélvicas, principalmente naquelas com alta incidência e prevalência como o câncer de próstata (SIEGEL et al. 2015).

A evolução das técnicas de planejamento e de entrega de dose tem proporcionado um menor percentual de pacientes que apresentam retite actínica após irradiação pélvica, porém a alta frequência de indicações desta modalidade terapêutica leva a números absolutos consideráveis de pacientes portadores da referida toxicidade, com impacto na qualidade de vida e nos custos associados (CHAO et al. 2013).

Não se pode compreender a retite crônica sem antes se estudar a inflamação envolvida na forma aguda. Assim como em várias outras toxicidades actínicas observamos no vocábulo retite o sufixo ite, termo este que está relacionado, de forma genérica, à inflamação. Para que se possa efetivamente estudar os mecanismos da cascata da inflamação envolvida na retite actínica é necessário um modelo animal como ferramenta, que seja facilmente reprodutível e eficaz em produzir o dano esperado no maior percentual de animais à custa de aceitável mortalidade.

Por se utilizar uma fonte de radiação de pequenas dimensões e facilmente manejável através de aplicadores cilíndricos como é o formato do reto, e por permitir irradiações de volumes restritos, a modalidade de braquiterapia nos pareceu, de pronto, extremamente interessante para o modelo de retite. Consideramos não serem demasiadamente distantes as repercussões radiobiológicas deste modelo daquelas resultantes da teleterapia tradicional. Em ambas as modalidades o fóton é o tipo de radiação empregado, o que nos permite não restringir as reflexões dos resultados aqui apresentados à retite apenas por braquiterapia. Obviamente, faz-se necessária cautela ao se comparar os aspectos dosimétricos e radiobiológicos entre teleterapia e braquiterapia. Primeiramente, as características da distribuição de dose altamente conformacional da braquiterapia reduz significativamente o volume exposto à radiação e frequentemente, as doses em tecidos adjacentes quando comparada à teleterapia. Tal característica permite a entrega da dose em tempos de tratamentos mais curtos e, conseqüentemente, repercute na prática clínica como um melhor controle tumoral à custa de aceitável toxicidade (WILLIAMSON et al. 2013).

O modelo de retite actínica desenvolvido por um grupo israelense (SYMON et al. 2010) usou a globalmente utilizada braquiterapia de alta taxa de dose em camundongos C57BL/6. Todavia realizou eutanásias tardias (comprometendo o estudo da retite puramente aguda) e, principalmente, utilizou um aplicador de 08 mm de diâmetro, o que é injustificavelmente grande, de reprodutibilidade questionável e potencialmente proibitiva do ponto de vista ético. A dose prescrita se deu a três mm da superfície deste aplicador o que leva à considerável distância de 11 mm desde o eixo central, profundidade de prescrição esta questionável do ponto de vista anatômico para o animal irradiado em questão. Decidiram por se irradiar vários

animais por vez, aproveitando a multiplicidade de canais do aparelho de braquiterapia, talvez pela aparente vantagem de se poupar tempo e esforço, mas suscitando críticas como a exposição desnecessária dos demais animais durante a irradiação de um determinado indivíduo do grupo, por mais que se tivesse tentado a proteção individual; e o tempo de permanência desnecessariamente longo do cilindro inserido no reto desses mesmos animais, obrigando tempos maiores de permanência do aplicador inserido nos controles. Contudo, trata-se de um trabalho que conseguiu, dentre outros feitos, sugerir esquemas de fracionamentos com suas respectivas taxas de mortalidade, que nos serviram de base para testar outros esquemas radiobiologicamente semelhantes no estudo de desenvolvimento do modelo do presente trabalho.

A Tabela 18 ilustra bem a dimensão do estudo de desenvolvimento do modelo, e a sua relativa complexidade reflete a necessidade de termos testado diversos parâmetros, como diferentes protocolos de doses, profundidades de prescrição e intervalos de tempos entre a exposição e a coleta de dados.

Apesar da existência de outros modelos bem sucedidos de irradiação com dose única em outras topografias, como no caso da indução de mucosite oral em hamsters com fração única de 35 Gy (MOURA 2006), optamos por não testar regimes com dose única. O motivo se deu pela relativa praticidade na realização da braquiterapia endorretal, deixando-nos confortáveis para irradiar os animais com esquema de três frações, além de considerarmos que um modelo com dose única seria mais sujeito a críticas pelo fato de estar mais distante da prática clínica que utiliza esquemas mais fracionados. É bem verdade, entretanto, que os regimes com três frações por nós testados podem ser ainda considerados distantes dos protocolos

clínicos tradicionais relacionados à retite actínica em seres humanos, que superaram as 35 frações e, por isso, merecer as clássicas críticas de dúvidas de reprodutibilidade dos modelos animais. Todavia, é bem oportuno lembrar que atualmente há forte tendência de se reduzir cada vez mais o número de frações dos tratamentos radioterápicos de tumores epidemiologicamente relevantes como os de próstata, seja na forma do hipofracionamento moderado (ARCANGELI et al. 2012; POLLACK et al. 2013; ALUWINI et al. 2015), seja na forma de hipofracionamentos extremos, como no caso da radioterapia estereotática (MADSEN et al. 2007; BUYYOUOUSKI et al. 2010; KATZ et al. 2013) que chega a utilizar poucas frações. Além disso, regimes mais fracionados teriam uma propriedade protetora, por permitir a repopulação dos tecidos normais e o reparo do dano subletal, o que poderia comprometer a eficácia do modelo em atingir nosso objetivo: provocar a retite. Desta forma, tais aspectos nos deixaram confortáveis em adotar esquemas com três frações no estudo de desenvolvimento do modelo.

Optamos por testar duas profundidades diferentes de pontos de prescrição. Uma dose por nós nomeada “dose superficial”, com o ponto de referência 0,45 mm distante da superfície do aplicador e a outra, “dose profunda”, com a profundidade de prescrição da dose a 3,0 mm da superfície do aplicador, sendo esta última irradiação mais agressiva que a primeira. Tal distinção foi necessária para que pudéssemos compreender as repercussões ao se irradiar não apenas as camadas mais superficiais do reto, mas também regiões mais longínquas do mesorreto, similarmente ao que ocorre na irradiação pélvica com radioterapia de feixe externo, ou teleterapia.

Com exceção do experimento de prescrição de dose profunda de 3 x 9,5 Gy com análise de danos em 30 dias, todos os demais esquemas não foram relacionados

à perda ponderal ou aumento da mortalidade, o que é bom em termos de resultado de um modelo que se destina a ser utilizado como ferramenta laboratorial.

Já era esperado que não houvesse aumento nos escores de diarreia em todos os experimentos realizados. Isso se deve ao fato de o reto ser um órgão distal no trato alimentar, não sendo, portanto, responsável pela absorção de fluidos ou nutrientes. Assim, danos nessa região não são propensos a ativar mecanismos secretórios ou alterar processos absorptivos, o que culminaria com o estabelecimento de diarreia.

Nos experimentos em que foi realizado o estudo da atividade de mieloperoxidase (MPO) (doses superficiais de 3 x 7,5 Gy e 3 x 9,5 Gy, com coleta de amostras 24h, 48h e 30 dias após a radioterapia) curiosamente não houve elevação nos grupos irradiados em relação ao controle. Relato similar foi feito num modelo de lesão por irinotecano em camundongos C57BL/6, onde se observou aumento da atividade de MPO em amostras de pulmão, jejuno e íleo, mas não em cólon (WONG 2013). É provável que esta metodologia de dosagem da atividade de MPO não seja adequada para estudo de respostas inflamatórias no tecido colônico.

Observamos que regimes de dose superficial e com curto intervalo de tempo (24 e 48 horas) entre o fim da irradiação e a coleta de amostras não foram eficazes em produzir algum efeito, com exceção de alterações colonoscópicas 48 horas após a dose de 3 x 9,5 Gy. Entretanto tal análise foi fundamental para se nortear os limites da evolução da retite actínica em camundongos e se estudar quão precocemente poderia se dar o fenômeno. Entretanto, quando se considera um período algo mais tardio, porém ainda dentro do cenário da inflamação aguda, como no caso da coleta em sete dias, a dose superficial de 3 x 9,5 Gy foi eficaz em induzir alterações retais



macro e microscópicas, sendo uma atraente alternativa ao regime por nós eleito como modelo.

Ainda quanto aos protocolos de prescrição de dose superficial, demonstramos que o esquema com 3 x 7,5 Gy e coleta de amostras 30 dias após irradiação foi capaz de induzir as alterações colonoscópicas e histopatológicas, o que, paradoxalmente, não foi acompanhado pelo esquema com dose superior de 3 x 9,5 Gy, que não provocou o dano microscópico. Além disso, o regime de 3 x 7,5 Gy não aumentou mortalidade, podendo ser um interessante modelo para se estudar a retite crônica, apesar de não ter repercutido com aumento das dosagens das citocinas estudadas, quais sejam IL-6, IL-10 e KC. É provável que outros mediadores tipicamente envolvidos na resposta inflamatória crônica, a exemplo do Fator de Crescimento Transformador-beta (TGF-beta), ou mediadores pró-resolutivos, como resolvinas e lipoxinas, sejam mais relevantes nessa etapa da patogênese da retite actínica experimental (RIBEIRO et al. 2012).

Considerando os esquemas de prescrição de dose profunda, notamos algum efeito precoce na indução da retite actínica. A dose de 3 x 9,5 Gy foi capaz de provocar apenas dano microscópico em intervalos curtos como 24 e 48h após o término da irradiação, com elevação de IL-10 após este último período somente.

Por sua eficácia em provocar danos macroscópicos e histopatológicos sem provocar perda ponderal ou incremento na mortalidade, com elevação nas dosagens das citocinas pró-inflamatórias KC e IL-6, o protocolo de irradiação com dose profunda de 3 x 9,5 Gy e sete dias para a coleta de dados passou a ser visto como o modelo em potencial, o que foi ratificado após se evidenciar, através de IHQ, aumento da expressão de i-NOS, TNF- $\alpha$  e COX-2.

Na fase de modulação introduzimos um grupo controle a mais (sham total) onde não houve qualquer intervenção, sendo que não foi observada diferença de danos colonoscópicos ou histopatológicos entre este grupo e o sham catéter, grupo este que sofreu manipulação com introdução do aplicador endorretal, mas sem irradiação. Isso comprova que tal manipulação (a simples introdução do aplicador cilíndrico no reto) não contribuiu na geração de lesões macro ou microscópicas no órgão em questão.

O regime eleito como modelo foi capaz, na fase de modulação, de provocar a retite actínica quando comparado aos grupos controles, corroborando sua reprodutibilidade, com padrões semelhantes de dano, como ulceração de mucosa, espessamento de serosa e submucosa, esclerose vascular, dilatação linfática e até mesmo atipia celular.

Nenhum dos fármacos testados, quais sejam Aminoguanidina ou Infliximab, foram capazes de reduzir o processo inflamatório envolvido na indução da retite actínica no presente estudo. Isso reforça a ideia geral de que o fato de certa substância se encontrar em níveis elevados em um determinado cenário de inflamação, como no caso da retite actínica, não significa necessariamente que tal substância seja crucial para sua patogênese.

Seguindo este racional, o Laboratório de Farmacologia da Inflamação e do Câncer - LAFICA) tem investigado nos últimos 20 anos os mecanismos e mediadores inflamatórios envolvidos na patogênese das lesões consequentes ao tratamento oncológico, com contribuições importantes no estabelecimento da cascata de mediadores inflamatórios envolvidos na patogênese da cistite hemorrágica induzida por ciclofosfamida ou ifosfamida (RIBEIRO et al. 2012). Adicionalmente,

mostrou-se o papel de diversas citocinas e do óxido nítrico (NO) na patogênese da mucosite oral e intestinal induzida diferencialmente por diversos quimioterápicos, tais como Metotrexato (LEITÃO et al. 2011), Irinotecano (LIMA-JÚNIOR 2008; LIMA-JÚNIOR et al. 2012) e 5-fluoruracil (SOARES 2008), e na mucosite oral induzida pela radioterapia (MOURA 2012).

Demonstrou-se que citocinas, como a interleucina 18 (IL-18) e o TNF- $\alpha$ , parecem aumentar a expressão da óxido nítrico sintase induzida com consequente formação de NO, o qual parece gerar intermediários reativos tipo o radical peroxinitrito, que possivelmente é o mediador final da lesão da mucosa observada em animais tratados com irinotecano. Tal demonstração foi possível mediante bloqueio farmacológico da ação da IL-18, por meio da administração sistêmica da proteína ligante da IL-18 (IL-18bp) e por meio da deleção gênica para a IL-18 (LIMA-JÚNIOR 2008). Nesses animais, verificou-se que a atividade de óxido nítrico sintase induzida (iNOS) é reduzida, portanto, com menor síntese de NO. A repercussão da modulação da ação da IL-18 envolveu a redução de danos funcionais (diarreia e hipercontratilidade intestinal), inflamatórios (detectado pelo aumento de infiltrado neutrofílico) e estruturais no intestino (redução da altura de vilos, hiperplasia de criptas, apoptose e vacuolização celular) (LIMA-JÚNIOR 2008; LIMA-JÚNIOR et al. 2012).

Adicionalmente, o uso do infliximabe, um anticorpo monoclonal para TNF- $\alpha$ , reduziu de maneira importante a expressão de iNOS, detectada por western blot (FIGUEIREDO 2012). De maneira complementar, a participação do NO, neste modelo de toxicidade, foi investigada em animais knockout para iNOS ou tratados com aminoguanidina, um inibidor de iNOS, os quais apresentaram reduzidos danos

intestinais de modo similar aos achados experimentais descritos para a modulação da ação da IL-18 (LIMA-JÚNIOR 2008; LIMA-JÚNIOR et al. 2012).

Curiosamente, foi demonstrado que a lesão intestinal relacionada a outro quimioterápico antineoplásico, o 5-Fluorouracil, leva à ativação de outro perfil de mediadores inflamatórios, como Fator Ativador de Plaquetas e IL-1 (SOARES 2008). O uso de animais nocaute para PAF ou do antagonista de receptores de IL-1 (IL-1ra) preveniram o dano e os distúrbios de motilidade intestinais associados a este quimioterápico. Entretanto, o mesmo não ocorreu quando da administração de irinotecano (LIMA-JÚNIOR 2008). Tal observação parece ser um forte indicativo de que o curso de desenvolvimento da mucosite parece ser dependente do tipo de quimioterápico antineoplásico usado. Além disso, esses achados fortemente sugerem que lesões inflamatórias no mesmo tecido podem cursar com mecanismos distintos. Assim, a retite actínica, por mais que tenha apresentado aumentos significativos de muitos marcadores da inflamação, não foi passível de modulação farmacológica.

MOURA (2006), utilizando seu modelo de mucosite oral através do uso de radioterapia com feixe externo de telecobaltoterapia em hamsters, conseguiu demonstrar o efeito protetor de um pan-inibidor de citocinas, a pentoxifilina, com a dose de 15mg/kg, a qual reduziu a intensidade de fenômenos inflamatórios como eritema, hiperemia edema, hemorragia, úlceras e abscessos quando comparado aos animais não irradiados e, mais ainda, reduzir a imunomarcagem do TNF- $\alpha$  por análise de imunohistoquímica. Esses achados indicam que, no contexto da mucosite actínica ora estudada, possivelmente uma inibição menos seletiva dos mecanismos inflamatórios poderia gerar efeitos mais satisfatórios em termos de modulação do

dano. Tal resultado poderia ser alcançado com o uso de fármacos glicocorticoides, cuja eficácia ainda merece ser investigada.

Ainda em relação à toxicidade sobre mucosas, também foi demonstrado que, no modelo de mucosite oral induzida por radioterapia de megavoltagem, a modulação da ação de citocinas, como TNF- $\alpha$  e IL-1, e da enzima pró-inflamatória óxido nítrico sintase induzida (i-NOS) é capaz de prevenir o desenvolvimento da lesão tecidual, verificada pela redução da infiltração de neutrófilos, edema e perda epitelial de revestimento da mucosa jugal de hamsters (MOURA 2012). Interessante é que nesse modelo, a inibição de TNF- $\alpha$  com Infliximab não foi capaz de prevenir o dano na mucosa, diferente do que ocorreu na mucosite intestinal e semelhante ao que ocorreu quanto à retite actínica no presente estudo. Isso pode sugerir que na mucosite oral relacionada à radioterapia, o TNF não tenha a mesma relevância na sua patogênese, como o tem na mucosite intestinal induzida pela quimioterapia.

Fica nítido que o grupo de pesquisa onde o presente estudo se desenvolveu é excepcionalmente favorável para futuras modulações, tendo como ferramenta o modelo animal de retite aqui desenvolvido e padronizado, de modo a prosseguir com o estudo da patogênese desta importante toxicidade.

## **6 CONCLUSÕES**

- 1 Padronizamos o modelo de retite actínica pelo uso de braquiterapia de alta taxa de dose com um protocolo eficaz em causar o dano esperado e sem induzir significativa mortalidade dos animais;
- 2 No presente estudo, a modulação do NO pela Aminoguanidina ou do TNF- $\alpha$  pelo Infiximabe não conferiu efeito protetor contra a lesão colonoscópica ou histopatológica.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aluwini S, Pos F, Schimmel E, et al. Hypofractionated versus conventionally fractionated radiotherapy for patients with prostate cancer (HYPRO): acute toxicity results from a randomised non-inferiority phase 3 trial. **Lancet Oncol** 2015; 16:274-83.

Alves-Filho JC, de Freitas A, Russo M, Cunha FQ. Toll-like receptor 4 signaling leads to neutrophil migration impairment in polymicrobial sepsis. **Crit Care Med** 2006; 34:461-70.

Andreyev HJ. Gastrointestinal problems after pelvic radiotherapy: thepast, the present and the future. **Clin Oncol. (R Coll Radiol)** 2007a; 10:790-9.

Andreyev J. Gastrointestinal symptoms after pelvic radiotherapy: a new understanding to improve management of symptomatic patients. **Lancet Oncol** 2007b; 8:1007-17.

Arcangeli S, Strigari L, Gomellini S, et al. Updated results and patterns of failure in a randomized hypofractionation trial for high-risk prostate cancer. **Int J Radiat Oncol Biol Phys** 2012; 84:1172-8.

Ashburn JH, Kalady MF. Radiation-induced problems in colorectal surgery. **Clin Colon Rectal Surg** 2016; 29:85-91.

Bertolini A, Ottani A, Sandrini M. Selective COX-2 inhibitors and dual acting anti-inflammatory drugs: critical remarks. **Curr Med Chem** 2002; 9:1033-43.

Bruheim K, Guren MG, Skovlund E, et al. Late side effects and quality of life after radiotherapy for rectal cancer. **Int J Radiat Oncol Biol Phys** 2010; 76:1005-11.

Buyyounouski MK, Price RA Jr, Harris EE, et al. Stereotactic body radiotherapy for primary management of early-stage, low- to intermediate-risk prostate cancer: report of the American Society for Therapeutic Radiology and Oncology Emerging Technology Committee. **Int J Radiat Oncol Biol Phys** 2010; 76:1297-304.

Campostrini F, Musola R, Marchiaro G, Lonardi F, Verlato G. Role of early proctoscopy in predicting late symptomatic proctitis after external radiation therapy for prostate carcinoma. **Int J Radiat Oncol Biol Phys** 2013; 85:1031-7.

Chao KSC, Mohan R, Marinetti TD, Dong L. Intensity-modulated radiation treatment techniques and clinical applications. In: Halperin EC, Perez CA, Brady LW, editores. **Principles and practice of radiation oncology**. 6<sup>th</sup> ed. Philadelphia: Lippincot Williams & Wilkins; 2013. p.221-46.

Ciezki JP, Reddy CA, Angermeier K, et al. Long-term toxicity and associated cost of initial treatment and subsequent toxicity-related intervention for patients treated with prostatectomy, external beam radiotherapy, or brachytherapy: a SEER-medicare database study. **Int J Radiat Oncol Biol Phys** 2011; 81:S388.

Conner EM, Brand SJ, Davis JM, Kang DY, Grisham MB. Role of reactive metabolites of oxygen and nitrogen in inflammatory bowel disease: toxins, mediators, and modulators of gene expression. **Inflamm Bowel Dis** 1996; 2:133-47.

Cotti G, Seid V, Araujo S, Silva SJAH, Roberto KD, Angelita HG. Conservative therapies for hemorrhagic radiation proctitis: a review. **Rev Hosp Clin Fac Med São Paulo** 2003; 58:284-92.

Cunha FQ, Boukili MA, Motta JIB, Vargaftig BB, Ferreira SH. Blockade by fenspiride of endotoxin-induced neutrophil migration in the rat. **Eur J Pharmacol** 1993; 238:47-52.



de Leval X, Delarge J, Somers F, et al. Recent advances in inducible cyclooxygenase (COX-2) inhibition. **Curr Med Chem** 2000; 7:1041-62.

Denton AS, Andreyev HJN, Forbes A, Maher EJ. Systematic review for non-surgical interventions for the management of late radiation proctitis. **Br J Cancer** 2002; 87:134-43.

Dörr W. Pathogenesis of normal tissue side-effects. In: Joiner M, Van der Kogel A. editors. **Basic clinical radiobiology**. 4<sup>th</sup> ed. London: Hodder Arnold; 2009. p.183-190.

Eifel PJ, Levenback C, Wharton JT, Oswald MJ. Time course and incidence of late complications in patients treated with radiation therapy for FIGO stage IB carcinoma of the uterine cervix. **Int J Radiat Oncol Biol Phys** 1995; 32:1289-300.

Eifel PJ, Jhingran A, Bodurka DC, Levenback C, Thames H. Correlation of smoking history and other patient characteristics with major complications of pelvic radiation therapy for cervical cancer. **J Clin Oncol** 2002; 20:3651-7.

Eifel PJ, Winter K, Morris M, et al. Pelvic irradiation with concurrent chemotherapy versus pelvic and para-aortic irradiation for high-risk cervical cancer: an update of radiation therapy oncology group trial (RTOG) 90-01. **J Clin Oncol** 2004; 22:872-80.

Elting LS, Cooksley, CD, Chambers, Garden AS. Risk, outcomes, and costs of radiation-induced oral mucositis among patients with head-and-neck malignancies. **Int J Radiat Oncol Biol Phys** 2007; 68:1110-20.

Figueiredo AA. **Efeito do anticorpo anti-TNF- $\alpha$ , infliximabe, sobre a mucosite intestinal experimental induzida por Irinotecano**. Fortaleza; 2012. [Dissertação de Mestrado-Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará].

Ghorbanzadeh-Moghaddam A, Gholamrezaei A, Hemati S. Vitamin D deficiency is associated with the severity of radiation-induced proctitis in cancer patients. **Int J Radiat Oncol Biol Phys** 2015; 92:613-8.

Gul YA, Prasannan S, Jabar FM, Shaker AR, Moissinac K. Pharmacotherapy for chronic hemorrhagic radiation proctitis. **World J Surg** 2002; 26:1499-502.

Hall EJ, Giaccia AJ. **Radiobiology for the radiology**. 7<sup>th</sup> ed. Philadelphia: Lippincot Williams & Wilkins; 2012. Physics and chemistry of radiation absorption; p.3-11.

Halperin EC, Wazer DE, Perez CA. The disciplin of radiation oncology. In: Halperin EC, Perez CA, Brady LW, editors. **Principles and practice of radiation oncology**. 6<sup>th</sup> ed. Philadelphia: Lippincot Williams & Wilkins; 2013. p.2-60.

Hauer-Jensen M, Denham JW, Andreyev HJ. Radiation enteropathy-pathogenesis, treatment and prevention. **Nat Rev Gastroenterol Hepatol** 2014; 11:470-9.

Hayne D, Vaizey CJ, Boulos PB. Anorectal injury following pelvic radiotherapy. **Br J Surg** 2001; 88:1037-48.

Herold DM, Hanlon AL, Hanks GE. Diabetes mellitus: a predictor for late radiation morbidity. **Int J Radiat Oncol Biol Phys** 1999; 43:475-9.

Hovdenak N, Sorbye H, Dahl O. Sucralfate does not ameliorate acute radiation proctitis: Randomised study and meta-analysis. **Clin Oncol (R Coll Radiol)** 2005; 17:485-491.

Hsu SM, Raine L. Protein A, avidin, and biotin in immunohistochemistry. **J Histochem Cytochem** 1981; 29:1349-1353.

Iyer SS, Cheng G. Role of interleukin 10 transcriptional regulation in inflammation and autoimmune disease. **Crit Rev Immunol** 2012; 32:23-63.

Jain RK, Duda DG. Molecular pathophysiology of tumors. In: Halperin EC, Perez CA, Brady LW, editors. **Principles and practice of radiation oncology**. 6<sup>th</sup> ed. Philadelphia: Lippincot Williams & Wilkins; 2013. p.102-15.

Johannessen HO, Olsen DR, Giercksky KE. Development of an experimental model for high dose rate endocavitary irradiation of the rat rectum. **Br J Radiol** 1996; 69:946-52.

Kamimura D, Ishihara K, Hirano T. IL-6 signal transduction and its physiological roles: the signal orchestration model. **Rev Physiol Biochem Pharmacol** 2003; 149:1-38.

Katz AJ, Santoro M, Diblasio F, Ashley R. Stereotactic body radiotherapy for localized prostate cancer: disease control and quality of life at 6 years. **Radiat Oncol** 2013; 8:118.

Kodani T, Rodriguez-Palacios A, Corridoni D, et al. Flexible colonoscopy in mice to evaluate the severity of colitis and colorectal tumors using a validated endoscopic scoring system. **J Vis Exp** 2013; 80:e50843.

Kuban DA, Tucker SL, Dong L, et al. Long-term results of the M. D. Anderson randomized dose-escalation trial for prostate cancer. **Int J Radiat Oncol Biol Phys** 2008; 70:67-74.

Kurita A, Kado S, Kaneda N, Onoue M, Hashimoto S, Yokokura T. Modified irinotecan hydrochloride (CPT-11) administration schedule improves induction of delayed-onset diarrhea in rats. **Cancer ChemotherPharmacol** 2000; 46:211-20.

Langberg CW, Sauer T, Reitan JB, Hauer-Jensen M. Tolerance of rat small intestine to localized single dose and fractionated irradiation. **Acta Oncol** 1992; 31:781-7.

Lechner M, Lirk P, Rieder J. Inducible nitric oxide synthase (iNOS) in tumor biology: the two sides of the same coin. **Semin Cancer Biol** 2005; 15:277-89.

Lee SW, Suh CO, Chung EJ, Kim GE. Dose optimization of fractionated external radiation and high-dose-rate intracavitary brachytherapy for FIGO stage IB uterine cervical carcinoma. **Int J Radiat Oncol Biol Phys** 2002; 52: 1338-44.

Leiper K, Morris AI. Treatment of radiation proctitis. **Clin Oncol** 2007; 19:724-9.

Leitão RF, Brito GA, Oriá RB, et al. Role of inducible nitric oxide synthase pathway on methotrexate-induced intestinal mucositis in rodents. **BMC Gastroenterol** 2011; 11:90.

Lima-Júnior RCP. **Estudo morfofuncional e dos mediadores inflamatórios envolvidos na patogênese da mucosite intestinal induzida por irinotecano (CPT-11) em camundongos: papel da caspase-1, interleucina-18 e óxido nítrico.** Fortaleza; 2008. [Tese de Doutorado-Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará]

Lima-Júnior RC, Figueiredo AA, Freitas HC, et al. Involvement of nitric oxide on the pathogenesis of irinotecan-induced intestinal mucositis: role of cytokines on inducible nitric oxide synthase activation. **Cancer Chemother Pharmacol** 2012; 69:931-42.

Lirk P, Hoffmann G, Rieder J. Inducible nitric oxide synthase--time for reappraisal. **Curr Drug Targets Inflamm Allergy** 2002; 1:89-108.

Madsen BL, Hsi RA, Pham HT, Fowler JF, Esagui L, Corman J. Stereotactic hypofractionated accurate radiotherapy of the prostate (SHARP), 33.5 Gy in five fractions for localized disease: first clinical trial results. **Int J Radiat Oncol Biol Phys** 2007; 67:1099-105.

McCaffrey KR, Patel U, Rosen F, et al. Inpatient and outpatient costs for head and neck and non-small cell lung cancer patients with oral mucositis and/or esophagitis who undergo chemoradiotherapy. **Int J Radiat Oncol Biol Phys** 2005; 63:S186.

Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer. **Estimativa 2016: incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA; 2016.

Mollà M, Gironella M, Miquel R, et al. Relative roles of ICAM-1 and VCAM-1 in the pathogenesis of experimental radiation-induced intestinal inflammation. **Int J Radiat Oncol Biol Phys** 2003; 57:264-73.

Modi WS, Yoshimura T. Isolation of novel GRO genes and phylogenetic analysis of the CXC chemokine subfamily in mammals. **Mol Biol Evol** 1999; 16:180.

Moura JFB. **Modelo experimental de mucosite oral induzida por radioterapia de megavoltagem – efeito protetor da pentoxifilina**. Fortaleza; 2006. [Dissertação de Mestrado-Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará]

Moura JFB. **Envolvimento de citocinas (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-10) e óxido nítrico na patogênese da mucosite oral experimental induzida por radioterapia de megavoltagem - efeito protetor da pentoxifilina, inibidor da óxido nítrico sintase induzida e de fitoterápicos**. Fortaleza; 2012. [Tese de Doutorado-Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará]

Nishimoto N, Kishimoto T. Humanized antihuman IL-6 receptor antibody, tocilizumab. **Handb Exp Pharmacol** 2008; 181:151-60.

O'Brien PC, Franklin CI, Dear KB, et al. A phase III double blind randomised study of rectal sucralfate suspension in the prevention of acute radiation proctitis. **Radiother Oncol** 1997; 45:117-23.

Panés J, Anderson DC, Miyasaka M, Granger DN. Role of leukocyte-endothelial cell adhesion in radiation-induced microvascular dysfunction in rats. **Gastroenterology** 1995; 108:1761-9.

Parente L, Perretti M. Advances in the pathophysiology of constitutive and inducible cyclooxygenases: two enzymes in the spotlight. **Biochem Pharmacol** 2003; 65:153-9.

Paris F, Fuks Z, Kang A, et al. Endothelial apoptosis as the primary lesion initiating intestinal radiation damage in mice. **Science** 2001; 293:293-7.

Pollack A, Walker G, Horwitz EM, et al. Randomized trial of hypofractionated external-beam radiotherapy for prostate cancer. **J Clin Oncol** 2013; 31:3860-8.

Ribeiro RA, Lima-Junior RC, Leite CAV, et al. Chemotherapy-induced hemorrhagic cystitis: pathogenesis, pharmacological approaches and new insights. **J Exp Integr Med** 2012; 2: 95-112.

Rojas JM, Avia M, Martín V, Sevilla N. IL-10: a multifunctional cytokine in viral infections. **J Immunol Res** 2017; 2017:6104054.

Rotman M, Sedlis A, Piedmonte MR, et al. A phase III randomized trial of postoperative pelvic irradiation in Stage IB cervical carcinoma with poor prognostic features: follow-up of a gynecologic oncology group study. **Int J Radiat Oncol Biol Phys** 2006; 65:169-76.

Rovai LE, Herschman HR, Smith JB. The murine neutrophilchemoattractant chemokines LIX, KC, and MIP-2 have distinct induction kinetics, tissue distributions, and tissue-specific sensitivities to glucocorticoid regulation in endotoxemia. **J. Leukocyte Biol** 1998; 64:494-502.

Safieh-Garabedian B, Poole S, Allchorne A, Winter J, Woolf CJ. Contribution of interleukin-1 beta to the inflammation-induced increase in nerve growth factor levels and inflammatory hyperalgesia. **Br J Pharmacol** 1995; 115:1265-75.

Sanguineti G, Franzone P, Marcenaro M, Foppiano F, Vitale V. Sucralfate versus mesalazine versus hydrocortisone in the prevention of acute radiation proctitis during conformal radiotherapy for prostate carcinoma: a randomized study. **Strahlenther Onkol** 2003; 179:464-70.

Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics 2015. **CA Cancer J Clin** 2015; 65:5-29.

Siegel SA, Shealy DJ, Nakada, MT, et al. The mouse/human chimeric monoclonal antibody cA2 neutralizes TNF in vitro and protects transgenic mice from cachexia and TNF lethality in vivo. **Cytokine** 1995; 7:15-25.

Simone NL, Ménard C, Soule BP, et al. Intrarectal amifostine during external beam radiation therapy for prostate cancer produces significant improvements in Quality of Life measured by EPIC score. **Int J Radiat Oncol Biol Phys** 2008; 70:90-5.

Singer M, Sansonetti PJ. IL-8 Is a key chemokine regulating neutrophil recruitment in a new mouse model of shigella-induced colitis. **J Immunol** 2004; 173:4197-206.

Soares PMG. **Mucosite intestinal experimental induzida por 5-fluorouracil: Papel de IL-1 $\beta$ , IL-4 e PAF e avaliação das alterações da motilidade digestive.** Fortaleza; 2008. [Tese de Doutorado-Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará]

Soung Y, Samulski TD, Van Dyke TA. Cancer: a conceptual framework. In: DeVita VT, Lawrence TS, Rosenberg SA, editors. **Cancer: principles & practice of oncology**. 8<sup>th</sup> ed. Philadelphia: Lippincot Williams & Wilkins; 2008. p.3.12.

Symon Z, Goldshmidt Y, Picard O, et al. A murine model for the study of molecular pathogenesis of radiation proctitis. **Int J Radiat Oncol Biol Phys** 2010; 76:242-50.

Thomadsen BR. High dose-rate brachytherapy. In: Khan FM, editor. **Treatment planning in radiation oncology**. 2<sup>nd</sup> ed. Philadelphia: Lippincot Williams & Wilkins; 2007. p.240-57.

Wedlake LJ, Thomas K, Lalji A, et al. Predicting late effects of pelvic radiotherapy: is there a better approach? **Int J Radiat Oncol Biol Phys** 2010; 78:1163-70.

Weinberg RA. **A biologia do câncer**. Porto Alegre: Artmed; 2007. Genes supressores de tumor, p.209-54.

West CM, Barnett GC. Genetics and genomics of radiotherapy toxicity: towards prediction. **Genome Med** 2011; 3:52.

White JR, Armour EP, Armin AR, Dewitt CC, Corry PM, Martinez A. Reproducible rat model for comparing late rectal toxicity from different brachytherapy techniques. **Int J Radiat Oncol Biol Phys** 1997; 37:1155-61.

Willett CG, Ooi CJ, Zietman AL, et al. Acute and late toxicity of patients with inflammatory bowel disease undergoing irradiation for abdominal and pelvic neoplasms. **Int J Radiat Oncol Biol Phys** 2000; 46:995-8.

Williamson JF, Li XA, Brenner DJ. Physics and biology of brachytherapy. In: Halperin EC, Perez CA, Brady LW, editors. **Principles and practice of radiation oncology**. 6<sup>th</sup> ed. Philadelphia: Lippincot Williams & Wilkins; 2013. p.422-67.

Wong DVT. **Mediação dos receptores TLR2, NOD1 e da proteína adaptadora MyD88 na modulação da mucosite intestinal induzida pelo irinotecano**. Fortaleza; 2013. [Tese de Doutorado-Universidade Federal do Ceará]



Yeoh EK, Holloway RH, Frase RJ, Botten RJ, Di Matteo AC, Butters J. Pathophysiology and natural history of anorectal sequelae following radiation therapy for carcinoma of the prostate. **Int J Radiat Oncol Biol Phys** 2012; 84:593-99.

Zheng B, Zheng T, Wang L, Chen X, Shi C, Zhao S. Aminoguanidine inhibition of iNOS activity ameliorates cerebral vasospasm after subarachnoid hemorrhage in rabbits via restoration of dysfunctional endothelial cells. **J Neurol Sci** 2010; 295:97-103.

Zidi I, Mestiri S, Bartegi A, Amor NB. TNF- $\alpha$  and its inhibitors in cancer. **Med Oncol** 2010; 27:185-98.

**Anexo 1 - Carta de Aprovação da Comissão de Ética Em Pesquisa Animal – UFC**  
(Título Original do Projeto)



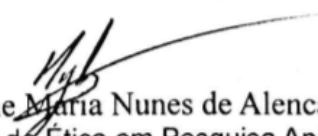
Universidade Federal do Ceará  
Comissão de Ética em Pesquisa Animal – CEPA  
Rua: Coronel Nunes de Melo, 1127 Rodolfo Teófilo  
Cep: 60430-970 Fortaleza-CE  
Tel: (85) 3366.8331 Fax: (85) 3366.8333

## **DECLARAÇÃO**

Declaramos que o protocolo para uso de animais em experimentação nº 50/2013, sobre o projeto intitulado: **“ESTUDO DOS MECANISMOS E MEDIADORES ENVOLVIDOS NA PATOGÊNESE DA RETITE INDUZIDA POR BRAQUITERAPIA DE ALTA TAXA DE DOSE EM CAMUNDONGOS”**, de responsabilidade do Prof. Dr. Ronaldo de Albuquerque Ribeiro e está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

Declaramos ainda que o referido projeto foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa Animal – CEPA – em reunião realizada em 26 de setembro de 2013.

Fortaleza, 27 de novembro de 2013

  
Profa. Dra. Nylane Maria Nunes de Alencar  
Coordenadora da Comissão de Ética em Pesquisa Animal – CEPA

Profa. Dra. Nylane M. Nunes de Alencar  
Coordenadora da CEPA/DFP/FAMED/UFC  
MAT. SIAPE 2166369

## Anexo 2 - Autorização Comissão de Ética no uso de Animais

### COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ – PRPPG/UFC

Fortaleza, 24 de abril 2017,

Venho por meio desta informar que a Comissão de Ética em Uso de Animais da Universidade Federal do Ceará está ciente de que o projeto anteriormente aprovado em 26 de setembro de 2013 sob o número 50/13 e título original “ESTUDO DOS MECANISMOS E MEDIADORES ENVOLVIDOS NA PATOGÊNESE DA RETITE INDUZIDA POR BRAQUITERAPIA DE ALTA TAXA DE DOSE EM CAMUNDONGOS”, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Ronaldo de Albuquerque Ribeiro foi modificado para “DESENVOLVIMENTO DE UM MODELO DE RETITE ARTÍNICA INDUZIDA POR BRAQUITERAPIA DE ALTA TAXA DE DOSE: ESTUDO DOS MECANISMOS ENVOLVIDOS”. Essa mudança foi solicitada em virtude da modificação do título da tese ao qual o projeto aprovado anteriormente era vinculado.

Sem mais para o momento, subscrevo-me,



Alexandre Havt Bindá

Coordenador do Comitê de Ética no Uso de Animais

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**ALEXANDRE HAVT BINDÁ**  
COORDENADOR DA COMISSÃO DE ÉTICA E DO USO COM  
ANIMAIS - CELAUFC - MATRÍCULA SIAPE: 1866992

### **Anexo 3 – Escores de Danos Histopatológicos**

#### **ESPESSAMENTO DA SEROSA**

- 1 = espessamento leve da serosa; hiperplasia do mesotélio peritoneal
- 2 = espessamento acentuado da serosa
- 3 = espessamento extremo e fibrose da serosa

#### **ULCERAÇÃO DA MUCOSA**

- 1 = ulcerações superficiais e pequenas
- 2 = ulcerações envolvendo mais da metade da circunferência intestinal (retal)

#### **ATIPIA EPITELIAL**

- 1 = criptas anormalmente orientadas
- 2 = regeneração irregular da cripta com células epiteliais atípicas
- 3 = adenocarcinoma

#### **ESCLEROSE VASCULAR**

- 1 = espessamento leve e hialinização da parede do vaso
- 2 = parede do vaso com o dobro do espessamento; hialinização e estenose
- 3 = esclerose extrema com estenose acentuada ou oclusão completa; necrose fibrinóide

#### **FIBROSE DA PAREDE INTESTINAL (RETAL)**

- 1 = submucosa espessada em dobro do normal; fibras colágenas alargadas e hialinizadas
- 2 = submucosa espessada de 3 a 4 vezes do normal; fibras colágenas anormais
- 3 = fibrose maciça incluindo a camada muscular

#### **CONGESTÃO LINFÁTICA**

- 1 = vasos linfáticos dilatados ou coleções císticas da linfa

#### **ILEÍTE (RETITE) CÍSTICA PROFUNDA**

- 1 = inclusões glandulares submucosas
- 2 = cistos submucosos com elevação polipóide da mucosa
- 3 = cistos grandes com extensão para a muscular

**Fonte:** adaptado de LANGBERG et al. (1992).