

ADRIANA IVETE CORNITA DE CARVALHO

***EFEITO DA OXIGENAÇÃO HIPERBÁRICA NAS LESÕES IMEDIATAS
PROVOCADA PELA RADIAÇÃO IONIZANTE NO ÍLEO DE
CAMUNDONGOS***

Tese apresentada à Universidade Federal de
São Paulo – Escola Paulista de Medicina,
para obtenção do Título de Mestre em
Ciências.

***SÃO PAULO
2005***

ADRIANA IVETE CORNITA DE CARVALHO

***EFEITO DA OXIGENAÇÃO HIPERBÁRICA NAS LESÕES IMEDIATAS
PROVOCADA PELA RADIAÇÃO IONIZANTE, NO ÍLEO DE
CAMUNDONGOS***

Tese apresentada à Universidade Federal de
São Paulo – Escola Paulista de Medicina,
para obtenção do Título de Mestre em
Ciências.

ORIENTADOR: Prof. Dr. Paulo de Oliveira Gomes
CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. Djalma José Fagundes

***SÃO PAULO
2005***

Carvalho, Adriana Ivete Cornita

Efeito da oxigenação hiperbárica nas lesões imediatas provocadas pela radiação ionizante, no íleo de camundongos/ Adriana Ivete Cornita de Carvalho São Paulo, 2005.

xiv, 38f .

Tese (Mestrado) – Universidade Federal de São Paulo. Escola Paulista de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Cirurgia e Experimentação.

Effect of hiperbaric oxygen immediate injuries induced by ionic radiation mice ileum.

1. oxigenação hiperbárica 2. Radioterapia 3. Íleo 4. Camundongos



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO
ESCOLA PAULISTA DE MEDICINA
UNIFESP-EPM
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIRURGIA E EXPERIMENTAÇÃO
COORDENADOR: Prof. Dr. Djalma José Fagundes

TESE DE MESTRADO

AUTORA: Adriana Ivete Cornita de Carvalho

ORIENTADOR: Prof. Dr. Paulo de Oliveira Gomes

TÍTULO: Efeito da oxigenação hiperbárica nas lesões imediatas provocada pela radiação ionizante, no íleo de camundongos.

BANCA EXAMINADORA

MEMBROS EFETIVOS

1. Prof. Dr. Marco Antonio De Angelis

Título: Professor Doutor da Disciplina de Morfologia da Universidade Federal de São Paulo – UNIFESP- EPM

2. Prof. Dr. José Carlos Ramos Fernandes

Título: Professor Titular da Disciplina de Fisiologia e Neurofisiologia da Universidade das Faculdades Metropolitanas Unidas – UNIFMU

3. Profa. Dra. Luciana Corrêa

Título: Doutora pela Disciplina de Patologia Geral da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo-FOUSP

MEMBRO SUPLENTE

1. Prof. Dr. Murched Omar Taha

Título: Prof. Afiliado da Disciplina de Técnica Operatória e Cirurgia Experimental da UNIFESP-EPM

*“Quando não houver caminho
Mesmo sem amor, sem direção
A sós ninguém está sozinho
É caminhando que se faz o caminho”.*

Sergio Britto

DEDICATÓRIA

Ao meu pai, ***Antonio (in memoriam)*** e a minha mãe, ***Ivete***, que pelos seus exemplos de vida, ensinaram-me que não existem obstáculos intransponíveis.

Ao meu filho ***Bruno***, pelo amor que me dedica.

Ao meu esposo ***Arquimedes*** pela compreensão, apoio e estímulo, mesmo nos momentos de dificuldades.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Ao meu orientador ***Prof. Dr. Paulo de Oliveira Gomes***, Prof. Adjunto da Disciplina de Técnica Operatória Cirurgia e Experimentação do Departamento de Cirurgia da Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina - UniFesp/EPM pelos ensinamentos, incentivo e dedicação, sem o qual não teria iniciado na pesquisa experimental.

Ao amigo, ***Prof. Dr. Francisco das Chagas Valle, (In memoriam)***, pela oportunidade de desenvolvimento da minha formação acadêmica e profissional, um exemplo de mestre, pesquisador, criador e realizador de idéias.

Ao meu co-orientador ***Prof. Dr. Djalma José Fagundes***, coordenador do Programa de Pós-Graduação em Cirurgia e Experimentação da UNIFESP/EPM, pela gentileza e orientações tão importantes, pois foram primordiais para a realização deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

A amiga e ***Profa. Ms. Jeanete Moussa Alma*** mestre cuja vida é dedicada a educação, pelos ensinamentos, apoio e incentivos constantes, imprescindíveis para a realização desta tese, exemplo de amizade, prudência e experiência.

A ***Profa. Ms. Edna Paula Vital de Mattos***, Profa. da Disciplina de Histologia da UNIFMU, pelo auxílio boa vontade e orientação na leitura das Lâminas Histológicas.

Ao ***Prof. Dr. Moacyr Domingos Novelli***, Prof. da Disciplina de Patologia Geral da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo- FOU SP , pela colaboração na leitura das lâminas e auxílio na utilização do equipamento do Laboratório de informática dedicado a Odontologia.

A ***Profa. Dra. Gui Mi Ko*** , farmacêutica e bioquímica Responsável pela Área de Produção de Animais de experimentação do CEDEME/EPM, pelo fornecimento e orientação no manejo dos animais.

Ao Prof Nelson Passini, Prof. da Disciplina de Histologia, da Universidade Cidade de São Paulo, pelo apoio e colaboração na leitura da lâminas .

As alunas, amigas e futuras farmacêuticas ***Camila Pierina Mendes Moreira, Ana Carolina Gomes de Almeida, Cristiane A. B. Suizo*** pela grande amizade que conquistamos, e colaboração em todos os sentidos no que diz respeito a este trabalho .

A ***Profa. Ms. Maria Amélia Gurgel Neves***, (mestre em Estatística de Saúde) pelas informações tão valiosas de bioestatística, um exemplo de didática e paciência quanto as orientação nos estudos estatísticos.

A ***Elaine Maria Alves Bazzi Dantas***, secretária da Disciplina de Cirurgia e Experimentação da UNIFESP/EPM pela cooperação e incentivo.

A **Profa. Ms. Márcia Bento Moreira**, Pós-Graduanda do Programa de Cirurgia e Experimentação da UNIFESP-EPM, pelo companherismo e estímulo.

Aos funcionários da Universidade das Faculdades Metropolitanas Unidas, **José Minnicelli Neto, Hyoná Araújo de Souza, Cláudio Gomes Salles, Gustavo Ribeiro** pelo auxílio e dedicação prestada nos momentos mais tensos deste trabalho.

A **Profa. Dra. Helena Segreto**, Profa. Adjunto da Disciplina de Radioterapia da UNIFESP/EPM, pelo auxílio, e orientação quanto às sessões de radioterapia , pois, sem a colaboração , não seria possível a realização deste trabalho.

A **Sra. Judith Abdalla Gomes**, aluna e amiga do curso de Musicoterapia da Universidade das Faculdades Metropolitanas Unidas, que passou na hora certa, dia certo e momento certo em minha vida.

A minha irmã **Juliana Angélica Cornita**, que me apoiou do início ao fim, disponibilizando seu tempo para acompanhar-me nos dias do experimento.

Ao meu irmão **Marcelo Antonio Cornita**, que me ajudou na orientação e confecção final das fotos do projeto piloto.

Ao Sr. **Marcelo Borsari**, desenhista projetista, pelo auxílio no desenvolvimento do desenho da caixa de armazenamento dos animais.

A **Profa. Ms. Fátima Aparecida Neves Mendes Moreira**, especialista em lingüística e semi ótica da Universidade de São Paulo, pelas sugestões e auxílio nas correções de língua portuguesa.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Distribuição dos animais nos diferentes grupos de estudo.....	5
Figura 2 -	Foto mostra o grupo de 10 animais em caixa de madeira com tampa de acrílico de 20X20 (A); Colimador (B).....	8
Figura 3 -	Foto de 10 animais em posição sob o aparelho de ortovoltagem e prontos para iniciar a exposição à radiação. Unidade de Co ⁶⁰ (A); Colimador (B).....	9
Figura 4 -	Foto da Câmara Hiperbárica para uso veterinário Marca Atlas Equipamentos-modelo AN-700. Visores (A), termômetro (B), manômetros (C,D, E), chave geral (F, G), liga/ desliga, ventilador (H), cronômetro (I), Luz (J), válvulas (K,L,M).....	10
Figura 5 -	Foto dos animais no interior da Câmara Hiperbárica para uso veterinário, sob 2,4 Atmosfera Absoluta de pressão.....	11
Figura 6 -	Foto de um animal que mostra a incisão abdominal (seta).....	13
Figura 7 -	Foto de um animal que mostra o segmento de íleo a ser ressecionado (seta) e porção do intestino grosso, ceco (A).....	14
Figura 8 -	Vilosidade mostrando o epitélio simples (Ep) com células caliciformes (Ca) e lâmina própria (LP). As setas apontam a região da “borda em escova” formada pelas microvilosidades das células absorptivas ²¹	16
Figura 9	Fotomicrografia do segmento do íleo terminal do grupo I com corte no Sentido longitudinal mostrando a morfologia normal. Célula caliciforme (seta). (HE-100X).....	21
Figura 10-	Fotomicrografia do segmento do íleo terminal do grupo I mostrando morfologia normal. M= Músculo de Brücke.(HE-10X).....	21
Figura 11-	Fotomicrografia do segmento do íleo terminal, com corte no sentido longitudinal do grupo II, mostrando destruição da lâmina própria.....	22

Figura 12-	Fotomicrografia do segmento do íleo terminal com corte no sentido longitudinal do grupo II, mostrando infiltrado inflamatório (I) e edema intersticial (E). (HE-400X).....	22
Figura 13-	Fotomicrografia do segmento do íleo terminal do grupo III, mostrando hiperemia na camada muscular (H).(HE-100X).....	23
Figura 14 –	Fotomicrografia do segmento do íleo terminal do grupo III, notar intensa hiperemia na lâmina própria (setas).(HE-400X).....	23
Figura 15-	Fotomicrografia do segmento do íleo terminal do grupo IV, indicando atrofia de algumas vilosidades(setas).(HE-100X).....	24
Figura 16-	Fotomicrografia do segmento do íleo terminal do grupo IV indicando necrose (N) e hiperemia nuclear nos enterócitos (setas). (HE-400X).....	24

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Número de células calciformes encontradas em 20 vilosidades no grupo I- controle, grupo II- irradiado, grupo III-irradiado com OHB e grupo IV- irradiado sem OHB.....	18
Tabela 2 -	Valores expressos para o número de células calciformes encontradas nas unidades de estudo para os grupos GIII-irradiado com OHB e grupo IV-irradiado sem OHB.....	19

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ATA – atmosfera absoluta

cm – centímetro

Co - cobalto

g- grama

Gy- gray

HE-hematoxilina e eosina

H- teste de Kruskal –Wallis

μ- micrometro

Min-minuto

OHB – oxigenação hiperbárica

RT-radioterapia

RT/OHB – radioterapia e oxigenação hiperbárica

U-teste de Mann-Whitney

UNIFESP-EPM- Universidade Federal de São Paulo-Escola Paulista de Medicina

UNIFMU- Universidade das Faculdades Metropolitanas Unidas

RESUMO

OBJETIVO: Avaliar os efeitos da OHB em células caliciformes de íleo de camundongos após a exposição à radiação ionizante. **MÉTODO:** Foram utilizados 35 camundongos machos da linhagem C57BL, randomizados e distribuídos em quatro grupos: Grupo I, Controle (GC): 5 animais não irradiados, submetidos à observação por 24hs, seguidos de eutanásia e ressecção de um segmento de 2cm do íleo terminal. Grupo II, Irradiado (GRT): 10 animais submetidos a uma sessão de radioterapia com dose única de 5Gy e após 24hs de observação foram submetidos à eutanásia e ressecção de um segmento de 2cm do íleo terminal. Grupo III, Irradiado/ Oxigenação hiperbárica (GRT/OHB): 10 animais submetidos a uma sessão de radioterapia com dose única de 5Gy, após 24hs foram expostos a cinco sessões diárias de 90' de OHB, foram submetidos à eutanásia no 7º dia após a sessão de radioterapia, seguido de ressecção de um segmento de 2 cm do íleo terminal. Grupo IV, Irradiado/ Sem Oxigenação hiperbárica (GRT/SOHB): 10 animais submetidos a uma sessão de radioterapia com dose única de 5 Gy e no 7º dia após a sessão radioterápica foram submetidos a eutanásia e ressecção de um segmento de 2 cm do íleo terminal. Foram avaliadas as células caliciformes. Os testes estatísticos utilizados foram, análise de variância de Kruskal-Wallis e teste de Mann-Whitney, com $p \leq 0,05$. **RESULTADOS:** Ao comparar o número de células encontrados, pode-se observar que o Grupo IV > I > II > III, sendo que não existe diferença entre o grupo I e III. A média de células caliciformes encontradas nos grupos foram GI 6,21; GII 5,01; GIII 6,09; GIV 16,06. Os estudos demonstraram que o grupo IV apresentou uma hiperplasia das células caliciformes ($p \leq 0,05$). **CONCLUSÃO:** A exposição às radiações ionizantes provoca hiperplasia das células caliciformes. A oxigenação hiperbárica diminui as alterações encontradas nas células caliciformes do íleo de camundongos submetidos à radioterapia.

ABSTRACT

Objective: The aim of the present investigation was to analyze the effect of the radiance in the ileum calciforms cells of the male mice from the line C57BL. ***Methods:*** the mice was randomize and distributed in four groups: Group I, control (GC) : 5 animals no irradiated, under 24 hrs observation they are sacrificed and 2cm from terminal ileum was colleted. Group II, irradiated (GRT): 10 animals irradiated with a 5Gy single dose and after 24hrs observation they was sacrificed and 2cm from terminal ileum was colleted. Group III, irradiated/ hyperbaric oxygenic therapy (GRT/OHB): 10 animals irradiated with a 5Gy single dose, after 24hs they was exposed to 5 sections daily with 90' each, they was sacrificed after 7 days of the radiotherapy and 2cm from terminal ileum was colleted. Group IV, irradiated/ no hyperbaric oxygenic therapy (GRT/SOHB): 10 animals irradiated with a 5Gy single dose, they was sacrificed after 7 days of the radiotherapy and 2cm from terminal ileum was colleted. The Kruskal-Wallis variance test and Mann-Whitney test was used to analyzed the data observed. ***Results:*** When we match the number of cells, could be observed that the group IV>I>II>III, but that was not founded a difference between group I and III. The calciforms cells media founded in groups were GI 6,21; GII 5,01; GIII 6,09; GIV 16,06. The studs showed that the group IV demonstrated an hyperplasic from calciforms cells ($p<0,05$). ***Conclusions:*** The exposition to the ionic radiation induce an hyperplasic in the number of calciforms cells. The hyperbaric oxygen therapy induce a decreased of the morphological disturbance founded in the calciforms cells from mice terminal ileum exposed to the radiotherapy.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	1
2	OBJETIVOS.....	4
3	MÉTODO.....	5
4	RESULTADOS.....	19
5	DISCUSSÃO.....	26
6	CONCLUSÕES.....	30
7	REFERÊNCIAS.....	31
8	NORMAS ADOTADAS.....	33
	APÊNDICE.....	34
	ANEXO.....	38

1. INTRODUÇÃO

Radiobiologia é a área da Ciência que estuda os efeitos das radiações ionizantes sobre os seres vivos. Expostos às radiações, os tecidos biológicos apresentam alterações, interagindo diretamente com os componentes celulares (efeito direto) ou pela radiólise da água (efeito indireto) ¹.

As mudanças biológicas resultantes do efeito direto podem levar minutos a semanas e traduzem-se em alterações em que, no período de latência, as células não se apresentam seletivas, resultando lesões chamadas imediatas. Os efeitos indiretos podem levar meses ou anos, sendo conhecidas por lesões tardias ^{2,3}.

Apesar dos seus efeitos lesivos, a radioterapia vem assumindo um papel cada vez mais importante no tratamento das doenças neoplásicas com fim curativo ou paliativo ⁴.

A tolerância intestinal é um dos fatores limitantes para o tratamento radioterápico de tumores abdominais, pois a radiação provoca morte das células precursoras das criptas intestinais, que temporariamente não substituem aquelas perdidas nas vilosidades ^{1,5}.

Vários estudos foram feitos na tentativa de observar os efeitos adversos em que haja parâmetros para uma dosagem biológica mais adequada, a fim de diminuir os efeitos iatrogênicos e colaterais provocados por doses e tempos excessivos de exposição ⁶⁻⁹.

Entretanto, observou-se um número de células caliciformes das criptas que permaneceram constantes até 48 horas após a irradiação, quando houve uma queda de 6 % e, nas vilosidades, manteve-se constante até 72 horas, seguindo-se, na seqüência, uma queda de 5% destas células ¹⁰.

As células caliciformes são encontradas nos dois terços superiores das criptas e estão distribuídas entre os enterócitos das vilosidades, contendo glóbulos de mucina que são compostos que apresentam glicoproteínas e proteoglicanas em sua estrutura bioquímica. Estas agem como barreira química e lubrificante do lúmen intestinal, evitando assim que escarificações e/ ou lesões na mucosa possam vir a comprometer as funções fisiológicas deste órgão em seu citoplasma ^{11,12}.

No estudo histológico de reto de camundongos expostos aos raios X, com dose única de 400R, observou-se que a irradiação provoca alterações microscópicas em todas as camadas

do reto, sendo a mais sensível a mucosa, caracterizando uma variação no número de células caliciformes⁶.

Ao estudar as alterações nas criptas do jejuno de camundongos irradiado, corpo inteiro, com raios gama (⁶⁰Co), nas doses 4,5Gy, 9,0Gy e 12Gy, observou-se que nas três doses de radiação, o valor mínimo das figuras de mitose e da população de células das criptas foi obtido no primeiro dia depois da irradiação, quando o número de células necróticas também era maior¹³.

Diversos estudos têm sido realizados na tentativa de minimizar os efeitos adversos da radioterapia tais como, o efeito benéfico da oxigenação hiperbárica em lesões actínicas^{8,14}.

A oxigenação hiperbárica (OHB) consiste na oferta de oxigênio puro (FiO₂ = 100%) em um ambiente pressurizado a um nível acima da pressão atmosférica, habitualmente entre duas e três atmosferas^{15,16}.

A OHB é indicada, como tratamento principal ou coadjuvante, em diversas afecções agudas ou crônicas, de natureza isquêmica, infecciosa, traumática ou inflamatória, geralmente graves e refratárias aos tratamentos convencionais e que, freqüentemente, implicam elevados custos e prognósticos reservados^{15,16}.

Os efeitos colaterais, descritos em literatura, relacionados a OHB, consistem na variação da pressão e toxicidade do oxigênio. Esta última é relacionada à dose oferecida e ao tempo de exposição ao tratamento hiperbárico⁷,

Dentre as indicações, cientificamente reconhecidas para a OHB, encontra-se na resolução do Conselho Federal de Medicina (CFM), número 1.457/95, essa terapêutica utilizada em osteorradionecrose e lesões de tecidos por radiação, como radiodermites e retites ou cistites actínicas¹⁷.

No interesse destes estudos, o Laboratório de Radiologia da Universidade Federal de São Paulo, Escola Paulista de Medicina, desenvolveu uma linha de pesquisa para o estudo dos efeitos biológicos decorrentes da exposição às radiações ionizantes, em diversos órgãos. Concomitantemente, o programa de Pós-Graduação em Cirurgia e Experimentação da Universidade Federal de São Paulo, Escola Paulista de Medicina UNIFESP/EPM, vem estudando uma linha de pesquisa sobre o emprego da OHB nas lesões dos tecidos biológicos.

Desse esforço conjunto, surgiram outros estudos experimentais em ratos que avaliaram alterações morfológicas e morfométricas de lesões causadas por radiação em íleo terminal,

submetidas a OHB precocemente e a oxigenoterapia hiperbárica em lesões actínicas de cólon de ratas, confirmaram seu efeito protetor^{8,14}.

Entretanto não foram encontrados trabalhos em animal de experimentação que estudassem os efeitos, as alterações ou degenerações da mucosa intestinal e células caliciformes relacionando com OHB após radiações.

Nestas condições, propõe-se avaliar, em modelo experimental, os efeitos da OHB em alterações das células caliciformes do íleo de camundongos C57BL submetidos à radiação ionizante.

2.OBJETIVOS

Geral

Estudar os efeitos da Oxigenação hiperbárica em lesões causadas pela radiação ionizante.

Específico

Avaliar os efeitos da Oxigenação Hiperbárica nas lesões imediatas em células caliciformes de íleo de camundongos após exposição à radiação ionizante.

3. MÉTODO

Amostra

Os procedimentos foram avaliados e aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Hospital São Paulo – UNIFESP-EPM e protocolado sob o número 0104/05 datado em 22 de abril de 2005.

Foram utilizados 35 camundongos machos da linhagem C57BL, com 90 dias de idade pesando aproximadamente 25 gramas, oriundos do Biotério Central da Universidade Federal de São Paulo- Escola Paulista de Medicina – UNIFESP/EPM. Os animais foram mantidos em regime de confinamento e alojados em gaiolas, receberam água e ração peletizada balanceada *ad libitum* e oferecida dentro dos padrões indicados pelo fabricante; o ciclo circadiano e demais aspectos ambientais, obedecendo às normas do COBEA – Colégio Brasileiro de Experimentação Animal.

Os animais foram numerados e distribuídos por sorteio em quatro grupos:

Grupo I, Controle (GC): 5 animais não irradiados, submetidos à observação por 24hs, seguidos de eutanásia e ressecção de um segmento de 2cm do íleo terminal.

Grupo II, Irradiado (GRT): 10 animais submetidos a uma sessão de radioterapia com dose única de 5Gy e após 24hs de observação foram submetidos à eutanásia e ressecção de um segmento de 2cm do íleo terminal.

Grupo III, Irradiado/ Oxigenação hiperbárica (GRT/OHB): 10 animais submetidos a uma sessão de radioterapia com dose única de 5Gy, após 24hs foram expostos a cinco sessões diárias de 90' de OHB, foram submetidos à eutanásia no 7º dia após a sessão de radioterapia, seguido de ressecção de um segmento de 2 cm do íleo terminal.

Grupo IV, Irradiado/ Sem Oxigenação hiperbárica (GRT/SOHB): 10 animais submetidos a uma sessão de radioterapia com dose única de 5 Gy e no 7º dia após a sessão radioterápica foram submetidos à eutanásia e ressecção de um segmento de 2 cm do íleo terminal.

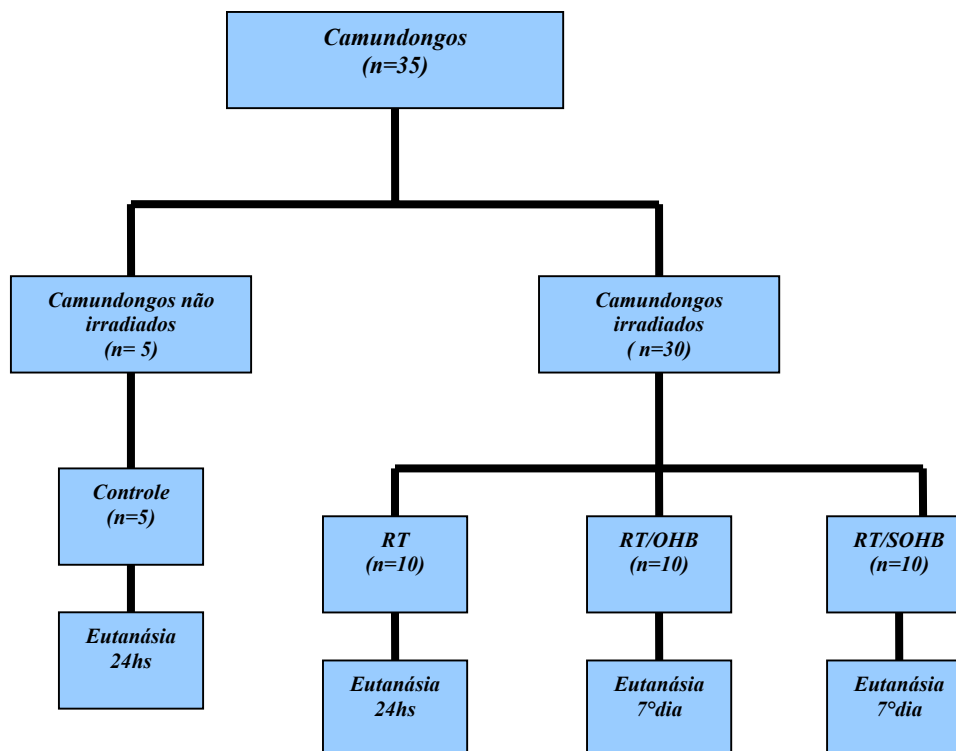


Figura 1 – Distribuição dos animais nos diferentes grupos de estudo.

Procedimento de Radioterapia

Os animais do Grupo II, III e IV, foram pesados e transportados em gaiolas de 40X30X25cm para o serviço de Radiobiologia da Universidade Federal de São Paulo – UNIFESP-EPM.

Os camundongos foram colocados em caixas de madeira de 20x20 com tampa de acrílico e divisões internas que possibilitam a imobilização dos mesmos, sem necessidade de anestesia ¹⁸. (Figura 2)

Foram submetidos à radiação gama no primeiro dia de experimento em aparelho de telecobaltoterapia da marca CGR, modelo Alcyon II, contendo fonte de ⁶⁰Co com rendimento de 1,60 Gy/min, em campo 20 x 20cm, à distância foco de 80cm da fonte. Os Grupos II e III foram observados 24hs e o Grupo IV, observado por 7 dias, após exposição à radioterapia seguidos de eutanásia e submetidos à ressecção de 2cm do íleo.

Foram irradiados com a dose única de 5Gy ¹⁴ em corpo inteiro, calculado em todo volume corporal, com a técnica de paralelo oposto que distribui a dose de radiação de maneira homogênea.

Procedimento de Oxigenoterapia

Os animais do Grupo-III (Radioterapia e Oxigenação hiperbárica) após exposição à radioterapia foram pesados e levados a Clínica especializada em Oxigenoterapia Hiperbárica *. Foram colocados em grupos com 10 animais, sem anestesia, em Câmara Hiperbárica para uso Veterinário ** (Figura 4), foram expostos a OHB a 2,4 ATA⁸ atmosferas absolutas, por noventa minutos diários, durante cinco dias e submetidos à eutanásia no 7º dia após exposição à radioterapia.

* Veterinária Especializada em Oxigenoterapia Hiperbárica localizada à Rua Ribeiro do Vale, 1231 – São Paulo.

** Marca Atlas Equipamentos Ltda, Modelo AN-700

Procedimentos para o grupo controle

Os animais do Grupo I foram submetidos à observação por 24 hs, seguidos de ressecção de um segmento de 2 cm do íleo terminal seguidos de eutanásia , com excessão da irradiação.



Figura 2 – Foto mostra o grupo de 10 animais em caixa de madeira com tampa de acrílico de 20X20 (A); Colimador (B).



Figura 4 - Foto da Câmara Hiperbárica para uso veterinário Marca Atlas Equipamentos-modelo AN-700. Visores (A), termômetro (B), manômetros (C,D, E), chave geral (F, G) liga/desliga, ventilador (H), cronômetro (I), Luz (J), válvulas (K,L,M).

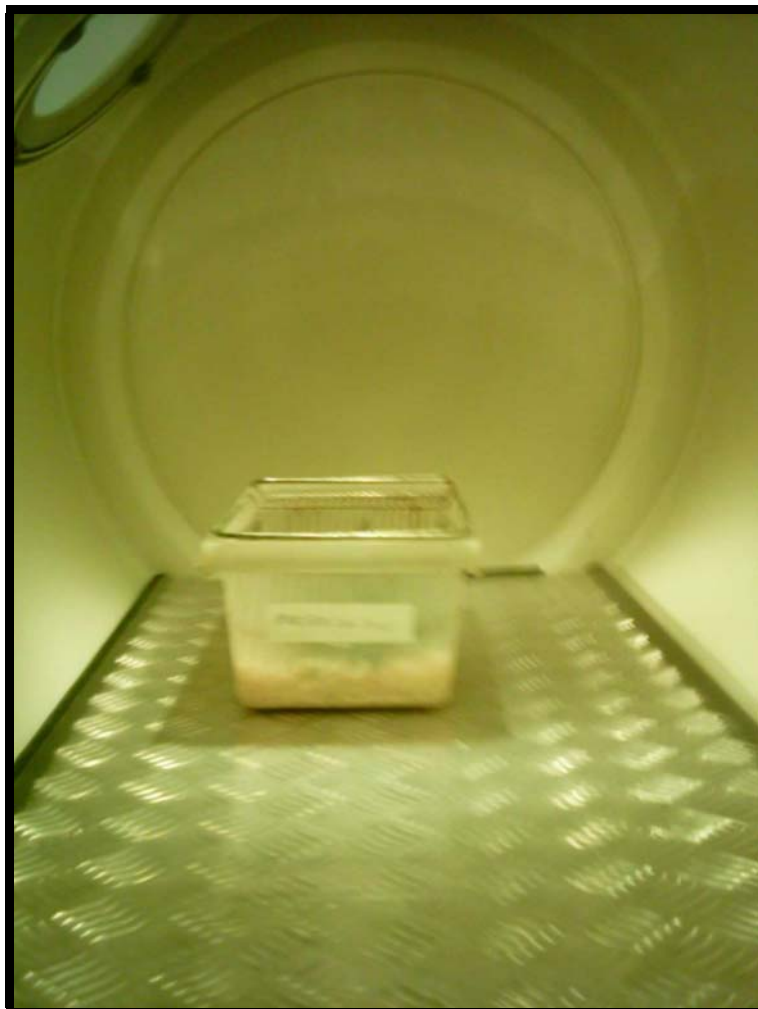


Figura 5 - Foto dos animais no interior da Câmara Hiperbárica para uso veterinário, sob 2,4 atmosfera absoluta de pressão.

Eutanásia

Foi praticada a eutanásia por estiramento da coluna cervical e os animais foram fixados em uma superfície coberta com parafina, em decúbito dorsal horizontal, por meio de agulhas transfixadas nas patas (Figura 6).

Os pêlos da parede ventral do abdome foram cortados rente à pele. A seguir, por meio de uma incisão abdominal retirou-se 2,0 cm do íleo.

Uma laparotomia, através de uma incisão longitudinal mediana, foi feita com bisturi de lâmina 15, com 5cm de extensão, interessando pele, tela subcutânea, linha alba e peritônio parietal, o afastamento da parede abdominal e conseqüente exposição da cavidade abdominal foi realizada com o auxílio de agulhas fixadas na superfície de parafina.

Em cada animal foi identificado um segmento de íleo terminal com limite caudal à junção da válvula íleo-cecal. (Figura 7).



Figura 6 – Foto de um animal que mostra a incisão abdominal (seta).

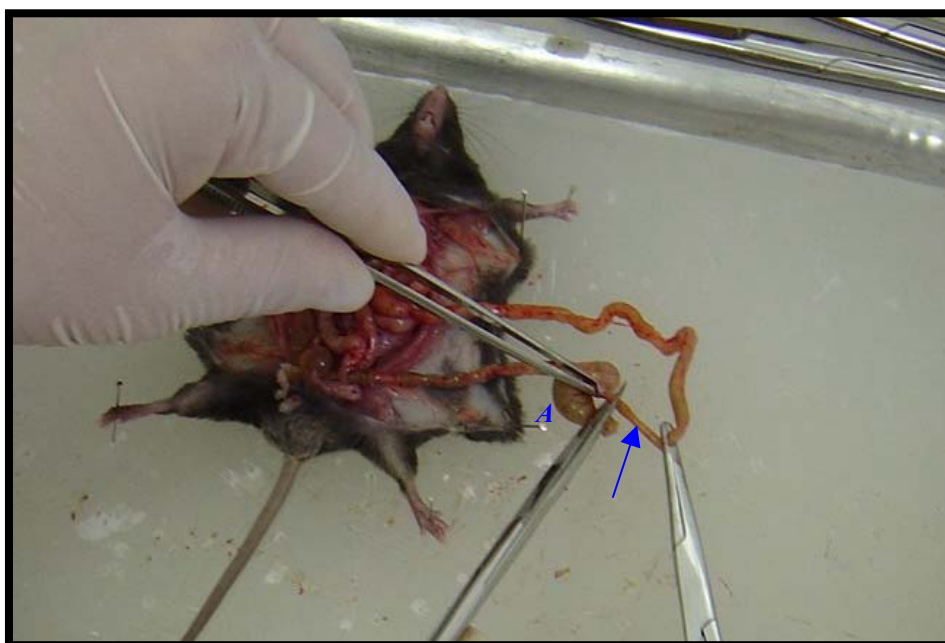


Figura 7- Foto de um animal que mostra o segmento de íleo a ser ressecionado (seta) e porção do intestino grosso, ceco (A).

Coleta do Material

O segmento do íleo foi lavado e retirado em solução salina de cloreto de sódio 0,9% e fixado em formol tamponado a 10% por vinte e quatro horas e logo submetido à preparação das lâminas incluindo a desidratação em álcool etílico, diafanização em xilol e impregnação em parafina histológica.

Os blocos foram seccionados com micrótomo rotativo, ajustado para 3 μm de espessura. As lâminas assim obtidas foram coradas com Hematoxilina e Eosina (HE), e observadas em microscópio de luz e utilizados para a descrição morfológica de todas as camadas do íleo.

A análise dos dados microscópicos foram realizadas no Laboratório de Patologia Bucal da Universidade de São Paulo por um patologista e pelo pesquisador.

Os critérios de avaliação incluíram a descrição morfológica qualitativa quanto à lesão das vilosidades intestinais, edemas e infiltrado inflamatório na lâmina própria.

A avaliação morfométrica foi realizada avaliando-se a quantidade de células epiteliais da mucosa do íleo, células caliciformes, contadas em 20 vilosidades em aumento de 400 X selecionando de modo aleatório nas lâminas obtidas de cada animal de cada grupo.

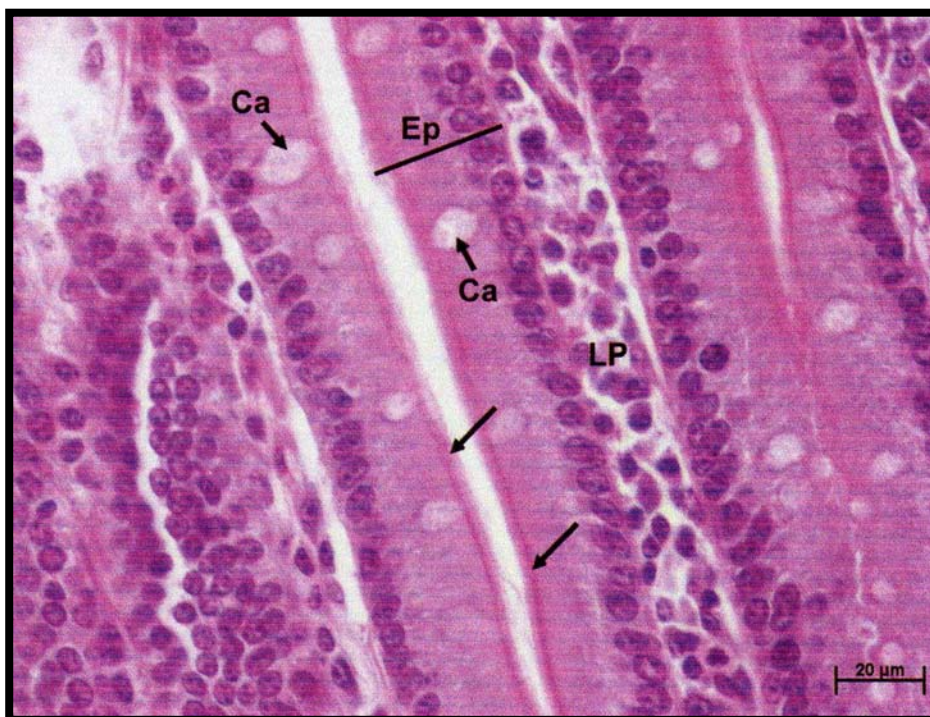


Figura 8 – Vilosidade mostrando o epitélio simples (Ep) com células caliciformes (Ca) e lâmina própria (LP). As setas apontam a região da “borda em escova” formada pelas microvilosidades das células absortivas ²¹. (HE-400X)

ESTUDO ESTATÍSTICO

Para análise dos resultados foram aplicados os seguintes testes:

- 1- Análise de variância de Kruskal-Wallis ¹⁷ para comparar os quatro grupos em relação ao número de células caliciformes de 20 vilosidades.
- 2- Teste de Mann-Whitney ¹⁷ para comparar os valores do grupo RT e RT/OHB em relação ao número de células caliciformes de 20 vilosidades.

Fixou-se em $\alpha \leq 0,05$ o nível de rejeição da hipótese de nulidade, assinalando-se com um asterisco os valores significantes.

4. RESULTADOS

Tabela 1 - Número de células calciformes encontradas em 20 vilosidades no grupo I- controle, grupo II- irradiado, grupo III- irradiado com OHB e grupo IV- irradiado sem OHB.

	<i>Grupo I</i>	<i>Grupo II</i>	<i>Grupo III</i>	<i>Grupo IV</i>
	5,5	3	3,95	12,8
	5,5	3,85	5,25	14,75
	5,95	4,25	5,55	15,25
	6,75	4,4	5,7	15,3
	7,35	4,75	5,8	15,45
		5,35	5,9	17,1
		5,35	6,3	17,1
		5,6	6,45	17,15
		5,95	7,8	17,6
		7,55	8,15	18,05
<i>Média de células</i>	<i>6,21</i>	<i>5,01</i>	<i>6,09</i>	<i>16,06</i>

Análise de Variância por Postos de Kruskal-Wallis (H)

$$H_0 : \mu_1 = \mu_2 = \mu_3 = \mu_4$$

$$H_a : \mu_i \neq \mu_j, \text{ para algum } i \neq j$$

$$H \text{ calculado} = 23,59006 *$$

$$H \text{ crítico} = 7,81$$

$$I > II$$

$$III > II$$

$$IV > I > II > III$$

$$I = III$$

Tabela 2: Valores expressos para o número de células caliciformes encontradas nas unidades de estudo para o grupo GIII – irradiado com OHB e grupo IV – irradiado sem OHB.

GIII	RT+OHB	GIV	RTSOHB
3,95	1	12,8	11
5,25	2	14,75	12
5,55	3	15,25	13
5,7	4	15,3	14
5,8	5	15,45	15
5,9	6	17,1	16,5 *
6,3	7	17,1	16,5 *
6,45	8	17,15	18
7,8	9	17,6	19
8,15	10	18,05	20
	55		155

* médias dos postos, usadas quando há duplicação de valores

Teste de Mann-Whitney (U)

$$N_1 = N_2 = 10 > 8 \Rightarrow U \sim N (0,1)$$

$$U \text{ calculado} = 100$$

$$R_1 = 55$$

$$\bar{X} U = 50$$

$$SU = 13,229$$

$$Z \text{ calculado} = 3,78 *$$

$$Z \text{ crítico} = 1,96 (\alpha = 5\%)$$

III < IV

Nos animais do Grupo I (Figura 9). A Camada mucosa apresenta características de normalidade com distribuição uniforme de células caliciformes, as vilosidades alongadas e glândulas de Lieberkün estão íntegras. A camada muscular apresenta característica de normalidade (Figura 10). As vilosidades em que se observam os epitélios de revestimento apresentam características de normalidade, lâmina própria íntegra com nitidez da extensão completa do músculo de Brücke (M).

Entretanto nos animais do Grupo II as vilosidades exibem destruição e atrofia da lâmina própria. A camada muscular encontra-se íntegra sem evidência de exsudato inflamatório (Figura 11). Observa-se infiltrado inflamatório (I) mononuclear difuso na lâmina própria, edema intersticial (E) e integridade dos enterócitos (Figura 12).

Nos animais do Grupo III, pode-se perceber uma hiperplasia das vilosidades e uma evidente hiperemia (H) na camada muscular. (Figura 13), e Intensa hiperemia. (seta) na lâmina própria e exsudato inflamatório discreto. (Figura 14)

Nos animais do Grupo IV, observamos na (Figura 15) atrofia (setas) e irregularidade da distribuição de algumas vilosidades. Todavia na vilosidade observa-se uma área focal de necrose (N) na lâmina própria e hipercromatismo (seta) nuclear nos enterócitos. (Figura 16).

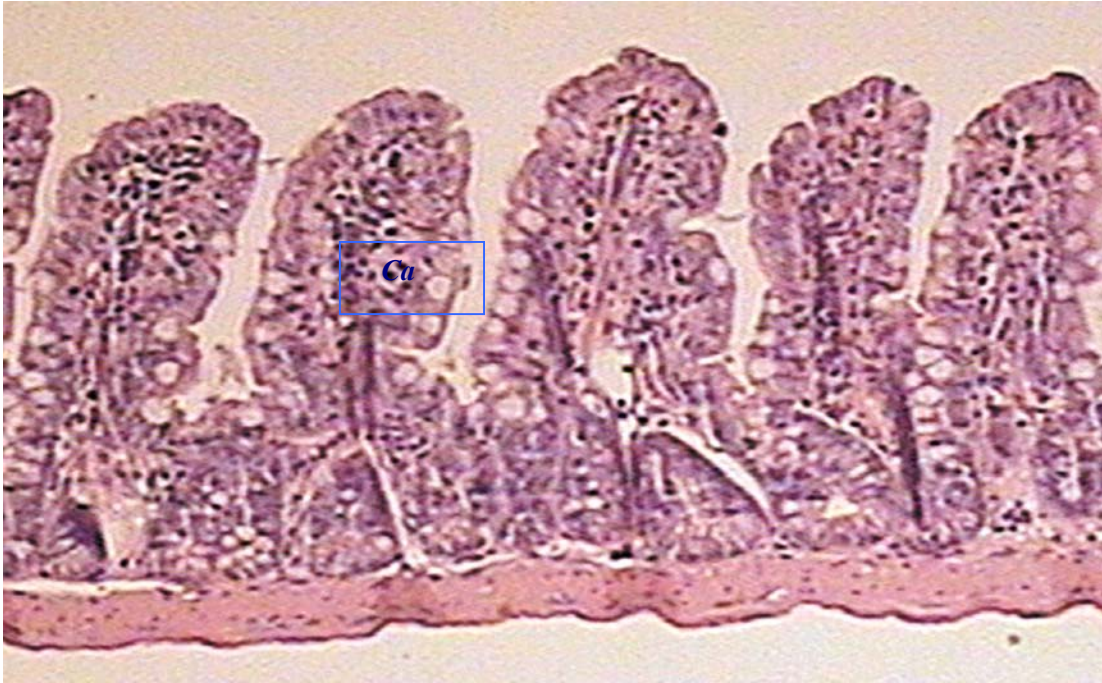


Figura 9- Fotomicrografia do segmento do íleo terminal do grupo I com corte no sentido longitudinal mostrando a morfologia normal. Célula caliciforme (Ca). (HE-100X).



Figura 10- Fotomicrografia do segmento do íleo terminal do grupo I mostrando morfologia normal. M= Músculo de Brücke.(HE -400X).

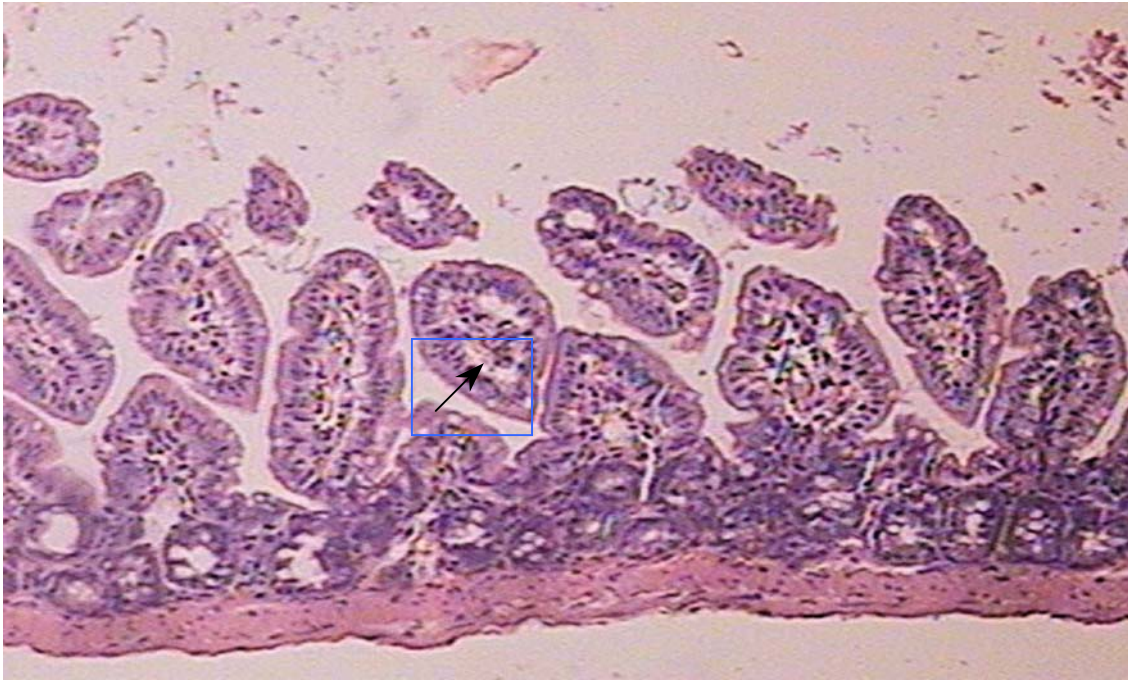


Figura 11- Fotomicrografia do segmento do íleo terminal, com corte no sentido longitudinal do grupo II, mostrando destruição da lâmina própria (seta) (HE-100X).

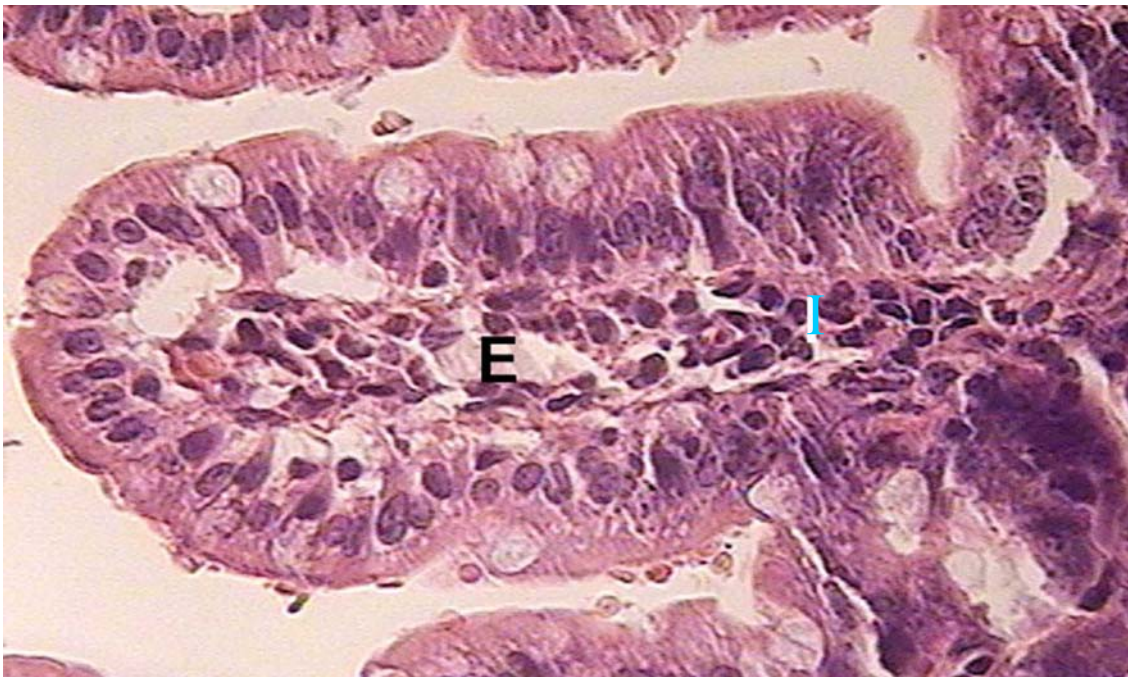


Figura 12- Fotomicrografia do segmento do íleo terminal com corte no sentido longitudinal do grupo II, mostrando infiltrado inflamatório (I) e edema intersticial (E). (HE-400X).



Figura 13- Fotomicrografia do segmento do íleo terminal do grupo III, mostran do hiperemia na camada muscular (H).(HE-100X)

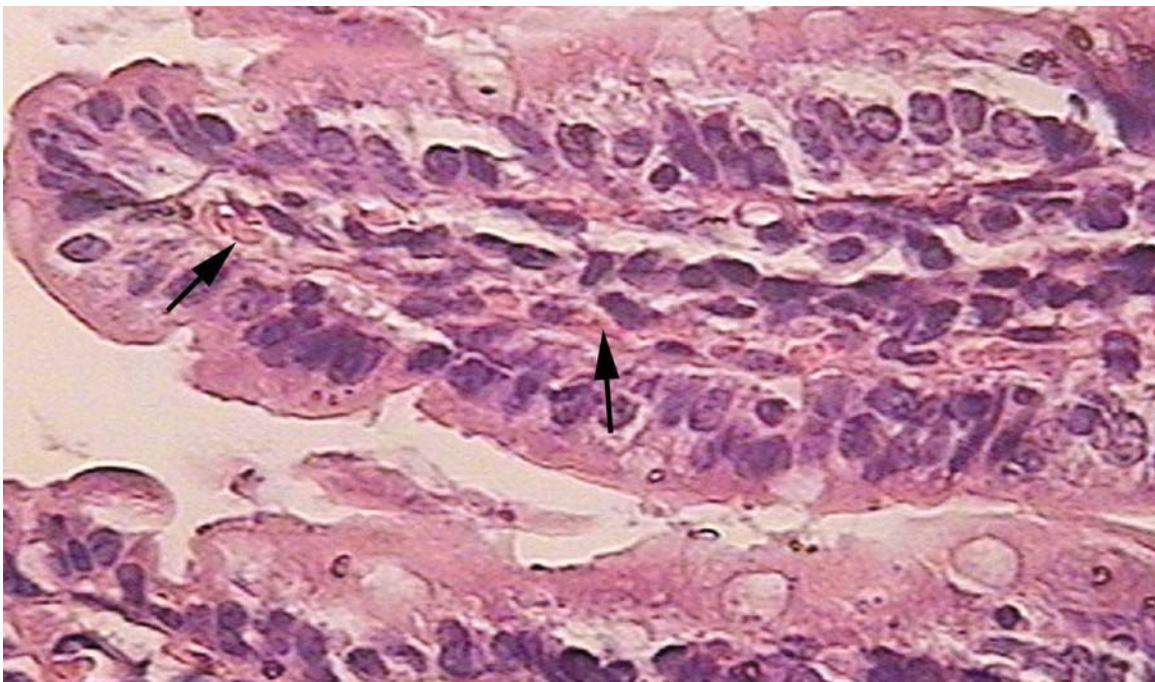


Figura 14 – Fotomicrografia do segmento do íleo terminal do grupo III, notar intensa hiperemia na lâmina própria (setas).(HE-400X).



Figura 15- Fotomicrografia do segmento do íleo terminal do grupo IV, indicando atrofia de algumas vilosidades(setas).(HE-100X).

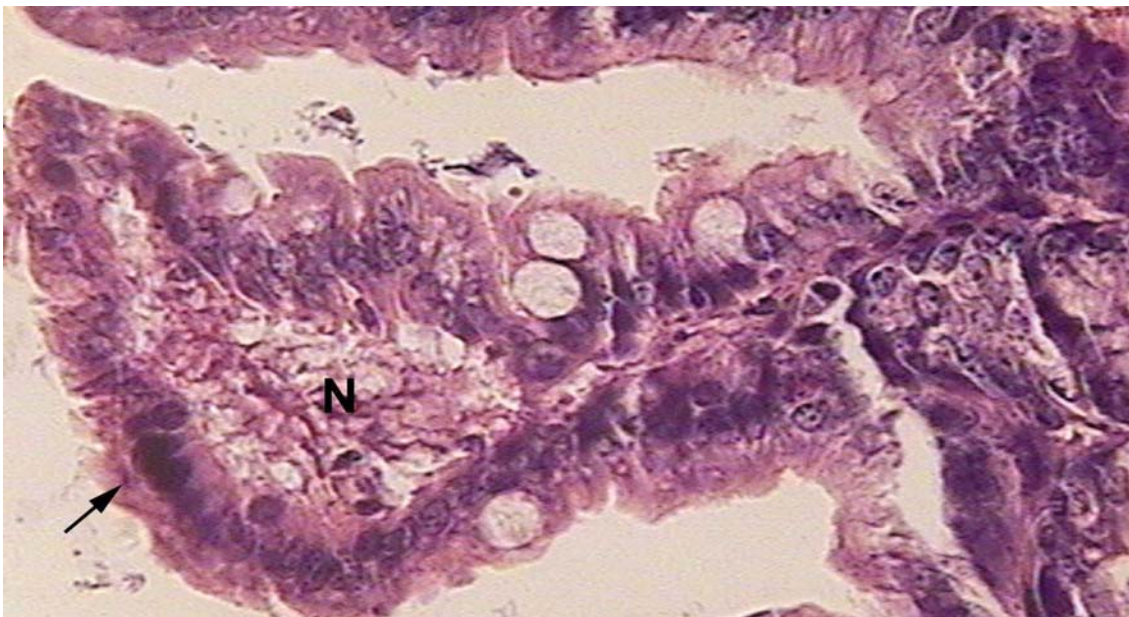


Figura 16- Fotomicrografia do segmento do íleo terminal do grupo IV indicando necrose (N) e hiperemia nuclear nos enterócitos (setas). (HE-400X).

5. DISCUSSÃO

Os camundongos C57Bl têm sido utilizados com freqüência em estudo dos efeitos biológicos conseqüentes à exposição às radiações, em diversos órgãos e, em especial, no trato gastrintestinal, por serem altamente radiosensíveis²⁰.

As vantagens da escolha desta linhagem de camundongos, para a realização desses experimentos, consistem no fato de serem animais isogênicos, de pequeno porte e fácil manuseio²⁰.

O interesse em se estudar o intestino delgado deu-se pelo fato de suas características histomorfológicas, pois possui grande importância na reabsorção de alimentos e fármacos. Tal característica pode ser observada mediante o estudo de sua arquitetura histológica.

Em particular no íleo, porção terminal do intestino delgado, podem ser identificadas as vilosidades, as criptas e a zona do colo, onde as criptas e as vilosidades se mesclam^{11,12,21,27}.

Um dos pontos relevantes do conhecimento da resposta intestinal à ação das radiações ionizantes é que esta varia dependendo do seguimento comprometido, seja pela lesão celular ou pela falta da capacidade de recuperar o tecido lesionado^{22-24,28}.

Nos tratamentos clínicos a previsão de tais ocorrências torna-se importante, não somente para a aplicação terapêutica adequada, como também na minimização de eventuais seqüelas. Muito embora, evitar doses elevadas de radiação torna-se impossível em virtude das lesões neoplásicas vigentes e do estado geral do paciente.

Torna-se desejável que intervenções que visem minimizar os efeitos colaterais provocados pela radiação ionizante sejam aplicadas no sentido de pronto restabelecer o tecido lesado²⁹.

A fim de se obter parâmetros preliminares para a dose adequada, estudos experimentais têm se mostrado grandes aliados na padronização de protocolos clínicos que possam contribuir na elucidação de medidas adequadas. Os camundongos C57BL são normalmente utilizados devido ao seu perfil genético sensível à radioterapia: o intestino apresenta-se característico como o de

qualquer outra linhagem mucosa com vilosidades alongadas, delgadas, revestidas por enterócitos, cujos núcleos são basais.

Nota-se ainda células caliciformes na base da cripta e células indiferenciadas. Sendo a lâmina própria vascularizada por linfáticos e capilares, a submucosa é composta por tecido conjuntivo frouxo, com escassos linfócitos; e a camada muscular é representada por fibras, enquanto que na serosa o epitélio é simples sendo as células achatadas.

Ao utilizar camundongos C57BL, alguns autores observaram que após 72 horas de exposição à radiação, as criptas das células caliciformes encontravam-se restabelecidas, o que não ocorreu neste estudo: após 8 dias, as células permaneciam desorganizadas, referente a lâmina própria que permanecia lesionada, pois havia uma atrofia acentuada, além de necrose e hiperchromatismo nucleares nos enterócitos que puderam ser observadas à luz da microscopia¹⁰.

O levantamento bibliográfico de Neto1988, nos alerta sobre as discrepâncias encontradas em literatura e ressalta que vários são os autores que afirmam, como neste caso, que as lesões provocadas por exposição à radiação ionizante permanecem até por meses⁶.

Neste estudo, os animais do grupo irradiado apresentaram alterações morfológicas, além de hiperplasia das células caliciformes refletidas no aumento das criptas. Nota-se que 24 horas após a irradiação há claramente alterações significativas como vilosidades com destruição da lâmina própria e atrofia, infiltrado inflamatório mononuclear difuso da lâmina própria edema e edema intersticial. Todos esses achados são antagônicos aos de Neto (1988) que considera essas características não dignas de nota.

Neste trabalho também verificou-se que a radiação provocou morte das células precursoras das criptas intestinais, que temporariamente não substituem aquelas perdidas nas vilosidades, levando o encurtamento das vilosidades intestinais e diminuição da superfície de absorção¹.

Embora clinicamente ocorra diarreia, que pode levar a desidratação, sangramento e aumento do risco de infecção, nas observações não se obteve nenhuma intercorrência deste tipo.

A observação feita à luz da microscopia, no 7º dia, após a irradiação, evoluiu histologicamente para atrofia e irregularidade da distribuição de algumas vilosidades em que se observa necrose na lâmina própria e hiperchromatismo nuclear dos enterócitos.

Os achados coadunam com os do autor, que também descreve lesão na camada muscular e alerta quanto aos riscos de granulação, fibrose, aderência e estenose, que podem causar obstrução a partir de uma dose de tolerância, em que a mucosa possa vir a se recuperar ¹.

Pode-se notar que o autor, ao observar as alterações nas criptas do jejuno de camundongos irradiados corpo inteiro, com raios gama nas doses de 4,5Gy, 9Gy e 12Gy, verificou no segundo dia que a recuperação parcial foi vista nos três parâmetros estudados (mitoses, números de criptas e células necróticas) ¹³.

A recuperação foi completa no oitavo dia em camundongos submetidos a 4,5 Gy e, os submetidos com dose de 12 Gy, não sobreviveram ¹³. Tais achados não vêm de encontro aos resultados obtidos, pois utilizando 5 Gy a recuperação não foi observada no oitavo dia e o segmento intestinal, utilizado no experimento, possui mais intensamente as atividades fisiológicas, o que compromete sobremaneira a estrutura organizacional do íleo.

Partindo do referencial teórico, imaginou-se um modelo experimental para verificar a eventual correlação das células intestinais submetidas a aplicação de radiação ionizante, agregando a um projeto terapêutico com oxigênio hiperbárico, de modo que, pela características teóricas, sua ação poderia proteger estas células intestinais dos efeitos da radiação.

A OHB provoca aumento das taxas de oxigenação tecidual e já foi utilizada concomitantemente a aplicação de radioterapia, pois amplificada em duas ou três vezes, seu efeito nos tecidos tumorais, induziu um aumento da lesão celular produzida pelos radicais livres e maior efetividade do tratamento por radiações ionizantes ^{1,25,30}.

Em contra partida, estudo experimental em ratos avaliou alterações morfológicas e morfométricas de lesões actínicas tardias em íleo terminal submetidos à OHB precocemente, confirmando seu efeito protetor ⁸.

A revisão da literatura é escassa na relação entre tratamento de alterações morfológicas com OHB há um grande numero de artigos publicados sobre o assunto, porém a maioria resume-se a descrições de casos e ensaios clínicos .

Assim, pareceu oportuno criar um modelo experimental relacionando tecidos biológicos submetidos a radiações ionizantes com OHB.

O modelo de alterações induzidas pela radiação procurou simular uma situação que ocorre em seres humanos que necessitam submeter-se a radioterapia para tratamento de tumores pélvicos. Procurou-se estabelecer um paralelo entre a dose empregada de radiação, que foi reforçado por relatos que estimam em 5% o risco de complicações com dose total entre 60 a 65Gy ²⁶. A escolha da dose usada foi semelhante à primeira sessão do trabalho em que utilizou a OHB para o tratamento de lesões actínicas em colo de ratas ¹⁷.

Ao avaliar os animais do grupo Oxigenação Hiperbárica pôde-se notar que a OHB promoveu, de algum modo, uma melhora na evolução das alterações induzidas pela radiação ionizante, pois no íleo irradiado ocorreu um aumento significativo das células calciformes contadas em 20 vilosidades.

Este trabalho podem ser comparado ao do autor, pois a ação do oxigênio hiperbárico favoreceu uma recuperação mais rápida dos estágios inflamatórios, que se traduziu por alterações menos intensas na avaliação morfológica ¹⁷.

Considerando a análise dos resultados obtidos, percebe-se que o modelo de alterações morfológicas em íleo de camundongos foi adequado para o estudo e pode ser utilizado em outros protocolos de pesquisa.

A oxigenação hiperbárica mostrou uma participação benéfica discreta, e poderá ser melhor explorada em trabalhos futuros sobre a evolução das alterações morfológicas de células intestinais induzidas por radiação. Notou-se que numa primeira sessão de radioterapia ocorrem alterações morfológicas significantes e capazes de causar prejuízo, sendo que exposições acidentais podem causar lesões intestinais de diferentes intensidades; dependendo da dose, nos casos mais graves, podem levar à morte os indivíduos expostos, em alguns dias, pela instalação da chamada Síndrome Aguda das Radiações ²⁰.

Novos trabalhos se fazem necessários, quanto à dosagem, períodos mais longos e aplicação da OHB em lesões causadas pela radioterapia.

6. CONCLUSÕES

- 1 - A exposição às radiações ionizantes provoca hiperplasia das células caliciformes.
- 2 - A oxigenação hiperbárica diminui as alterações encontradas nas células caliciformes do íleo de camundongos submetidos à radioterapia.

7. REFERÊNCIAS

1. Segreto HRC, Segreto RA. Revisão e atualização em radiobiologia. Aspectos celulares, moleculares e clínicos - A folha médica, 2000;119:9-27.
2. Albuquerque LF. Radioterapia. Tratado de oncologia genital e mamária. São Paulo, 1995. 386-8.
3. Localio AS, Pachter HL, Gouge TH. The radiation-injured bowel. Surg annual. 1979;11:181-205.
4. Hunt TK, Pai MP. The effect of varying ambient oxygen tensions on wound metabolism and collagen synthesis. Surg Gynecol Obstet. 1972;135:561-7.
5. Jacobsen GK et al. Increased incidence of sarcoma in patients treated for seminoma. Ugesks Laerger. 1994;6:809-12.
6. Neto AAC, et al . Estudo histológico do reto de camundongos expostos aos raios X, dose única. Acta Cir Bras. 1988;3:64-72.
7. Tibbles PM, Edelsberg JS. Hyperbaric oxygen therapy. N Engl J Méd. 1996;334:1642-8.
8. Feldmeier DA, et al. Histologic morphometry confirms a prophylactic effect for hyperbaric oxygen in the prevention of delayed radiation enteropathy. Undersea Hyper Med. 1998;25:93-7.
9. Quastler H. The nature of intestinal radiation death. Radiat Res. 1956;4:303-20.
10. Montagna W, Wilson JW. A cytologic study of the intestinal epithelium of the mouse after total body X irradiation. J Nat Cancer Inst. 1955;15:1703-18.
11. Alan S, Lowe J. Histologia humana. São Paulo, 2001, 202-7.
12. Becker, PFL. Patologia geral. São Paulo, 1997 ,130.
13. Nandchahal, K. Crypt cell population changes in the mouse jejunum during injury and repair after whole body gamma irradiation. Radiobiol Radiother. 1990;31:337-9.
14. Pereira MLL, Scheidt TC, Simões MJ, Mosquette R, Gomes PO. Oxigenoterapia hiperbárica em lesões actínicas de colo de ratas: aspectos morfológicos. Acta Cir Bras. 2004;19:658-63.
15. Junior MR, Marra AR. Quando indicar a oxigenoterapia hiperbárica. Rev Assoc Méd Bras. 2004;50:3.
16. Kindwall EP. Hyperbaric oxygen's effect on radiation necrosis. Clin Plast Surg. 1993;20:473-83.
17. Brito T. Hiperbárica/oxigenoterapia hiperbárica: “Uma modalidade terapêutica ainda desconhecida” , Jornal de Medicina do CFM. 2002.
18. Mattos MD, et al. Ativação da proteína TGFβ1 latente em pulmão irradiado in vivo. Rev Assoc Med Bras. 2002;4:1-18.
19. Spiegel MR. Estatística; tradução e revisão técnica – São Paulo. 1993; 569 -71.

20. Kim SB, Barone B, Segreto HRC, Silva MRR, Egami MI, Segreto, RA, Juliano Y. Morfologia e morfometria da parede do íleo terminal de camundongos expostos aos raios X. *Acta Cir Bras*. 1994;9:174-82.
21. Santelli, GMM. *Histologia - Imagens em foco*. São Paulo, 2003, 132-37.
22. Kinsella TJ, Bloomer WD. Tolerance of the intestine to radiation therapy. *Surg Gynecol Obstet*. 1980;151:273-84.
23. Trier JS, Browning TH. Morphologic response of the mucosa of human small intestine to X-ray exposure. *J Clin Invest*. 1966;45:194-99.
24. Mitchell Jr. The effect irradiation on the gastrointestinal tract. *Clin Obstet Gynecol*. 1972;15:674-91.
25. Bernstein EF, Sullivan FJ, Mitvhell JB, Salomon GD, Glatstein E. Biologic of chronic radiation effect on tissues and wound healing. *Clin Plast Surg* 1993; 20:435-53.
26. Nguyen NP, Antonie JE, Dutta S, Karisson U, Sallah S. Current concepts in radiation enteritis and implications for future clinical trials. *Cancer* 2002;95:1151-63.
27. Allen-Mersh TG, Wilson MRCP, Hope-Stone HF, Mann CV. The management of late radiation- induced rectal injury after treatment of carcinoma of the uterus. *Surg Gynecol Obstet*. 1987;164:521-24.
28. Bloomer WD, Hellman S. Normal tissue responses to radiation therapy. *N Engl J Med*. 1975;293:80-3.
29. Enokihara MMSS, Pacheco LP, Segreto RA . Contagem de núcleos de células do tubo contorcido proximal de rins de camundongos antes e depois da exposição aos raios X. *Rev Bras Cienc Morfol*. 1991;8:33-7.
30. Mafffei FHA- Oxigenoterapia hiperbarica . *J Vsc Br*. 2003;3:169.

8.NORMAS ADOADAS

BIREME (BRA). DeCS- Descritores em ciências da saúde [serial online] 2001. Disponível em : URL: <http://www.bireme.br>.

CONSELHO NACIONAL DE SAÚDE . Resolução n°01/88: normas de pesquisa em saúde. Bioética 1995; 3: 137-54.

COLÉGIO BRASILEIRO DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (COBEA). Manual para técnicas em bioterismo. São Paulo (SP): Yellow Grafh 1996; 259p.

FAGUNDES DJ. Normas para citações e referências [edição eletrônica-disquete]. São Paulo (SP): UNIFESP-EPM-TOCE; 2001. Disponível em <http://www.unifesp.br/dcir/toce/pg>.

FAGUNDES DJ. Normas para elaboração de relatório de pesquisa [edição eletrônica-disquete].São Paulo (SP): UNIFESP-EPM-TOCE; 2001. Disponível em <http://www.unifesp.br/dcir/toce/pg>.

UNIFORM REQUIREMENTS FOR MANUSCRIPTS SUBMITTED TO BIOMEDICAL JOURNALS DO INTERNATIONAL COMMITTEE OF MEDICAL JOURNAL EDITORS (www.icmje.org). 2004

APÊNDICE

PROTOCOLO I ***Radioterapia***

Data do procedimento:

Identificação do animal

Número :

Grupo:

Peso:

Descrição do ato operatório:

Início :

Término:

Intercorrências:

PROCOLO II**OBSERVAÇÃO PÓS-RADIAÇÃO*****Data do procedimento:******Identificação do animal :***

Número:

Grupo:

Peso:

Transporte:

Local :

Tempo:

Intercorrências:

Exposição :

Dia :

Tempo:

Dose:

PROTOCOLO III***OXIGENOTERAPIA HIPERBÁRICA******Data do procedimento :******Identificação do Animal***

Número :

Grupo:

Peso:

Dia de exposição:***Tempo de compressão:******Valores pressóricos:******Tempo de exposição:******Tempo de descompressão:******Intercorrências:***

PROTOCOLO IV***EUTANASIA******Data do procedimento:******Identificação do animal :***

Número:

Grupo:

Peso:

Dia de observação :***Diarréia :***

Presente ()

Ausente ()

Sangue ()

Muco ()

Intercorrências:

ANEXO