

RAFAEL PANISI DE CAMPOS MEIRELLES

**MODELO EXPERIMENTAL DE
RADIODERMATITE EM COELHOS**

**Tese apresentada à
Universidade Federal de São Paulo
para obtenção do título de
Mestre em Ciências**

SÃO PAULO

2015

RAFAEL PANISI DE CAMPOS MEIRELLES

**MODELO EXPERIMENTAL DE
RADIODERMATITE EM COELHOS**

**Tese apresentada à
Universidade Federal de São Paulo
para obtenção do título de
Mestre em Ciências**

ORIENTADORA: Profa. Dra. Lydia Masako Ferreira

CO-ORIENTADORES: Prof. Dr. Alfredo Gagnani Filho

Prof. Murillo Francisco Pires Fraga

SÃO PAULO

2015

Meirelles, Rafael Panisi de Campos.
Modelo Experimental de Radiodermatite em Coelhos. / Rafael Panisi de Campos Meirelles. – São Paulo, 2015
xv, 58f.

Tese (Mestrado) –Universidade Federal de São Paulo. Programa de Pós-Graduação em Cirurgia Translacional.

Título em inglês: Experimental model of radiodermatitis in rabbits .

1. Lesões experimentais por radiação 2. Coelhos
3. Radiodermatite 4. Experimental 5. Modelos Animais

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIRURGIA TRANSACIONAL**

COORDENADOR: Prof. Dr. Miguel Sabino Neto

DEDICATÓRIA

*A minha amada esposa, Vanessa,
por toda compreensão e carinho.
Pelo apoio incondicional para a
realização desse sonho.*

*Aos meus filhos, **Enzo e Sophia.***

*Razão do meu viver e energia
que me faz buscar ser uma
pessoa melhor a cada dia.*

AGRADECIMENTOS

À Deus, por ter me guiado nos momentos difíceis e iluminado meu caminho sempre.

À **Profa. Dra. LYDIA MASAKO FERREIRA**, Professora Titular da Disciplina de Cirurgia Plástica do Departamento de Cirurgia da UNIFESP, orientadora deste trabalho, por ter me guiado e orientado durante todos esses anos, não sendo somente uma orientadora e sim, um exemplo de liderança, profissionalismo e por ser sempre verdadeira nas horas mais difíceis de um mestrado. Será uma orientadora *ad eternum*.

Ao **Prof. Dr. BERNARDO HOCHMAN** (*in memoriam*), Coordenador do Curso de Aperfeiçoamento do Programa de Pós-Graduação em Cirurgia Plástica da UNIFESP e Co-Orientador deste trabalho, pelo companheirismo e por ter se mostrado um verdadeiro amigo. Que Deus ilumine seu caminho.

Ao **Prof. MURILLO FRAGA**, Co-Orientador deste trabalho, Chefe do Serviço de Microcirurgia da Santa Casa de São Paulo, pelos ensinamentos em microcirurgia, reconstrução mamária e pela amizade.

Ao **Prof. Dr. ALFREDO GRAGNANI**, Co-Orientador. Agradeço a atenção e paciência na dissertação desta tese, sempre disponível quando necessário.

À **Dra. FERNANDA DAUD**, médica veterinária da Técnica experimental da Santa Casa de São Paulo, por todo auxílio e compreensão.

À **Dra. CÉLIA REGINA SOARES**, radioterapeuta do Instituto Arnaldo Vieira Carvalho, pela ajuda e dedicação.

À **Dra. SILMARA LUCI VERNUCIO**, física, que muito colaborou na etapa de irradiação em pleno final de semana.

À **Dra. RUTE LELLIS e Dra. MONIQUE LEMOS**, patologistas que colaboraram bastante para esta pesquisa.

Aos acadêmicos de medicina **FELIPE SULLA LUPINACCI e NICOLE CARMONA ACHING**, que colaboraram imensamente em várias etapas do projeto.

Às secretarias da Disciplina de Cirurgia Plástica da UNIFESP, **SANDRA, MARTA e SILVANA**, pela colaboração e organização.

Aos coelhos, animais que foram sacrificados para realização dessa tese e fundamentais para o desenvolvimento científico.

EPÍGRAFE

*"Há homens que lutam um dia e são bons.
Há outros que lutam um ano e são melhores.
Há os que lutam muitos anos e são muito bons.
Porém, há os que lutam toda a vida.
Esses são os imprescindíveis."*

Bertolt Brecht (1954)

SUMÁRIO

| | |
|-----------------------------------|-------------|
| DEDICATÓRIA..... | v |
| AGRADECIMENTOS..... | vii |
| EPÍGRAFE..... | ix |
| LISTA DE FIGURAS..... | xi |
| LISTA DE TABELAS..... | xiii |
| LISTA DE ABREVIATURAS..... | xiv |
| RESUMO..... | xv |
| 1. INTRODUÇÃO..... | 1 |
| 2. OBJETIVO..... | 6 |
| 3. LITERATURA..... | 8 |
| 4. MÉTODOS..... | 13 |
| 5. RESULTADOS..... | 27 |
| 6. DISCUSSÃO..... | 39 |
| 7. CONCLUSÃO..... | 45 |
| 8. REFERÊNCIAS..... | 47 |
| FONTES CONSULTADAS..... | 53 |
| ABSTRACT..... | 55 |
| APÊNDICE..... | 56 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1- Limites da Epilação 10x10cm ----- | 15 |
| Figura 2. Área epilada 10x10cm----- | 16 |
| Figura 3. Pele alongada e presa com estaca de madeira----- | 17 |
| Figura 4. Animais em dupla. Decúbito lateral ----- | 17 |
| Figura 5. Bolus/Campo de irradiação iluminado ----- | 18 |
| Figura 6. Planejamento da Radioterapia dose 10 Gy----- | 19 |
| Figura 7. Planejamento da Radioterapia dose 20 Gy----- | 19 |
| Figura 8. Planejamento da Radioterapia dose 30 Gy----- | 19 |
| Figura 9. Área irradiada divida em 4 quadrantes ; biópsia aleatória----- | 21 |
| Figura 10. Estudo Piloto- Grupo 45 Gy----- | 24 |
| Figura 11. Estudo Piloto-Classificação de radiodermatite segundo RTOG. ----- | 25 |
| Figura 12. Gráfico demonstrando peso inicial e final----- | 57 |
| Figura 13. Grupo Controle - Pré-tratamento; 15 dias; 30 dias; 60 dias e 90 dias----- | 29 |
| Figura 14. Grupo 10 Gy - Pré-tratamento; 15 dias; 30 dias; 60 dias e 90 dias----- | 30 |
| Figura 15. Grupo 20 Gy - Pré-tratamento; 15 dias; 30 dias; 60 dias e 90 dias----- | 31 |
| Figura 16. Grupo 30 Gy -Pré-tratamento; 15 dias; 30 dias; 60 dias e 90 dias----- | 32 |

| | |
|--|----|
| Figura 17. Classificação de radiodermatite Radioterapeuta I ----- | 33 |
| Figura 18. Classificação de radiodermatite Radioterapeuta II ----- | 58 |
| Figura 19. Classificação de radiodermatite Radioterapeuta III ----- | 58 |
| Figura 20. Lesão 30 e 60 dias com ulceração----- | 38 |
| Figura 21. Microscopia HE/ <i>Picrosirus red</i> ----- | 38 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Quadro 1. Avaliação da pele- RTOG ----- | 20 |
| Tabela 1. Estudo Piloto- Análise dos vasos sanguíneos, anexos e colágeno----- | 26 |
| Tabela 2. Análise da pesagem----- | 28 |
| Tabela 3. O teste Kappa- Radioterapeuta----- | 34 |
| Tabela 4. Análise do Colágeno----- | 35 |
| Tabela 5. Análise dos Vasos sanguíneos----- | 36 |
| Tabela 6. Análise dos Anexos----- | 37 |

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|-----------------|---|
| RT | Radioterapia |
| NCI | <i>National Cancer Institute</i> |
| CTC | <i>Common Toxicity Criteria</i> |
| STAT | <i>Skin Toxicity Assessment Tool</i> |
| cm ² | Centímetro quadrado |
| ASC | <i>Adipose Stem cell</i> |
| ADSCs | <i>Adipose-derived stem cells</i> |
| BMSCs | <i>Bone marrow stromal cells</i> |
| ml | Mililitro |
| l | Litro |
| cGy | Centigray |
| Gy | Gray |
| IMRT | Radioterapia de Intensidade Modulada |
| ml/kg | Mililitro/quilograma |
| cm | Centímetro |
| mm | Milímetro |
| Fig | Figura |
| MeV | Mega Eletron-Volt : 1 milhão de elétrons-volt |
| cGy/min | Centigray/minuto |
| RTOG | <i>Radiation Therapy Oncology Group</i> |
| D90 | Especificação de distância objeto-câmera –marca NIKON |
| HE | Hematoxilina-eosina |
| Δ% | Delta percentual |
| % | Por cento |
| x | Média |
| \tilde{x} | Mediana |
| g | Gramma |

RESUMO

Introdução: A tolerância cutânea à radiação é o principal fator limitante da radioterapia. A escassez de estudos experimentais é imensa, principalmente em animais de médio porte, como os coelhos.

Objetivo: Descrever um modelo experimental de radiodermatite em coelhos

Métodos: Neste estudo foram utilizados 24 coelhos da raça Nova Zelândia, machos, com 6 meses de idade, peso médio de 2,5 Kg. Os mesmos foram distribuídos em 4 grupos (n=6 para cada grupo), sendo um grupo controle (sem nenhuma intervenção) e os demais submetidos à radioterapia com sessão única de 10, 20 e 30 Gy, respectivamente. Foram realizadas análises fotográficas e histopatológicas das áreas irradiadas.

Resultados: Os animais do grupo controle após 30 dias da epilação apresentaram crescimento dos fâneros regularmente. Os animais do grupo 20 Gy e 30 Gy apresentaram alopecia com duração de 60 dias e 90 dias, respectivamente. A partir do dia 30, a área irradiada dos animais do grupo 30 Gy apresentou grau 3 e 4 de radiodermatite, persistindo por 90 dias. A redução progressiva da contagem de anexos, vasos sanguíneos e um aumento da deposição de colágeno foi significativa, quando comparado o o grupo controle com o grupo de 30 Gy.

Conclusão: A dosagem de 30 Gy é a mais eficaz para este modelo experimental de radiodermatite.

Descritores: Lesões experimentais por radiação, Coelhos, Radiodermatite; Experimental, Modelos Animais.

1. INTRODUÇÃO

Introdução

As neoplasias malignas são a segunda maior causa de morte no Brasil. Em 2010, foram 178.990 mortes, correspondente a 16,93% de todas as mortes ocorridas naquele ano. Embora estudos epidemiológicos recentes indiquem queda da mortalidade por câncer na última década (FONSECA *et al.*, 2010), esta doença ainda implica em elevada morbidade e grande impacto nos custos para saúde pública.

Segundo MARTA, HANNA, GADIA, (2014) no Brasil, a estimativa para o ano de 2014, que será válida também para o ano de 2015, aponta para a ocorrência de aproximadamente 576 mil casos novos de câncer, incluindo os casos de pele não melanoma, reforçando a magnitude do problema do câncer no país. O câncer de pele do tipo não melanoma (182 mil casos novos) será o mais incidente na população brasileira, seguido pelos tumores de próstata (69 mil), mama feminina (57 mil), cólon e reto (33 mil), pulmão (27 mil), estômago (20 mil) e colo de útero (15 mil).

Cerca de 60% dos pacientes com câncer de mama recebem radioterapia durante algum estágio do tratamento (CAMPBELL & LANE, 1996; POROCK & KRISTJANSON, 1999). Segundo MARTA, HANNA, GADIA, (2014) nos últimos 50 anos, observou-se uma mudança na abordagem cirúrgica empregada, seguindo a tendência da conservação da mama, sem, contudo, deixar de oferecer segurança oncológica. Dentro desse racional, a adjuvância com radioterapia (RT) é fundamental na abordagem de todas as pacientes com tumores *in situ* e invasivo inicial, submetidas à cirurgia conservadora e, também, daquelas que apresentam doença localmente avançada (tumor > 5 cm, mais de três linfonodos acometidos, entre outros). A radioterapia pode ser utilizada como tratamento curativo, como método de controle tumoral ou para o

Introdução

manejo dos sintomas relacionados ao câncer. A mesma pode ser usada como tratamento único ou em combinação com quimioterapia ou cirurgia.

A radioterapia atua principalmente através de dano ao DNA, causando interrupção da divisão celular e morte celular. O efeito máximo ocorre antes da fase G2 e durante a fase M da divisão celular (SITTON, 1992). Dessa forma, células com alto índice mitótico estão mais propensas aos efeitos da radioterapia (HILDERLEY, 1996).

Tumores malignos contém células que apresentam uma divisão celular anormalmente elevada sendo suscetíveis a radioterapia (TORTORA & GRABOWSKI, 1996; WEINBERG, 1996). Essa característica associada ao fato de que as células cancerígenas não apresentam capacidade de reparar o dano intracelular, torna o tratamento radioterápico efetivo para diversos tipos de câncer. Apesar disso, existem células normais que possuem naturalmente um alto índice mitótico e são suscetíveis a efeitos colaterais causados pela radioterapia. Células normais com alto índice de divisão podem ser encontradas em membranas mucosas (boca, intestinos, reto e vagina), medula óssea e pele (TORTORA & GRABOWSKI, 1996; SOUHAMI, 1998).

A complicação mais comum do tratamento radioterápico é a reação aguda da pele conhecida como radiodermatite. Isso ocorre pelo alto índice mitótico da camada basal da epiderme (HOPEWELL, 1990; SITTON, 1992; THANIK *et al.*, 2011). Cerca de 95% dos pacientes tratados com radioterapia apresentam algum efeito colateral na pele (DE CONNO, VENTAFRIDDA, SAITA, 1991) A radiodermatite geralmente ocorre em áreas de fricção e úmidas como a axila, sulco mamário e períneo (RIGTER, CLENDON, KETTLE, 1994; BLACKMAR, 1997). A dor e desconforto são sintomas frequentes da radiodermatite e podem

estar associados a infecção (CAMPBELL & LANE, 1996; KORINKO & YURICK, 1997; MARTA, HANNA, GADIA, 2014).

A radiodermatite é classificada de acordo com a aparência da pele por meio de quatro sinais: eritema, descamação seca, descamação úmida e necrose (CAMPBELL & LANE, 1996; BOOTS-VICKERS & EATON, 1997; RICE, 1997; NAYLOR, 2001).

A tolerância cutânea é frequentemente o fator limitante da radioterapia, ainda que, novos aparelhos e técnicas sejam desenvolvidas para evitar este efeito colateral (THANIK, *et al.*, 2011). A exposição da pele à radiação ionizante desencadeia uma série de eventos celulares que levarão a efeitos agudos e crônicos. Na fase aguda, ocorre um influxo de células inflamatórias e macrófagos, com consequente eritema, descamação e ulceração da pele e do tecido subjacente. A fase crônica é caracterizada pela proliferação de miofibroblastos. A combinação da fibrose perivascular decorrente da atividade dos miofibroblastos e os efeitos diretos ao endotélio podem levar a um estado de hipovascularização e fibrose crônica (GABBIANI, 1994; DESMOULIERE, 1995; POWELL *et al.*, 1999).

Todos os efeitos agudos e crônicos da radioterapia representam um desafio para a cirurgia plástica e as modalidades terapêuticas são muito limitadas. Uma das limitações nas pesquisas sobre radiodermatite é a escassez de modelos experimentais. Na literatura existem alguns modelos experimentais em animais de pequeno porte, como ratos descrito por THANIK *et al.*, (2011). Entretanto, em animais de médio porte, a escassez de modelos experimentais bem definidos e descritos é ainda maior.

Introdução

Os coelhos, animais de médio porte, por apresentarem reações cutâneas semelhantes aos seres humanos quando expostos à fortes irritantes, são os animais mais utilizados para testes conhecidos como teste de Draize (PHILLIPS *et al.*, 1972).

Além disso, a formação de anticorpos nos coelhos é considerada resistente a irradiação, diferente dos ratos que após irradiação não são capazes de apresentar uma resposta imune semelhante (MARTIN, LEFAIX, DELANIAN, 2000).

Dessa forma, o desenvolvimento de tratamentos mais eficazes para a radiodermatite requer um modelo experimental adequado e reprodutível, com animais de médio porte e características reacionais cutâneas semelhantes aos humanos, como observado com coelhos (MEIRELLES *et al.*, 2013).

2. OBJETIVO

Descrever um modelo experimental
de radiodermatite em coelhos

2. LITERATURA

MALKINSON & KEANE (1981) descreveram que a alopecia observada após radioterapia é fruto da lesão das células mesenquimais foliculares associada à abundante deposição de matriz fibrosa. Os tecidos ficam espessos, inelásticos, hipercrômicos e sem pêlos. Eles realizaram estudos em suínos com dosagens de 700-800 *rads* evidenciando danos permanentes no crescimento de pêlos.

ARCHAMBEAU *et al.* (1984) aplicaram doses únicas de radioterapia 23 e 27 Gy em um modelo animal de suínos. Demonstraram as alterações histopatológicas na membrana basal e endotelial no seguimento pós radioterapia. A presença da fibrose perivascular, a deposição de fibroblastos justificam o espessamento da pele e descamação.

COX, STETZ, PAJAK (1995) desenvolveram o Critério de *Score* para Morbidade Aguda por Radiação - *Acute Radiation Morbidity Scoring Criteria*, para classificar os efeitos da radioterapia, que identifica graus 0 onde não apresenta reação; 1 com eritema leve, descamação seca, epilação, sudorese diminuída; 2 com eritema moderado, brilhante, dermatite exsudativa em placas, edema moderado; 3 com dermatite exsudativa além das pregas cutâneas, edema intenso; e 4 com ulceração, hemorragia, necrose.

RIESZ (1995) descreveu a história da radiação. Ele citou que as lesões induzidas pela radiação ionizante foram descritas desde o início do século passado, após a descoberta dos raios X por Roentgen em 1895 e da radiação emitida pelo urânio em 1896, por Becquerel. Relatou também que em 1900, Pierre Curie observou dermatite em seu braço após exposição intencional ao *radium*, efeito semelhante ao que ocorreu no tórax de Becquerel, que carregava uma amostra desse elemento no bolso de seu paletó; em 1924 o eritema induzido pela radiação foi descrito por Miescher.

POROCK *et al.* (1999), relataram que a radiodermatite aguda inicia-se por volta da segunda ou terceira semana de tratamento, decorrente da destruição das células da camada basal da epiderme, com perda da permeabilidade e exposição da derme pelo processo inflamatório, que se manifesta como eritema podendo ou não evoluir para dermatite exsudativa. Os autores avaliaram a incidência de reações em 126 mulheres submetidas à radiação após mastectomia parcial e demonstraram que a gravidade das reações de pele era atribuída aos fatores relacionados à radiação, como a dose total, esquema de fracionamento, energia da radiação (tipo de equipamento), volume de tecido irradiado e radiosensibilidade do tecido envolvido. Foi utilizada a escala *Radiation Therapy Oncology Group* (RTOG) para as avaliações. Os autores defendiam que fatores relacionados aos pacientes como idade, fumo, doenças crônicas coexistentes e tratamento antineoplásicos concomitante poderiam interferir nas reações de pele, devido a alteração do processo de cicatrização.

SZUMACHER (2001) criou um questionário denominado *Skin Assessment Questionnaire*, instrumento que consta de três avaliações concomitantes: avaliação clínica da pele, classificação da reação da pele baseada no critério do *Radiation Therapy Oncology Group* (RTOG) e questionário com sete perguntas subjetivas quanto à dor, conforto e aceitação da terapia tópica. Esse questionário foi utilizado em estudo de fase II com Trolamine (Biafine) como agente profilático para reação aguda da pele por radiação. Foram avaliadas 60 mulheres submetidas à radioterapia com quimioterapia concomitante e observou-se 98% de reação menor ou igual a 2, sendo que a maioria das reações iniciaram após a terceira semana de radioterapia. Os critérios do RTOG são os mais utilizados, sendo aceito e reconhecido pelas comunidades médicas e de enfermagem.

SAAD *et al.* (2002) traduziram a publicação do Instituto Nacional do Câncer – *National Cancer Institute* (NCI) (1982) que criou os Critérios Comuns de Toxicidade - *Common Toxicity Criteria* (CTC) para classificar os efeitos relacionados à quimioterapia e radioterapia. Em 1997 houve revisão desses critérios e foi criado o CTC versão 2.0, que engloba todos os efeitos adversos relacionados ao tratamento do câncer.

HEGGIE *et al.* (2002) em um estudo fase III envolvendo 225 pacientes após mastectomia parcial, avaliaram se o uso de *aloe vera* poderia ser benéfico para o controle de radiodermatite. Os autores avaliaram também outros fatores que poderiam influenciar as lesões cutâneas induzidas pela radiação. Eles randomizaram as pacientes em dois grupos, um recebeu *aloe vera* tópica e outro creme aquoso. Concluíram que o uso de *aloe vera* não diminui a incidência de radiodermatite e que a linfadenectomia e hipertrofia mamária são fatores que favorecem o surgimento de radiodermatite.

LOPEZ *et al.* (2002) recomendaram escalas de graduação para uniformizar documentações, implementar a monitorização da toxicidade durante e após o tratamento, melhorar os resultados terapêuticos e a qualidade de vida dos pacientes, comparar condutas, esclarecer aspectos radiobiológicos, dar suporte para a prática clínica e promover estudos multicêntricos. As escalas citadas foram a RTOG e a *Biomed2 side-effect scales*. As duas escalas foram aplicadas em 108 pacientes com câncer de mama e foi demonstrado que o eritema é a complicação mais frequente (91,7%). Concluíram, após comparar o nível de concordância entre os radioterapeutas que utilizaram as escalas, que o RTOG pode ser considerada a melhor escala para avaliação de efeitos colaterais.

BERTHELET (2004), desenvolveu um instrumento de avaliação

chamado *Skin Toxicity Assessment Tool* (STAT), usado para avaliar manifestações objetivas e subjetivas dos efeitos agudos na pele, induzidas por radiação. Apresenta três componentes: parâmetros do paciente e do tratamento como a dose total, a dose por fração, a técnica de tratamento, o local, a última quimioterapia realizada, o tamanho do campo, o creme utilizado; score de observação com níveis diferenciados a saber, sem reação, eritema leve, moderado e intenso, descamação seca e úmida, presença de exsudato, área da lesão em cm²; e sintomas referidos pelo paciente como ardor e queimação de 0 a 5 pela escala analógica visual.

ROPER *et al.* (2004) relataram que atualmente a radiação ionizante é usada para tratamento de algumas patologias benignas e na grande maioria das vezes nas malignas. O desenvolvimento dos aceleradores lineares possibilitou a redução da dose de radiação na pele. No entanto, em pacientes submetidos à radioterapia para tumores de mama e cabeça e pescoço, essas reações costumam ser mais frequentes. Os autores randomizaram 20 pacientes para comparar o uso de Theta-cream ou Bepanthol tópico durante o tratamento da radioterapia. Os mesmos utilizaram a escala RTOG para comparação e não houve diferença entre os dois tratamentos.

MARTA, HANNA, GADIA, (2014) descreveram uma comparação da radioterapia de intensidade modulada (IMRT) *versus* radioterapia convencional, em um estudo de fase III multicêntrico com 358 pacientes, demonstrando que as taxas de descamação úmida durante a radioterapia, bem como em até 6 semanas após o tratamento, foram de 31,2% com IMRT e 47,8% com radioterapia convencional (p=0,002). Dentre outros parâmetros analisados, concluíram que a IMRT apresenta benefícios dosimétricos, de toxicidade e de qualidade de vida, não prejudicando o controle local nem a sobrevida global das pacientes.

4. MÉTODOS

4.1. Delineamento do estudo

Este é um estudo primário, experimental, prospectivo e longitudinal, intervencionista, controlado, aleatorizado, duplo-cego e de centro-único.

4.2. Amostra

Foram utilizados 24 coelhos da raça Nova Zelândia, machos, com 6 meses de idade e peso médio de 2,5 Kg. Todos os procedimentos cirúrgicos e a radioterapia foram realizados de acordo com as normas do Comitê de Ética no uso de animais e o protocolo aprovado no Comitê de Ética e Pesquisa da UNIFESP/EPM sob o número 0264/12 (Apêndice I).

Os animais foram alojados no biotério da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo, em gaiolas individuais, *ad libidum*, seguindo as orientações da COBEA (Colégio Brasileiro de Experimentação Animal).

4.3. Delineamento Experimental

Os animais (n = 24) foram distribuídos aleatoriamente por sorteio computadorizado por meio do programa de randomização, (www.randomization.com) em 4 grupos com 6 animais em cada grupo, sendo um grupo controle e os demais submetidos a radioterapia em 10, 20 e 30Gy, respectivamente.

4.4. Procedimentos

4.4.1. Técnica

Métodos

Os animais foram anestesiados pela aplicação de Ketamina pela via intramuscular na região glútea na dose de 0,5 ml/Kg, sendo complementada, conforme a necessidade, durante o procedimento. Os animais permaneceram em ventilação espontânea durante o procedimento. A pele dorsal foi epilada (10x10cm) com depilador elétrico OSTER A5- lâmina tamanho 40-10mm.

A área da epilação foi padronizada, tendo como limite superior um ponto médio sobre a coluna vertebral e a 10cm abaixo da região occipital média, sendo que a partir desse ponto marcado, foi medido 5 cm para cada lado da coluna vertebral, determinando os limites laterais, e um novo ponto médio na coluna vertebral a 10cm abaixo do primeiro ponto definindo o limite inferior dessa área de 10 x 10cm (Figuras 1 e 2).



Figura 1- Limites da Epilação de 10x10cm no dorso do coelho.



Figura 2. Área epilada de 10x10cm no dorso do coelho.

A pele do dorso do animal foi tracionada 5 cm superiormente tendo a linha média da coluna vertebral, em um ponto cranial e outro caudal nas extremidades da área epilada, como parâmetros para a prensão da pele pelos dedos da mão do pesquisador e posteriormente um auxiliar posicionava duas estacas de madeira (15cm de comprimento e 0,5cm de diâmetro) nessa pele tracionada para cima. Então, essas estacas foram presas por uma liga elástica (Látex amarelo número 18) após 5 circulações em cada extremidade das estacas. Esta manobra permitiu o distanciamento da pele do corpo do animal de 5 cm, evitando-se lesões viscerais pela radioterapia (Figura 3).



Figura 3. A) - Pele tracionada; B) - Pele presa por estaca de madeira e liga elástica por 5 voltas nas extremidades das estacas, de cada lado.

O grupo controle foi submetido aos mesmos procedimentos (anestesia, epilação, tracionamento da pele, fotografias e biópsias) dos grupos tratados, exceto a radioterapia.

A radioterapia foi realizada em dupla de animais. Os mesmos ficaram posicionados em decúbito lateral. A pele tracionada foi fixada por três pontos simples (fio monofilamentar de *nylon 4.0*), com 3 cm de distância entre eles e a distância padrão entre os animais foi de 10cm. Os coelhos foram fixados à mesa com fita adesiva para evitar qualquer mobilidade durante a radioterapia (Figura 4).

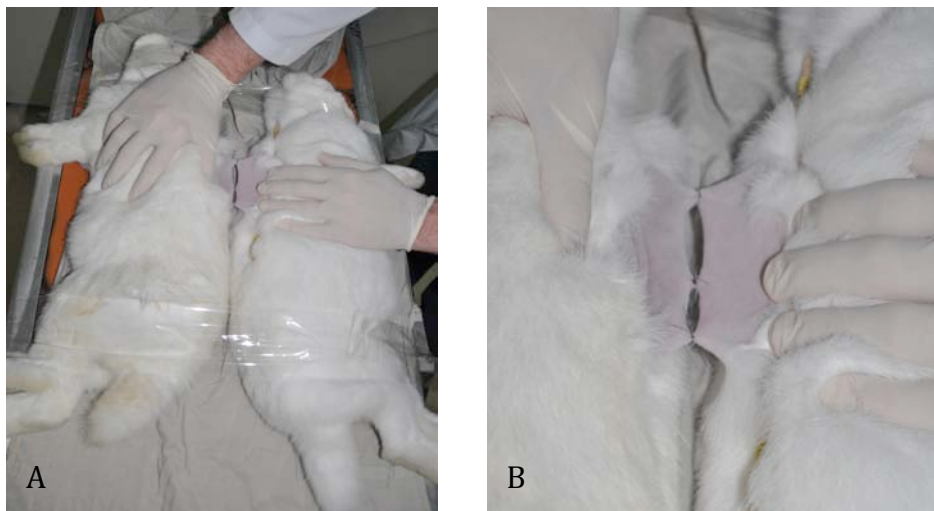


Figura 4. A) - Animais posicionados na mesa do aparelho de radiação, em decúbito lateral; B) – distância de 10cm entre as estacas de madeira de cada coelho com a pele do dorso suturada.

4.4.2. Telecobaltoterapia

O aparelho utilizado foi o ALCYON II - Telecobaltoterapia, aparelho que possui um radioisótopo (Cobalto - 60) de alta atividade para terapia. O Cobalto tem meia-vida física de 5,3 anos e emite radiações gama de energia média 1,25MeV. O Rendimento foi de 125,86 cGy/min e distância de 73cm/Bolus = 0,5cm (Figuras 5 a 8). O Bolus é utilizado para proporcionar a superfícilização da radioterapia, atingindo a pele. Tamanho dos campos de irradiação (largura x comprimento): 5cm x 10cm (Figura 5). Doses: 1000cGY (10Gy), 2000cGY (20Gy), 3000cGy (30Gy). Todos os procedimentos de radioterapia foram realizados no Instituto do Câncer Arnaldo Vieira de Carvalho da Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo (IAVC) sendo a equipe constituída por um físico desse instituto, pelo pesquisador e por um veterinário.

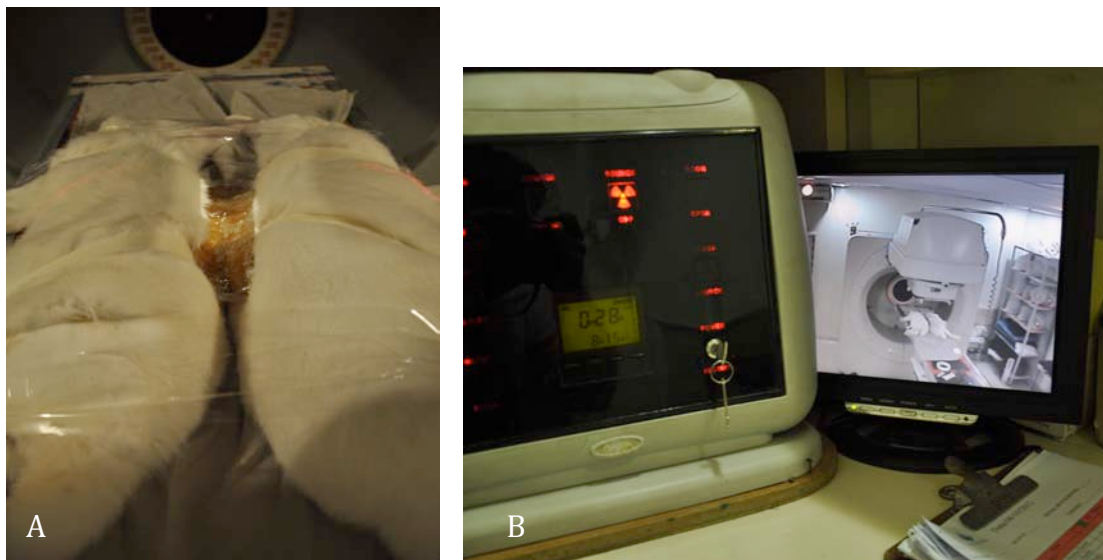


Figura 5. A) - Bolus 0,5cm de espessura/Campo de irradiação iluminado; B) – Câmera para acompanhamento da radioterapia em local isolado do campo de radiação.

As figuras 6, 7 e 8 apresentam o planejamento e detalhes da radiação realizada nos grupos 10, 20 e 30 Gy, respectivamente.

| Aparelho | Co | 5 | 11 | 6,9 |
|-------------------|--------|---|----|-----|
| Campo Equivalente | 6,9 | | | |
| Profundidade (cm) | 0,5 | | | |
| Distância SSD | 73 | | | |
| Dose (cGy) | 1000 | | | |
| Bandeja | n | | | |
| Filtro | 0 | | | |
| PDP | 100,00 | | | |
| Rendimento | 125,86 | | | |
| Fator de Campo | 0,966 | | | |
| Fator de Bandeja | 1,000 | | | |
| Fator de Filtro | 1,000 | | | |
| DS | 1000 | | | |
| Tempo (min.s) | 8,15 | | | |

1 = 30° - 6 x 16
 2 = 30° - 8 x 16
 3 = 30° - 10 x 16
 4 = 45° - 6 x 16
 5 = 45° - 8 x 16
 6 = 45° - 10 x 16
 7 = 60° - 6 x 16
 8 = 60° - 8 x 16
 9 = 60° - 10 x 16

distância diferente de 70 ou 80cm!

Figura 6. Planejamento da Radioterapia dose 10 Gy.

| Aparelho | Co | 5 | 11 | 6,9 |
|-------------------|--------|---|----|-----|
| Campo Equivalente | 6,9 | | | |
| Profundidade (cm) | 0,5 | | | |
| Distância SSD | 73 | | | |
| Dose (cGy) | 2000 | | | |
| Bandeja | n | | | |
| Filtro | 0 | | | |
| PDP | 100,00 | | | |
| Rendimento | 125,86 | | | |
| Fator de Campo | 0,966 | | | |
| Fator de Bandeja | 1,000 | | | |
| Fator de Filtro | 1,000 | | | |
| DS | 2000 | | | |
| Tempo (min.s) | 16,29 | | | |

1 = 30° - 6 x 16
 2 = 30° - 8 x 16
 3 = 30° - 10 x 16
 4 = 45° - 6 x 16
 5 = 45° - 8 x 16
 6 = 45° - 10 x 16
 7 = 60° - 6 x 16
 8 = 60° - 8 x 16
 9 = 60° - 10 x 16

distância diferente de 70 ou 80cm!

Figura 7. Planejamento da Radioterapia dose 20 Gy.

| Aparelho | Co | 5 | 11 | 6,9 |
|-------------------|--------|---|----|-----|
| Campo Equivalente | 6,9 | | | |
| Profundidade (cm) | 0,5 | | | |
| Distância SSD | 73 | | | |
| Dose (cGy) | 3000 | | | |
| Bandeja | n | | | |
| Filtro | 0 | | | |
| PDP | 100,00 | | | |
| Rendimento | 125,86 | | | |
| Fator de Campo | 0,966 | | | |
| Fator de Bandeja | 1,000 | | | |
| Fator de Filtro | 1,000 | | | |
| DS | 3000 | | | |
| Tempo (min.s) | 24,42 | | | |

1 = 30° - 6 x 16
 2 = 30° - 8 x 16
 3 = 30° - 10 x 16
 4 = 45° - 6 x 16
 5 = 45° - 8 x 16
 6 = 45° - 10 x 16
 7 = 60° - 6 x 16
 8 = 60° - 8 x 16
 9 = 60° - 10 x 16

distância diferente de 70 ou 80cm!

Figura 8. Planejamento da Radioterapia dose 30 Gy.

4.4.3. Análise macroscópica

A lesão foi fotografada e avaliada seriadamente, nos seguintes momentos: pré-tratamento – dia 0; 15 dias; 30 dias; 60 dias e 90 dias. A avaliação foi realizada por 3 radioterapeutas, com mascaramento.

A pele irradiada foi classificada a partir da escala do Grupo de Radioterapia em Oncologia - *Radiation Therapy Oncology Group* - RTOG.

Quadro 1 - Escala da avaliação da pele irradiada do Grupo de Radioterapia em Oncologia RTOG.

| Avaliação da pele segundo RTOG | |
|---------------------------------------|---|
| Escala | Reações |
| 0 | Sem alteração |
| 1 | Eritema leve, epilação, descamação, sudorese diminuída |
| 2 | Eritema moderado, brilhante, edema moderado, dermatite exsudativa à dobra |
| 3 | Dermatite exsudativa além das pregas cutâneas, edema intenso |
| 4 | Ulceração, hemorragia, necrose |

A máquina fotográfica utilizada foi a NIKON D90 com o módulo automático, macro. Um tripé com a máquina fixa foi utilizado à 30 cm de distância do dorso animal. O *flash* e o *zoom* não foram utilizados. A luminosidade e local da fotografia foi sempre o mesmo.

4.4.4. Análise Microscópica

A pele da área tratada foi submetida à biópsias aos quinze, trinta, sessenta e noventa dias após radioterapia. Para ser submetido à biópsia o coelho foi anestesiado conforme protocolo já apresentado, sendo que a biópsia se constituiu de um *punch* de 1mm de pele até a fáscia, sendo o fragmento retirado colocado imediatamente em frasco contendo formol a 10%. A área irradiada do dorso do animal foi dividida em 4 quadrantes sendo biopsiada após randomização realizada pelo programa obtido no site *randomization.com*, não se repetindo o mesmo quadrante já biopsiado (Figura 9). A biópsia foi realizada no centro de cada quadrante (Ponto central- 2,5 cm das laterais do quadrante).



Figura 9. Área irradiada dividida em 4 quadrantes, biópsia aleatória nesses quadrantes.

Após a última biópsia (90 dias) os animais foram submetidos à morte induzida indolor, respeitando-se os preceitos éticos da manipulação de animais de experimentação. Dose letal de tiopental sódico e cloreto de potássio foi administrada e a morte verificada pela ausência de reflexo corneal e pulsação femoral.

A amostra foi avaliada utilizando *picrosirius red* e hematoxilina-eosina (HE), por um dermatopatologista do Departamento de Anatomia Patológica da Santa Casa de São Paulo. O patologista fez um *check list* dos achados histopatológicos correspondentes ao estudo descritos previamente (ARCHAMBEAU, INES, FAJARDO, 1984; ARCHAMBEAU, HANSER, SHYMKO, 1988; ARCHAMBEAU, SHYMKO, 1988). A contagem de achados foi realizada pela técnica proposta por GUNDERSEN *et al.* (1988) chamada *point-counting* utilizando retículo de 100 pontos. Foram examinados 5 campos aleatórios e não coincidentes, totalizando 500 pontos por lâmina, ao aumento de 200x. Não foram considerados os pontos que não incidem sobre as áreas sólidas.

Os valores foram expressos em porcentagem de pontos positivos, do total de pontos em áreas sólidas de acordo com a fórmula: **P pontos= Pi x 100/ P parênquima**, sendo que P pontos é a porcentagem corrigida de pontos marcados, Pi é o número de pontos que incidem sobre a positividade dos itens mensurados e P parênquima é o total de pontos que incidem sobre a área sólida. Dessa forma, foi contabilizado o colágeno, vasos sanguíneos e anexos (glândulas sebáceas, sudoríparas e folículos pilosos).

Os animais foram pesados no dia 0, previamente a intervenção e pós-radioterapia (90 dias), utilizando-se uma balança eletrônica da marca Triunfo modelo DST-15N.

4.5-Análise estatística

Para a análise dos resultados foi aplicado o teste de Wilcoxon, com o objetivo de comparar o peso dos animais nos períodos pré e 90 dias após a radioterapia. Este teste foi aplicado em separado para o grupo controle, 10, 20 e 30Gy. Foi realizada a análise de variância de Friedman com o objetivo de comparar os períodos de 15, 30, 60 e 90 dias em relação ao número de vasos sanguíneos, anexos e o colágeno. Esta análise foi aplicada separadamente para todos os grupos.

Ainda foi realizada a análise de variância de Kruskal-Wallis, com o objetivo de comparar os grupos separadamente para 15, 30, 60 e 90 dias após radioterapia quanto ao número de vasos, anexos e o colágeno. A mesma análise foi aplicada para comparar as diferenças percentuais ($\Delta\%$) observadas entre os valores do peso pré e 90 dias após a radioterapia. Para o cálculo do delta percentual foi aplicado a formula: $\Delta\% = (\text{Peso 90 dias} - \text{Peso 0 dia} / \text{Peso 0 dia}) \times 100$.

Também foi realizado o teste Kappa, com a finalidade de comparar duas a duas as avaliações dos radioterapeutas I, II e III em relação aos graus de radiodermatite. O Teste Kappa foi complementado pelo teste de Mc Nemar, com a finalidade de estudar as eventuais discordâncias entre os avaliadores. Em todos os testes foi fixado em 0,05 ou 5% o nível de rejeição da hipótese de nulidade (SIEGEL, 2006).

4.6-Estudo Piloto

No estudo piloto foram utilizados 8 coelhos da raça Nova Zelândia, machos, 6 meses de idade, peso médio 2,5 Kg. Os mesmos foram distribuídos em 4 grupos (n=2 para cada grupo), sendo um grupo controle

Métodos

e os demais submetidos a radioterapia em 20, 30 e 45Gy, respectivamente. A metodologia utilizada foi a mesma descrita acima.

Em 2 animais, foi avaliado através do ultra-som doppler, o fluxo sanguíneo da pele após o clampeamento máximo de 30 minutos (Tempo máximo para aplicação da radioterapia). Não foram observadas alterações na circulação.

Um dos animais do grupo 45 Gy evoluiu para óbito no sétimo dia após radioterapia com necrose visceral. O outro animal do mesmo grupo apresentou necrose de pele total após 30 dias da radioterapia, sendo sacrificado (Figura 10).

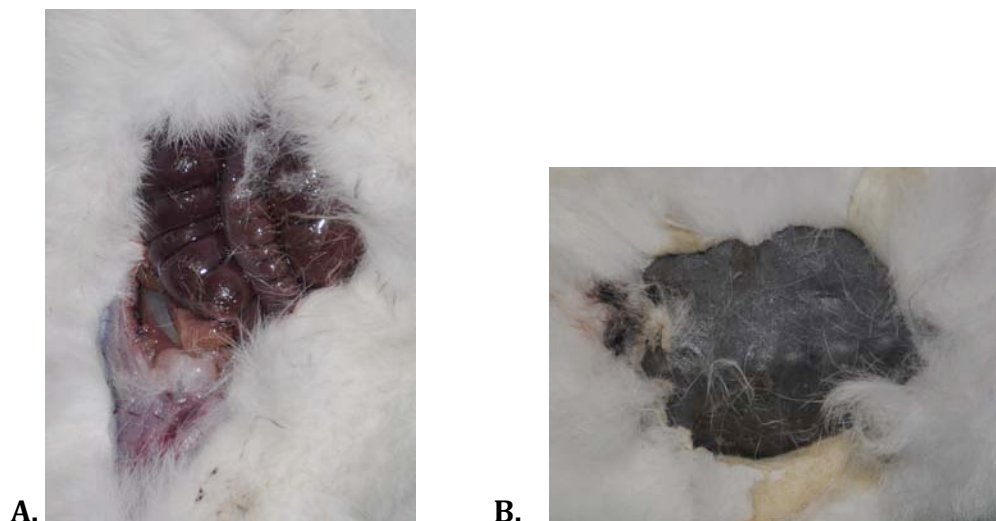


Figura 10- Aspecto macroscópico da lesão. Grupo de 45Gy. Coelho com necrose em vísceras (A) e outro com necrose de pele total (B).

Os animais do grupo controle após 30 dias da epilação apresentaram crescimento dos fâneros regularmente. Já os animais do grupo 20Gy e 30Gy apresentaram alopecia por 60 dias e 90 dias, respectivamente. A área epilada foi classificada segundo a escala do RTOG (Figura 11).

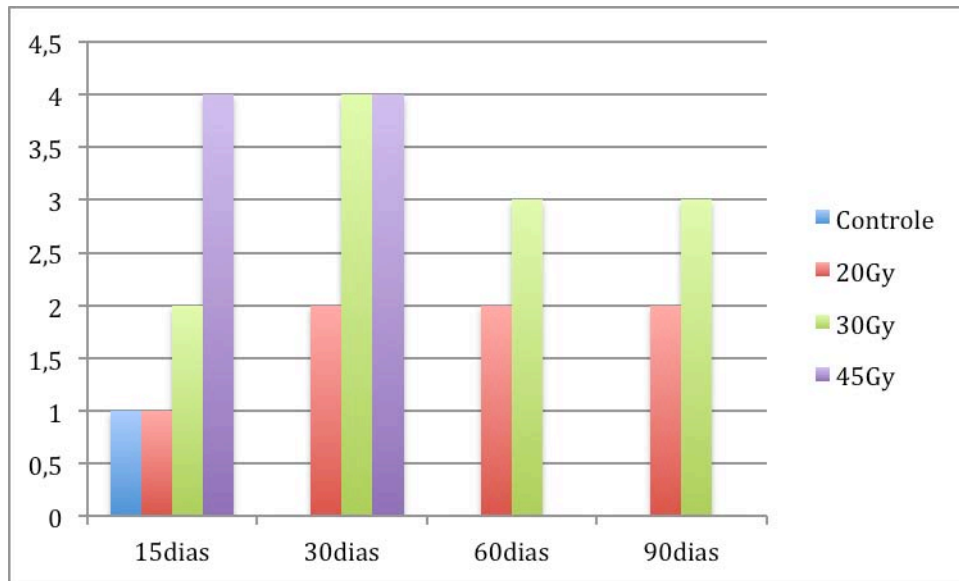


Figura 11- Classificação de radiodermatite aos grupos Controle, 20, 30 e 45 Gy segundo RTOG aos 15, 30, 60, e 90 dias.

A média da contagem de vasos sanguíneos, anexos e colágeno pela técnica de *point-counting* (GUNDERSEN *et al.*, 1988) evidenciou um aumento na deposição de colágeno e uma diminuição de anexos com o aumento da dosagem de radioterapia (Tabela 1).

Tabela 1- Análise de vasos sanguíneos, anexos e colágeno (média) aos grupos Controle, 20, 30 e 45 Gy.

| | 15 dias | | | 30 dias | | | 60 dias | | | 90 dias | | |
|-----------------|------------------|--------|----------|------------------|--------|----------|------------------|--------|----------|------------------|--------|----------|
| | Vasos Sanguíneos | Anexos | Colágeno | Vasos Sanguíneos | Anexos | Colágeno | Vasos Sanguíneos | Anexos | Colágeno | Vasos Sanguíneos | Anexos | Colágeno |
| Controle | 2,1 | 12,4 | 10,6 | 2,4 | 14,9 | 11,2 | 2,3 | 21,7 | 11 | 2,4 | 19,2 | 11,2 |
| 20 Gy | 1,9 | 11,2 | 16,2 | 1,6 | 7,4 | 16,4 | 1,8 | 9,1 | 18,2 | 1,6 | 8,4 | 18,4 |
| 30Gy | 1,9 | 10,8 | 16,2 | 1,4 | 6,4 | 18,2 | 1,2 | 5,3 | 18,4 | 1,2 | 5,1 | 18,6 |
| 45Gy | 1,8 | 10,7 | 16,4 | - | - | - | - | - | - | - | - | - |

Diante desses achados, foi optado por realizar o estudo principal comparando doses menores de radioterapia (10, 20 e 30 Gy).

5. RESULTADOS

Resultados

Dentre os 24 animais, um animal do grupo controle aos 60 dias morreu por causa desconhecida.

Após 30 dias de radioterapia, o grupo controle e o grupo de 10 Gy apresentaram crescimento regular dos fâneros. O grupo 20 Gy apresentou alopecia com duração de 60 dias e o grupo 30 Gy alopecia com duração de 90 dias.

A avaliação ponderal dos animais foi realizada pré-radioterapia e após 90 dias, conforme descrito na tabela 2 e figura 12 (Apêndice II).

Tabela 2- Peso dos coelhos com a média inicial e final, com análise estatística.

| Peso/teste | PESO MÉDIO INICIAL(g) | PESO MÉDIO FINAL(g) | TESTE WILCOXON | TESTE KRUSKAL-WALLIS |
|-------------------|------------------------------|----------------------------|-----------------------|-----------------------------|
| Grupos | | | | |
| CONTROLE | 2563,66 | 2604,8 | T=0/Z=1,96/p=0,05 | $\Delta\%$ |
| 10 Gy | 2624,5 | 2616,66 | T=2/Z=1,88/p=0,0296 | Hcalc=8,10 |
| 20 Gy | 2560,66 | 2535,16 | T=0/Z=2,2/p=0,0139 | P=0,0440 |
| 30 Gy | 2591,16 | 2575,33 | T=0/Z=2,2/p=0,0139 | |

Gy= grays; g=gramas; p=nível de significância; T e Z=resultados do teste de Wilcoxon; $\Delta\%$ = delta percentual; Hcalc= resultado do teste Kruskal-wallis comparando as diferenças percentuais entre os grupos.

O grupo controle e 10 Gy tiveram maior peso médio final quando comparados aos grupos 20 e 30 Gy ($p<0,05$).

ASPECTO MACROSCÓPICO DE UM DOS COELHOS DO GRUPO CONTROLE NOS DIFERENTES MOMENTOS DE AVALIAÇÃO

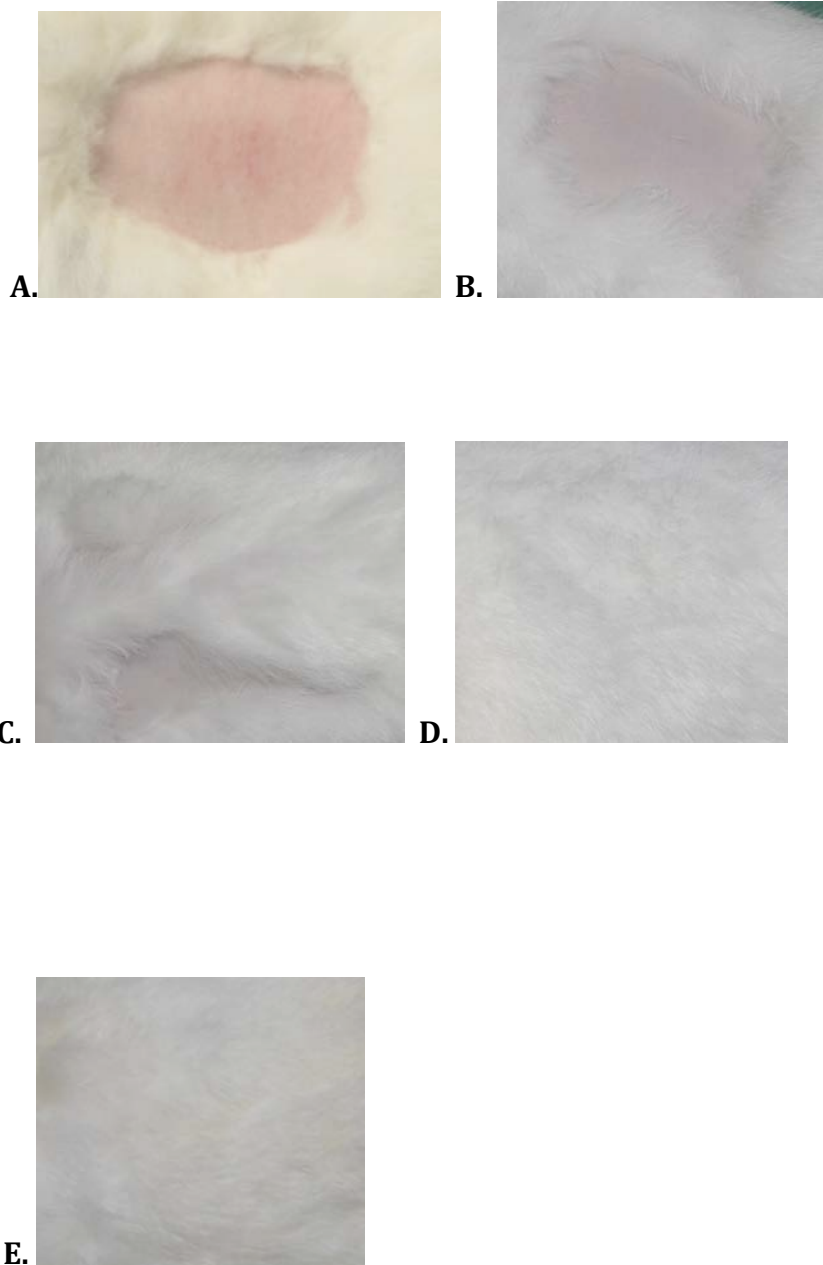


Figura 13- Aspecto macroscópico da lesão do Grupo Controle - (A): Pré-tratamento - GRAU 1; (B): 15 dias - GRAU 1; (C): 30 dias - GRAU 0; (D): 60 dias - GRAU 0 e (E): 90 dias - GRAU 0.

**ASPECTO MACROSCÓPICO DE UM DOS COELHOS DO GRUPO 10 Gy
NOS DIFERENTES MOMENTOS DE AVALIAÇÃO**

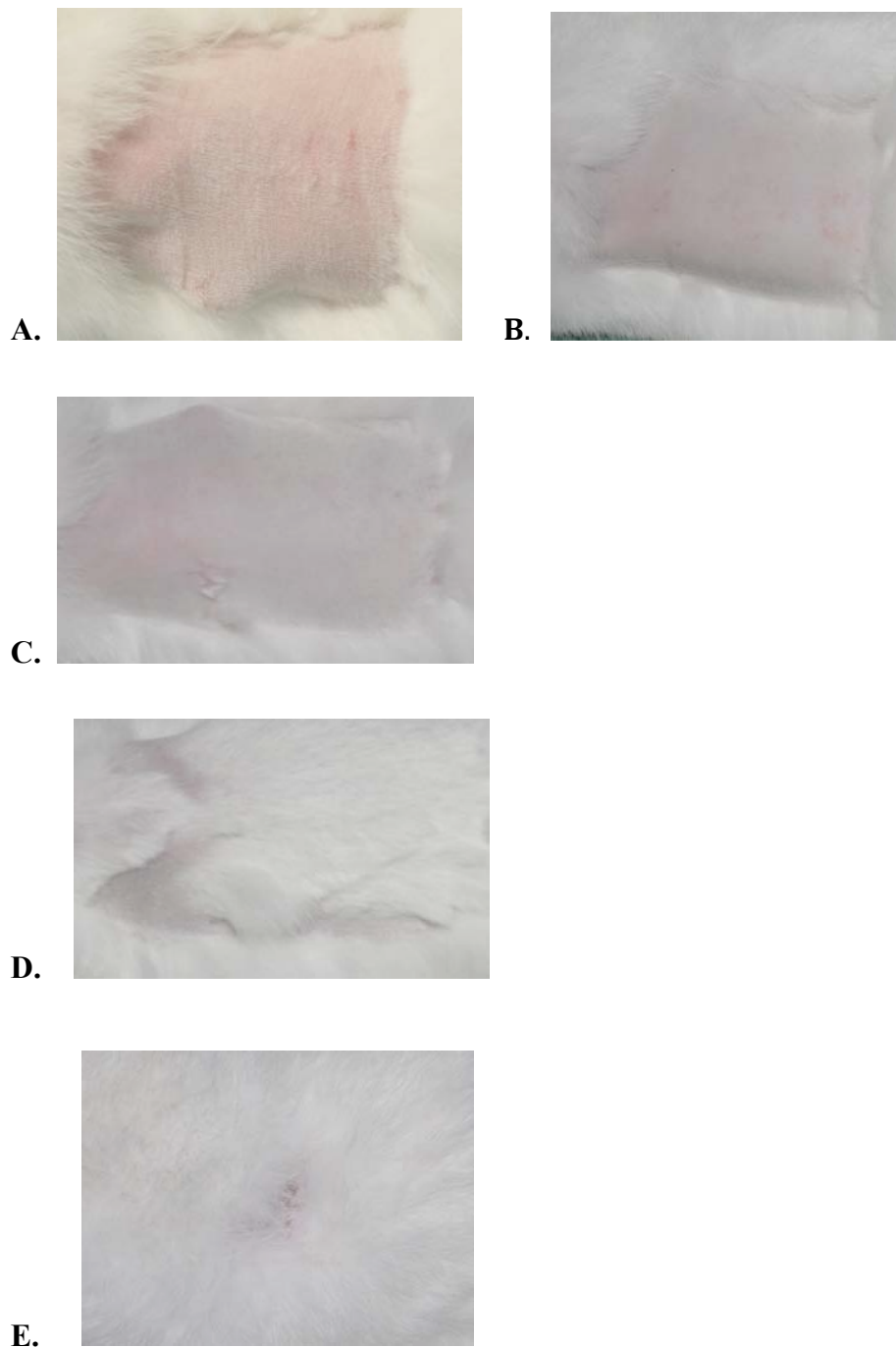


Figura 14- Aspecto macroscópico da lesão do Grupo 10 Gy - (A): Pré-tratamento - GRAU 1; (B): 15 dias - GRAU 2; (C): 30 dias - GRAU 2; (D): 60 dias - GRAU 2 e (E): 90 dias - GRAU 2.

**ASPECTO MACROSCÓPICO DE UM DOS COELHOS DO GRUPO 20 Gy
NOS DIFERENTES MOMENTOS DE AVALIAÇÃO**

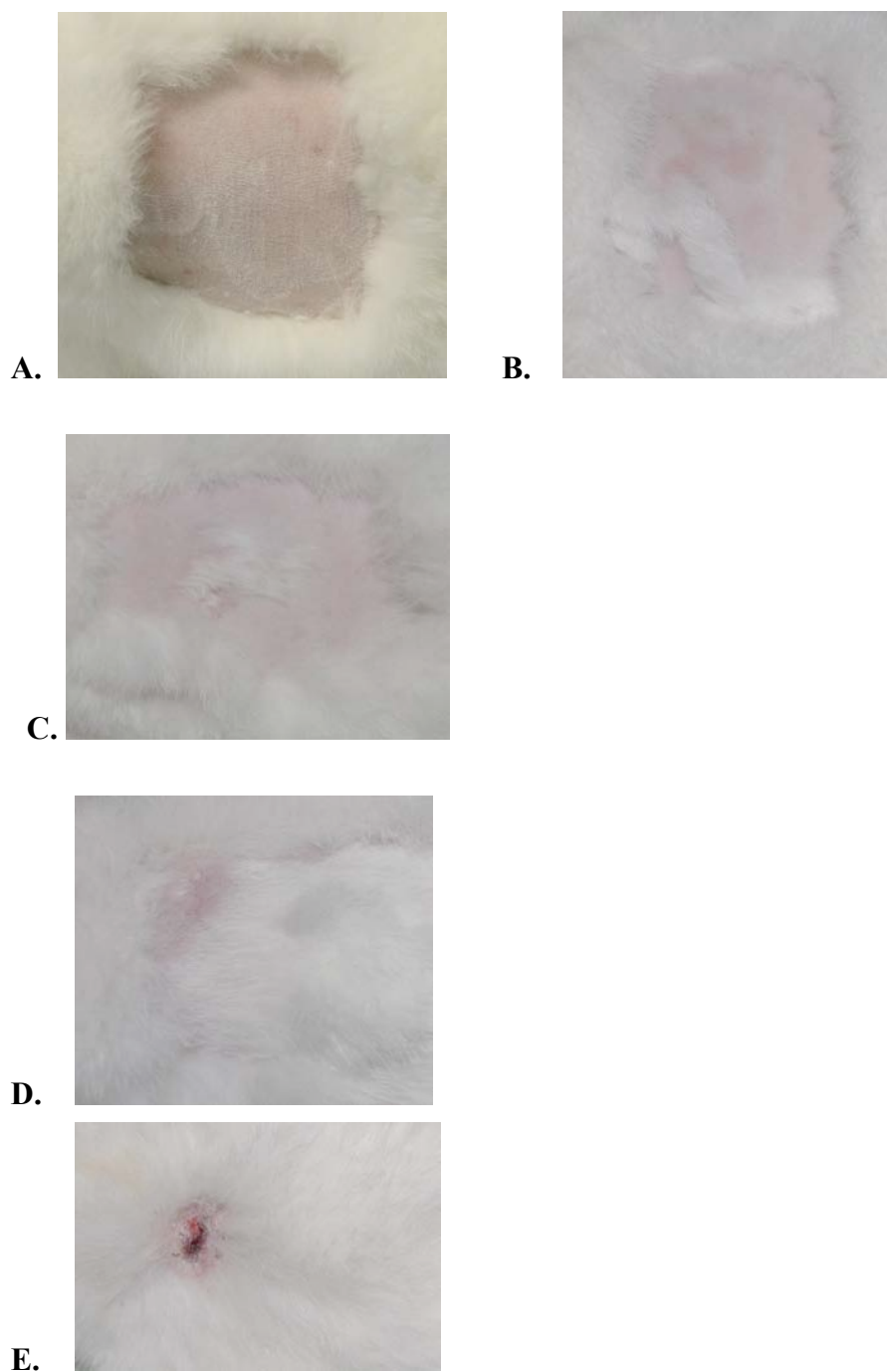


Figura 15- Aspecto macroscópico da lesão do Grupo 20 Gy - (A): Pré-tratamento - GRAU 1; (B): 15 dias - GRAU 2; (C): 30 dias - GRAU 2; (D): 60 dias - GRAU 3 e (E): 90 dias - GRAU 4.

**ASPECTO MACROSCÓPICO DE UM DOS COELHOS DO GRUPO 30 Gy
NOS DIFERENTES MOMENTOS DE AVALIAÇÃO**

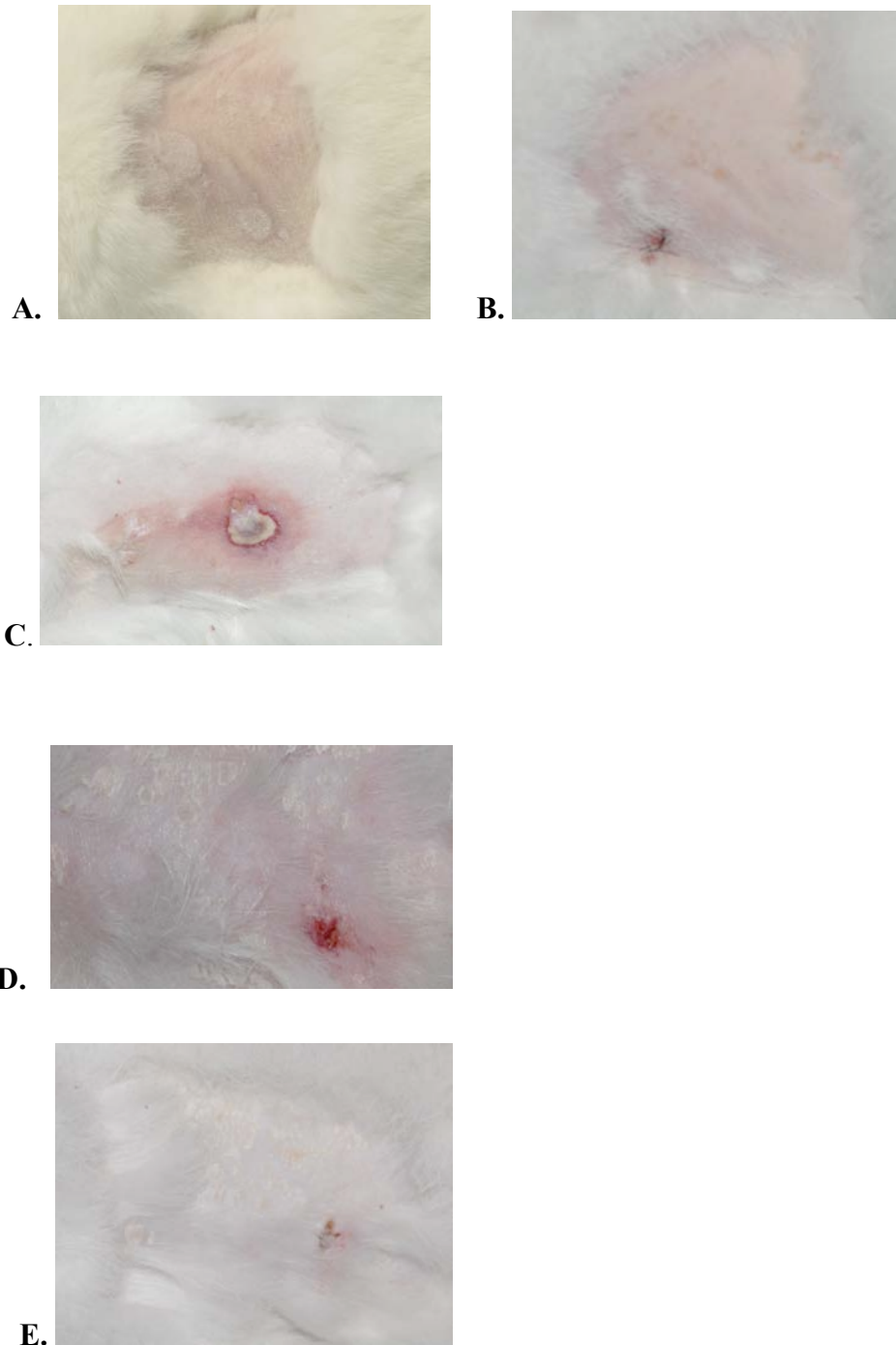


Figura 16- Aspecto macroscópico da lesão do Grupo 30 Gy - (A): Pré-tratamento - GRAU 1; (B): 15 dias - GRAU 3; (C): 30 dias - GRAU 4; (D): 60 dias - GRAU 4 e (E): 90 dias - GRAU 4.

Resultados

Os radioterapeutas que foram submetidos ao mascaramento avaliaram as fotografias evidenciando lesões grau 0 no grupo controle; graus 2 e 3 no grupo 10Gy; graus 3 e 4 de radiodermatite nos grupos 20Gy e mais frequentemente no grupo 30Gy. Eles obtiveram uma concordância significativa na classificação da radiodermatite (Figura 17 e Tabela 3).

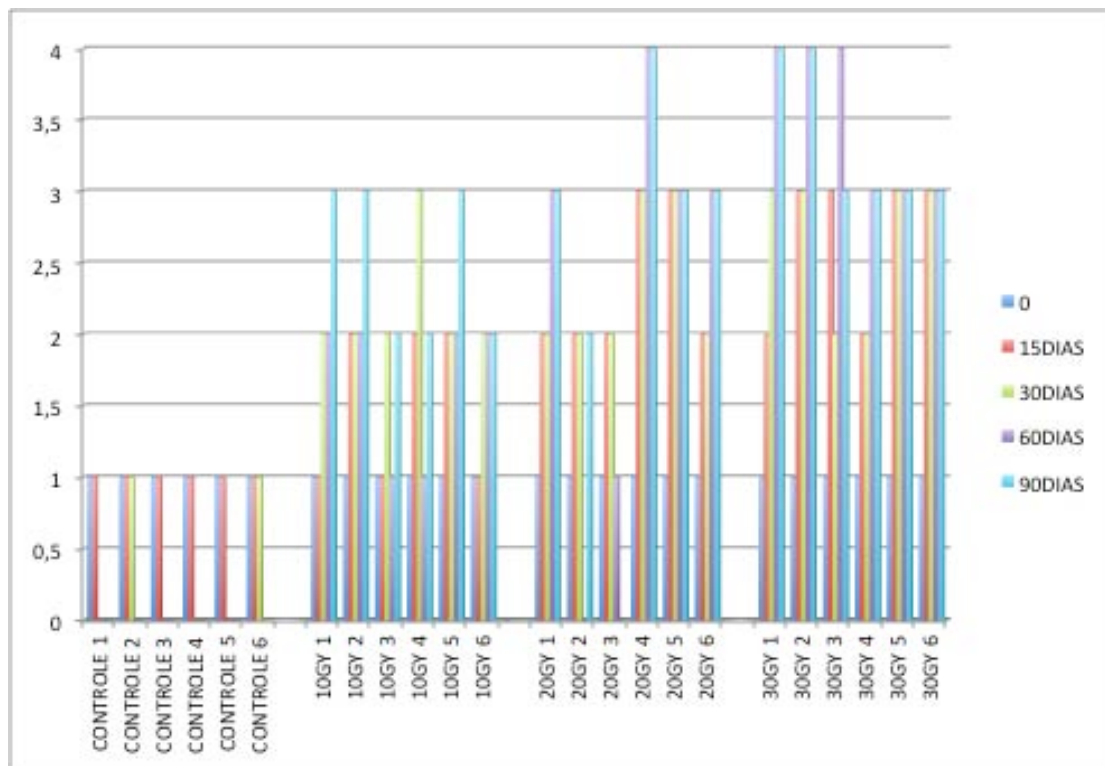


Figura 17 - Classificação de radiodermatite (Radioterapeuta I) nos grupos Controle, 10 Gy, 20 Gy e 30 Gy aos 15, 30, 60 e 90 dias.

Tabela 3- Avaliação da concordância entre os radioterapeutas.

| 15dias | | | | |
|--|----------------|---------------|--------------------|---------------|
| 100% de concordância (I x III; I x II; II x III) | | | | |
| 30 dias | | | | |
| RADIOTERAPEUTA | % Concordância | Mc Nemar | Coefficiente Kappa | Significância |
| I x II | 87,50% | $\chi^2=3,0$ | Kw=0,84/ z=5,8 | p<0,0001 |
| I x III | 87,50% | $\chi^2=3,0$ | Kw=0,85/z=5,8 | p<0,0001 |
| II x III | 87,50% | $\chi^2=0,33$ | Kw=0,85/z=5,52 | p<0,0001 |
| 60dias | | | | |
| RADIOTERAPEUTA | % Concordância | Mc Nemar | Coefficiente Kappa | Significância |
| I x II | 100,00% | $\chi^2=0$ | Kw=1,0/z=7,06 | p<0,0001 |
| I x III | 95,60% | $\chi^2=1,0$ | Kw=0,96/ z=6,61 | p<0,0001 |
| II x III | 95,60% | $\chi^2=1,0$ | Kw=0,96/ z=7,47 | p<0,0001 |
| 90dias | | | | |
| RADIOTERAPEUTA | % Concordância | Mc Nemar | Coefficiente Kappa | Significância |
| I x II | 95,60% | $\chi^2=1,0$ | Kw=0,96/ z=7,47 | p<0,0001 |
| I x III | 100% | $\chi^2=0$ | Kw=1,0/z=7,82 | p<0,0001 |
| II x III | 95,60% | $\chi^2=1,0$ | Kw=0,96/ z=7,47 | p<0,0001 |

Foi observado que o grupo 30 Gy apresentou grau 3 e 4 de radiodermatite (dermatite exsudativa e ulceração). A classificação dos radioterapeutas II e III foram demonstradas nas Figuras 18 e 19, respectivamente (Apêndice III).

O teste Kappa mostrou alta e significativa concordância enquanto o teste de Mc Nemar não evidenciou discordâncias significativas entre os radioterapeutas .

As tabelas 4, 5 e 6 demonstram a análise de variância de Friedman comparando os grupos isolados em relação aos períodos (15, 30, 60 e 90 dias) e a análise de variância de Kruskal-Wallis comparando os grupos entre si (\bar{x} =média; \tilde{x} =mediana), em relação ao colágeno, vasos sanguíneos e anexos, respectivamente.

Tabela 4-Análise do colágeno corado por *picrosirus red*, nos diferentes grupos, nos diferentes momentos de análise e testes estatísticos.

| Colágeno | | | | | | |
|-----------------|----------------------------|-----------------------------|----------------------------|----------------------------|------------------------------|-----------------------|
| | 15dias | 30dias | 60dias | 90dias | Friedman | |
| Controle | $\mu= 10,5 /$ $x=11,43$ | $\mu=12,9 /$ $x=12,63$ | $\mu=10,9 /$ $x=10,93$ | $\mu= 11,7 /$ $x=11,97$ | $X2r= 4 /$ $p=0,2615$ | |
| 10Gy | $\mu=16,1 /$ $x=15,2$ | $\mu=14,3 /$ $x=14,67$ | $\mu=13,9 /$ $x=13,97$ | $\mu= 14,2 /$ $x=14,78$ | $X2r=1,25 /$ $p=0,7410$ | |
| 20Gy | $\mu= 16,5 /$ $x=17,17$ | $\mu= 20,8 /$ $x=20,7$ | $\mu=22,4 /$ $x=21,8$ | $\mu= 21,5 /$ $x=21,63$ | $X2r= 11,25$ $/ p=0,0104$ | Obs: 60d e 90d>15d |
| 30 Gy | $\mu= 21,9 /$ $x=21,55$ | $\mu= 33,15$ $/ x=33,15$ | $\mu=33,26$ $/ x=32,94$ | $\mu= 33,4 /$ $x=33,13$ | $X2r= 11 /$ $p=0,0117$ | Obs: 60d e 90d>15d |

| Colágeno | Kruskal-Wallis | |
|----------------|------------------------------|--|
| 15 dias | Hcalc=17,43 / p=0,0006 | Obs: 30Gy> controle |
| 30 dias | Hcalc=20,4 / p=0,0001 | Obs: 30Gy> 10Gy / 30Gy e 20Gy >controle |
| 60 dias | Hcalc= 21,6754 / p=0,0001 | Obs: 30Gy> 10Gy / 30Gy e 20Gy >controle |
| 90 dias | Hcalc=19,8840 / p=0,0002 | Obs: 30Gy> 10Gy e controle |

Houve aumento do colágeno (*picrosirus red*) nos grupos 20 e 30Gy ao longo dos períodos, justificando-se uma fibrose crescente nestes grupos. Quando comparados entre si, observou-se que o grupo 30Gy apresentou maior quantidade de colágeno que os demais. ($p<0,05$)

Tabela 5- Análise dos vasos sanguíneos (HE) , nos diferentes grupos, nos diferentes momentos de análise e testes estatísticos.

| Vasos Sanguíneos | | | | | |
|-------------------------|---------------------------|--------------------------|---------------------------|--------------------------|------------------------------|
| | 15dias | 30dias | 60dias | 90dias | Friedman |
| Controle | $\mu=1,6$ / $x=1,7$ | $\mu=2,3$ / $x=2,1$ | $\mu= 1,6$ / $x=1,8$ | $\mu=1,5$ / $x=1,7$ | $X^2r= 3,3$ / $p=0,34$ |
| 10Gy | $\mu= 2,55$ / $x=2,67$ | $\mu= 3,1$ / $x=3,07$ | $\mu= 2,05$ / $x=0,8$ | $\mu=2,2$ / $x=2,27$ | $X^2r=3,8$ / $p=0,28$ |
| 20Gy | $\mu=2,55$ / $x=2,67$ | $\mu= 3,1$ / $x=3,07$ | $\mu= 2,05$ / $x=1,82$ | $\mu= 2,2$ / $x=2,27$ | $X^2r=3,8$ / $p=0,28$ |
| 30 Gy | $\mu= 2$ / $x=2,05$ | $\mu= 2,3$ / $x=2,27$ | $\mu=2,4$ / $x=2,35$ | $\mu= 2$ / $x=1,87$ | $X^2r= 7,45$ / $p=0,0589$ |

| Vasos Sanguíneos | Kruskal-Wallis | |
|-------------------------|----------------------------------|-----------------------------|
| 15 dias | $H_{calc}=17,3$ / $p=0,0006$ | Obs:Controle> 10, 20 e 30Gy |
| 30 dias | $H_{calc}=6,61$ / $p=0,0854$ | |
| 60 dias | $H_{calc}= 3,69$ / $p=0,2969$ | |
| 90 dias | $H_{calc}= 0,63$ / $p=0,89$ | |

Em relação aos vasos sanguíneos não houve diferença significativa entre os grupos ao longo dos períodos. Houve uma significativa diminuição de vasos no dia 15 quando os grupos foram comparados ao controle.

Tabela 6- Análise dos anexos (HE) , nos diferentes grupos, nos diferentes momentos de análise e testes estatísticos.

| Anexos | | | | | |
|-----------------|----------------------------|----------------------------|-----------------------------|----------------------------|-------------------------------|
| | 15dias | 30dias | 60dias | 90dias | Friedman |
| Controle | $\mu=10,8$ / $x=10,18$ | $\mu=14,9$ / $x=16,28$ | $\mu= 21,7$ / $x=21,94$ | $\mu=19,2$ / $x=19,42$ | $X^2r=6,36$ / $p=0,0954$ |
| 10Gy | $\mu=11,55$ / $x=11,85$ | $\mu= 12,2$ / $x=12,08$ | $\mu= 19,35$ / $x=17,55$ | $\mu=9,5$ / $x=9,35$ | $X^2r= 10,85$ / $p=0,0126$ |
| 20Gy | $\mu=12,45$ / $x=13,18$ | $\mu= 7,4$ / $x=7,27$ | $\mu= 9,1$ / $x=12,77$ | $\mu= 10,6$ / $x=11,02$ | $X^2r=6,2$ / $p=0,1023$ |
| 30 Gy | $\mu= 6,4$ / $x=6,43$ | $\mu= 8,1$ / $x=8,35$ | $\mu= 5,3$ / $x=5,32$ | $\mu= 5,1$ / $x=5,05$ | $X^2r= 7,4$ / $p=0,0602$ |

| Anexos | Kruskal-Wallis | |
|----------------|------------------------------|---------------------------|
| 15 dias | Hcalc= 13,34 / $p=0,0039$ | Obs: 10 e 20 Gy>30 Gy |
| 30 dias | Hcalc=18,35 / $p=0,0004$ | Obs: Controle>20 e 30 Gy |
| 60 dias | Hcalc= 15,88 / $p=0,0012$ | Obs:controle e 10Gy> 30Gy |
| 90 dias | Hcalc= 12,5 / $p=0,0058$ | Obs: controle>30 Gy |

Em relação aos anexos houve uma diminuição do número de anexos ao longo dos períodos, porém não foi significativa. Quando comparados entre si, o grupo de 30Gy apresentou menor número de anexos que o controle nos 30, 60 e 90 dias ($p<0,05$).

Os coelhos do grupo 30Gy apresentaram espessamento progressivo da pele. A pele era densa e inelástica com ulceração (Figura 20). A análise histopatológica evidenciou espessamento da derme com deposição de colágeno progressiva (Figura 21).

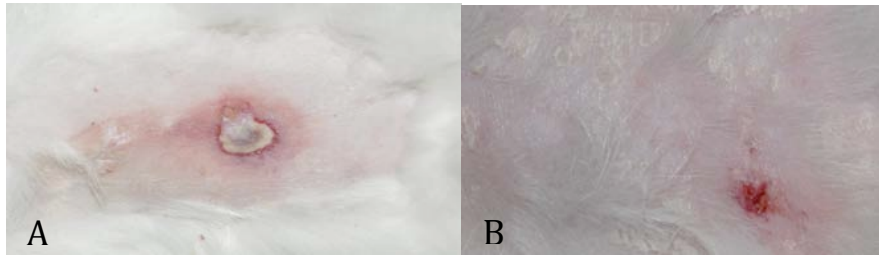


Figura 20- Análise macroscópica do Grupo 30Gy aos 30 dias (A) e aos 60 dias (B) após a radioterapia: Observe lesão grau 4 com ulceração em A e grau 3 com dermatite exsudativa e edema intenso em B.

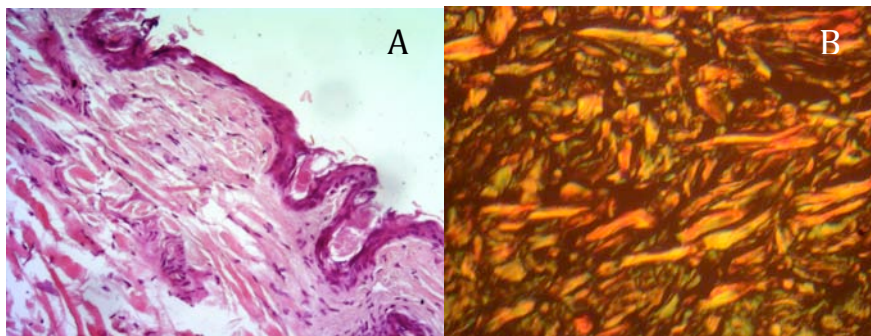


Figura 21- Análise histopatológica do Grupo 30Gy após 60 dias de radioterapia corado por hematoxilina-eosina (A) e por *picrosirius red* (B) (Grau de aumento 200X): Observado uma diminuição no número de vasos sanguíneos, glândulas sudoríparas e folículos pilosos (A) e houve aumento na coloração do *picrosirius red*, marcador de fibrose (B).

6. DISCUSSÃO

Um modelo experimental é a materialização da realidade (FERREIRA & FERREIRA, 2003; FERREIRA, HOCHMAN, BARBOSA, 2005; HOCHMAN *et al.*, 2004). Os modelos experimentais de radiodermatite são escassos. ARCHAMBEAU *et al.* (1984) descreveram um modelo em suínos, THANIK *et al.* (2011) descreveram um modelo em murinos. Não foram encontrados na literatura modelos experimentais padronizados de radiodermatite em coelhos.

Os coelhos, animais de médio porte, apresentam reações cutâneas semelhantes ao humanos, quando em contato com fortes irritantes cutâneos e sua formação de anticorpos é resistente a radioterapia, diferentes dos ratos (RICHTER & ABOU, 1969; PHILLIPS *et al.*, 1972; MARTIN, LEFAIX, DELANIAN, 2000). O uso de um modelo em coelhos oferece outras vantagens, como o baixo custo, fácil manuseio e principalmente uma adequada área doadora de tecido adiposo no dorso, diferente dos murinos (FRAGA *et al.*, 2008; SILVA *et al.*, 2012; PELEGRINE *et al.*, 2014).

THANIK *et al.* (2011) utilizaram um modelo de radiodermatite para murinos tracionando e isolando a pele com estacas de madeira, com o intuito de isolar a pele do restante do organismo, evitando-se lesões em vísceras. A irrigação da pele após o clampeamento com as estacas foi avaliada através de um ultra-som doppler, comprovando que não há alteração na circulação. Dessa forma, com este mesmo intuito foram utilizadas as estacas de madeira por MEIRELLES *et al.* (2013).

A exposição da pele à radiação ionizante causa efeitos agudos e crônicos. Durante a fase aguda, as células inflamatórias, como os macrófagos são acionados e tornam-se evidentes o eritema, a dermatite exsudativa e a ulceração. A fase crônica é conhecida como fase

proliferativa, com aumento dos miofibroblastos. A combinação de fibrose perivascular pela ativação de miofibroblastos e seus efeitos ao endotélio podem causar hipovascularização e fibrose crônica (GABBIANI, 1994; DESMOULIERE, 1995; POWELL *et al.*, 1999; MARTIN, LEFAIX, DELANIAN, 2000; FLANDERS, SULLIVAN, FUJII, 2002). Essa fibrose é caracterizada por deposição excessiva de colágeno, alterações de vasos sanguíneos, perda de folículos pilosos e espessamento da derme (ARCHAMBEAU, PEZNER, WASSERMAN, 1995; O'SULLIVAN & LEVIN, 2003; HYMES, STROM, FIFE, 2006). A deposição progressiva do colágeno, espessamento da pele e alopecia foram características observadas neste estudo e mimetizam a radiodermatite humana.

Este modelo reproduz adequadamente as mudanças observadas nos humanos com lesões induzidas por irradiação. Foi possível avaliar e classificar as áreas irradiadas através de análise fotográfica e a escala RTOG, mais utilizada na classificação de radiodermatite em humanos. Essa classificação não foi previamente descrita para estudos experimentais. Apesar disso, poderia ser usada, pois as dosagens são comparadas as usadas em protocolos de tratamento humano e as mudanças macroscópicas foram semelhantes.

O modelo experimental de murinos descrito por THANIK *et al.* (2011) utilizou as dosagens de 30, 45 e 50Gy. Durante o estudo piloto, MEIRELLES *et al.* (2013) demonstraram que a dosagem de 45 Gy foi excessiva. Os dois animais submetidos a essa dose de radioterapia evoluíram ao óbito. Um deles apresentou necrose de vísceras e outro com necrose de todas as camadas da pele. Dessa forma, buscando evitar efeitos colaterais aos órgãos adjacentes, este estudo utilizou doses menores 10, 20 e 30 Gy. Uma dosagem intermediária, por exemplo 25 Gy não foi utilizada, pois uma diferença de 5 Gy poderia ser insuficiente

para evidenciar alterações significantes entre os grupos. No estudo de THANIK *et al* (2011) a diferença entre os grupos 45Gy e 50 Gy, foi em algumas análises insignificante.

Maior número de colágeno foi evidenciado no grupo de 30Gy, e quanto maior a dosagem da radioterapia maior a deposição de colágeno. Além disso, foi observado uma maior deposição nos 60 e 90 dias, demonstrando as características e efeitos tardios da radioterapia (MEIRELLES *et al.*, 2013). THANIK *et al.* (2011) descreveram achados semelhantes.

Apesar da alteração de vasos sanguíneos não ter sido significativa, foi observada uma diminuição significativa dos vasos sanguíneos no início da radioterapia. Esses achados foram diferentes dos descritos por THANIK *et al.* (2011). Na terapia inicial isso pode estar presente, posteriormente a telangiectasia e angiogênese fazem parte das alterações sofridas pelos vasos sanguíneos (ARCHAMBEAU, PEZNER, WASSERMAN, 1995; O'SULLIVAN & LEVIN, 2003). A justificativa para esse achado em coelhos diferente dos murinos em relação aos vasos sanguíneos, pode estar na divergente resposta imunogênica dos murinos quando submetidos à radiação como descrito por MARTIN, LEFAIX, DELANIAN (2000).

A teoria de dose uniforme equivalente permitiu realizar a radioterapia em dose única, visto que o intuito do fracionamento das doses é evitar efeitos colaterais e neste estudo pretendeu-se criar um modelo com lesão cutânea provocada pela radiação (QIUWEN *et al.*, 2002). Dessa forma, a radioterapia não fracionada em dose única pode ser usada em um modelo experimental de radiodermatite, além de ser mais prático logisticamente. A sedação e manipulação dos animais não foram

necessárias em diversas sessões, e sim, somente numa única vez. THANIK *et al.* (2011) também utilizou a radioterapia em dose única.

A variação do peso observada nesta pesquisa foi evidenciada em outros estudos, tanto experimentais quanto clínicos. A perda ponderal está relacionada com a dose e duração da radioterapia (MUNSHI *et al.*, 2003; BEAVER *et al.*, 2001).

A alopecia foi observada nos grupos 20 e 30Gy. A alopecia após a radioterapia é causada pelos danos às células foliculares associadas com a fibrose (MALKINSON & KEANE, 1981). Após a radioterapia o tecido pode tornar-se espesso, inelástico, hipercrômico e com alopecia. Esses efeitos são considerados dependentes da dosagem, da técnica e da localização (LAWENDA, GAGNE, GIERGA, 2004). Os resultados do presente estudo demonstraram dependência da dose, visto que a alopecia foi mais persistente no grupo 30Gy. Um menor número de anexos, células foliculares, foi observado no estudo, apesar deste achado não ter sido significativo. O grupo de 30Gy apresentou menor número de anexos, justificando a maior durabilidade de alopecia nestes animais (MEIRELLES *et al.*, 2013).

A concordância entre os radioterapeutas foi significativa. Assim, pode-se perceber uma boa reprodutibilidade deste modelo. Além disso, os resultados macroscópicos e microscópicos foram semelhantes entre os animais de um mesmo grupo, corroborando a reprodutibilidade.

O desenvolvimento de um modelo em coelhos que mimetiza a radiodermatite e viabiliza o estudo de sua patogênese e potenciais tratamentos é essencial.

Dentro das perspectivas que se abrem com os dados obtidos com esse estudo é a presença de um modelo experimental em animais de médio porte, seguro e reprodutível e quando associado à novas evidências científicas que revelam o potencial terapêutico das células tronco mesenquimais do tecido adiposo para revascularização de tecido isquêmico e restauração de função, com potencial a se tornar uma boa opção terapêutica para a radiodermatite no futuro próximo (EVANS & KAUFMAN, 1981; THOMSON *et al.*, 1998). Um modelo de radiodermatite em coelhos que apresentam uma boa área doadora de tecido adiposo no dorso ou região inguinal (FRAGA *et al.*, 2008; SILVA *et al.*, 2012; PELEGRINE *et al.*, 2013), poderá viabilizar o uso de células tronco mesenquimais adiposas como uma opção para o tratamento da radiodermatite.

7.CONCLUSÃO

Conclusão

A dosagem de 30Gy foi a mais efetiva para o modelo de radiodermatite em coelhos. Este modelo experimental é reprodutível.

8. REFERÊNCIAS

Referências

Archambeau JO, Ines A, Fajardo LF. Response of swine skin microvasculature to acute single exposures of X rays: quantification of endothelial changes. *Radiat Res.* 1984;98(1):37-51.

Archambeau JO, Hauser D, Shymko RM. Swine basal cell proliferation during a course of daily irradiation five days a week for six weeks (6000 Rads). *Int Radiat Oncol Biol Phys.* 1988;15(6):1383-8.

Archambeau JO, Shymko RM. Tissue population configuration as a modifier of organ dose response. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 1988;15(3):727-34.

Archambeau JO, Pezner R, Wasserman T. Pathophysiology of radiated skin and breast. *Int J Radiat Onco Biol Phys.* 1995;31(5):1171-85.

Beaver ME, Matheny KE, Roberts DB, Myers JN. Predictors of weight loss during radiation therapy. *Otolaryn Head and Neck Surg.* 2001;125(6):645-8.

Berthelet E, Truong PT, Musso D, Grant V, Kwan W, Moravan V. Preliminary reliability and validity testing of a new skin toxicity assessment tool (STAT) in breast cancer patients undergoing radiotherapy. *Am J Clin Oncol* 2004; 27(6):626-31.

Blackmar A. Focus on wound care: radiation-induced skin alterations. *Medsurg Nursing.* 1997;6(3):172-5.

Boots-Vickers M, Eaton K. Skin care for patients receiving radiotherapy. *Prof Nurse.* 1997;14(10):706-8.

Campbell J, Lane C. Developing a skin-care protocol in radiotherapy. *Prof Nurse.* 1996;12(2):105-8.

Cox JD, Stetz J, Pajak TF. Toxicity criteria of the Radiation Therapy Oncology Group (RTOG) and the European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC). *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 1995;30(3):1341-6.

De Conno F, Ventafridda V, Saita L. Skin problems in advanced and terminal cancer patients. *J Pain Symp Manag.* 1991;6(4):247-56.

Referências

- Desmouliere A. Factors influencing myofibroblast differentiation during wound healing and fibrosis. *Cell Biol Int*. 1995;19(5):471-6.
- Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*. 1981;292:154-6.
- Ferreira LM, Ferreira LRK. Experimental model. Historic and conceptual revision. *Acta Cir Bras*. 2003;18 n.spe:1-3.
- Ferreira LM, Hochman B, Barbosa MVJ. Experimental models in research. *Acta Cir Bras*. 2005;20(2):28-34.
- Flanders KC, Sullivan CD, Fujii M. Mice lacking Smad3 are protected against cutaneous injury induced by ionizing radiation. *Am J Pathol*. 2002;160(3):1057-68.
- Fonseca LAM, Eluf-Neto J, Filho VW. Tendência da mortalidade por câncer nas capitais dos estados do Brasil, 1980-2004. *Rev Assoc Med Bras*. 2010; 56(3): 309-12.
- Fraga M, Helene A, Nakamura F, Lellis R, Kikuchi W, Esteban D. Comparative study of the integration and viability of autonomised and nonautonomised autologous fat tissue grafts e experimental model in rabbits. *J Plast Reconstr Aesthet Surg*. 2008;61:1044-8.
- Gabbiani G. Modulation of fibroblastic cytoskeletal features during wound healing and fibrosis. *Pathol Res Pract*. 1994;190(9-10):851-3.
- Gundersen HJ, Bendtsen TF, Korbo L, Marcussen N, Moller A, Nielsen K. Some new, simple and efficient stereological methods and their use in pathological research and diagnosis. *APMIS*. 1988;96:379-94.
- Heggie S, Bryant GP, Tripcony L, Keller J, Rose P, Glendenning M, Heath J. A Phase III study on the efficacy of topical *aloe vera* gel on irradiated breast tissue. *Cancer Nurs*. 2002;25(6):442-51.
- Hochman B, Ferreira LM, Vilas Bôas FC, Mariano M. Experimental model in hamsters (*Mesocricetus auratus*) to study heterologous graft of scars and cutaneous diseases in plastic surgery. *Acta Cir Bras*. 2004;19(1):69-78.

Referências

Hopewell JW. The skin: its structure and response to ionizing radiation. *Int J Radiat Biol.* 1990; 57: 751-73.

Hymes S, Strom E, Fife C. Radiation dermatitis: clinical presentation, pathophysiology, and treatment. *J Am Acad Dermatol.* 2006;54(1):28-46.

Korinko A, Yurick A. Maintaing skin integrity. *Am J of Nurs.* 1997;97(2):40-4

Lawenda BD, Gagne HM, Gierga DP. Permanent alopecia after cranial irradiation: dose-response relationship. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2004;60:879-87.

Lopez E, Nunez MI, Guerrero MR, del Moral R, de Dios Luna J, del Mar Rodriguez M, Valenzuela MT, Villalobos M, Ruiz de Almodovar JM. Breast cancer acute radiotherapy morbidity evaluated by different scoring systems. *Breast Cancer Res Treat.* 2002;73(2):127-34.

Malkinson FD, Keane JT. Radiobiology of the skin: review of some effects on epidermis and hair. *J Invest Dermatol.* 1981;77:133-8.

Marta GN, Hanna SA, Gadia R. Tratamento com radioterapia de intensidade modulada (IMRT) para câncer de mama. *Rev Assoc Med Bras.* 2014; 60 (6): 508-11.

Martin M, Lefaix J, Delanian S. TGF-beta1 and radiation fibrosis: a master switch and a specific therapeutic target? *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2000;47(2):277-90.

Meirelles RP, Hochman B, Helene JA, Lellis R, Fraga MF, Ferreira LM. Experimental model of cutaneous radiation injury in rabbits. *Acta Cir Bras.* 2013 Nov;28(11):751-5.

Munshi, Anusheel, et al. "Weight loss during radiotherapy for head and neck malignancies: what factors impact it?." *Nutrition and cancer.* 2003;47(2):136-40.

Naylor W. Management of acute radiotherapy induced skin reactions: a literature review. *Eur J Oncol Nurs.* 2001;5(4):221-33.

Referências

- O'Sullivan B, Levin W. Late radiation-related fibrosis: pathogenesis, manifestations, and current management. *Semin Radiat Oncol.* 2003;13:274-89.
- Pelegri AA, Aloise AC, Zimmerman A, Oliveira R, Ferreira LM. Repair of critical-size bone defects using bone marrow stromal cells: a histomorphometric study in rabbit calvaria. Part I: Use of fresh bone marrow or bone marrow mononuclear fraction. *Clinical Oral Implants Research.* 2014;25: 567-72.
- Phillips L 2nd, Steinberg M, Maibach HI, Akers WA. Comparison of rabbit and human skin response to certain irritants. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1972;21(3):369-82.
- Porock D, Kristjanson L. Skin reaction during radiotherapy for breast cancer: the use and impact of topical agents and dressings. *Eur J Cancer Care.* 1999;8(3):143-53.
- Powell DW, Mifflin RC, Valentich JD, Crowe SE, Saada JI, West AB. Myofibroblasts. I. Paracrine cells important in health and disease. *Am J Physiol.* 1999;277(Pt 1):C1-9.
- Qiuwen Wu et al. Optimization of intensity-modulated radiotherapy plans based on the equivalent uniform dose. *Int J of Radiat Oncol.* 2002; 52:224-35
- Rice AM. An introduction to radiotherapy. *Nurs Stand.* 1997;12(3):49-54.
- Richter M, Abou N. Cells involved in the immune response. VII. The demonstration, using allotypic markers, of antibody formation by irradiation-resistant cells of irradiated rabbits injected with normal, allogenic bone marrow cells and sheep erythrocytes. *J Exp Med.* 1969;129(6):1261-73.
- Rigter B, Clendon H, Kettle S. Skin reactions due to radiotherapy. *N Zeal Pract Nurs.* 1994; 9:17-22
- Riesz PB. The life of Wilhelm Conrad Roentgen. *AJR Am J Roentgenol.* 1995;165(6):1533-7.

Referências

Röper B, Kalsig D, Auer F, Mergen E, Molls M. Theta-cream versus Bepanthol lotion in breast cancer patients under radiotherapy. A new prophylactic agent in skin care? *Strahlenther Onkol* 2004;180(5):315-22.

Saad E, Hoff P, Canelós R, Kartz A, Novis Y, Pietrocola M, Hamerschlak N, Tabacof J, Gansl R, Simon S. Common toxicity criteria of the National Cancer Institute. *Rev Bras Canc.* 2002;48(1):63-96.

Shakespeare TP, Dwyer M, Mukherjee R, Yeghiaian-Alvandi R, Gebiski V. Estimating risks of radiotherapy complications as part of informed consent: the high degree of variability between radiation oncologists may be related to experience. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2002;54:647-53.

Silva MO, Pelegri AA, Silva AAP, Manhães-Junior LR, Oliveira RME, França S, Aloise AC, Ferreira LM. Xenograft enriched with autologous bone marrow in inlay reconstructions: a tomographic and histomorphometric study in rabbit calvaria. *Int J of Biomat.* 2012;1:1-7.

Sitton E. Early and late radiation-induced skin alterations part 1: mechanisms of skin changes. *Oncol Nurs Forum.* 1992;19(5):801-7.

Szumacher E, Wighton A, Franssen E, Chow E, Tsao M, Ackerman I. Phase II study assessing the effectiveness of Biafine cream as a prophylactic agent for radiation-induced acute skin toxicity to the breast in women undergoing radiotherapy with concomitant CMF chemotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2001; 51(1):81-6.

Thanik VD, Chang CC, Zoumalan RA, Lerman OZ, Allen RJ Jr, Nguyen PD, Warren SM, Coleman SR, Hazen A. A novel mouse model of cutaneous radiation injury. *Plast Reconstr Surg.* 2011;127(2):560-8.

Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz, MA, Swiergiel, JJ, Marshal VS, et al .Embryonic Stem Cell Lines Derived from Human Blastocysts. *Science.* 1998; 282:1145-7.

Weinberg RA. How cancer arises. *Scientific America.* 1996; 275(3): 62-7

FONTES CONSULTADAS

DeCS Descritores em Ciências da Saúde [base de dados na Internet]. São Paulo: BIREME; [citado 2005 Nov 17]. Disponível em: <http://decs.bvs.br/>

Federative Committee on Anatomical Terminology. Terminologia anatômica Internacional. Tradução da Comissão de Terminologia Anatômica da Sociedade Brasileira de Anatomia. São Paulo: Manole; 2001.

Ferreira LM, Goldenberg S, Nahas FX, Barbosa MVJ, Ely PB, Blanes L, Bretos JLG. Orientação Normativa para Elaboração e Apresentação de Teses. Programa de Pós-Graduação em Cirurgia Plástica – UNIFESP. 2008

Graner EA. Estatística. Ed. Melhoramentos. São Paulo, 1966, 187 p.

Haddad N. Metodologia de estudos em ciências da saúde: como planejar, analisar e apresentar um trabalho científico. São Paulo: Roca; 2004.

Hilderley L. Radiotherapy, In: Groenwald SL, Hansen Frogge M, Goodman M, Henke Yarbrow C (eds) Cancer Nursing Principles and Practice 4th edn. Jones and Bartlett publishers, Boston. 1997

Hochman B, Nahas FX, Ferreira LM. Fotografia aplicada na pesquisa clínico-cirúrgica. Acta Cir Bras. 2005;20(supl.2):19-25.

Houaiss A. Dicionário eletrônico Houaiss da língua portuguesa 1.0 [CD-ROM]. Rio de Janeiro: Objetiva; 2001.

International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals. Writing and editing for biomedical publication [text on the Internet]. Vancouver (CA); update 2004 Oct [cited 2005 Nov 1]. Available from: <http://www.icmje.org/>

Michaelis A. Dicionário inglês-português. 25a ed. São Paulo: Melhoramentos; 1997.

Ministério da Saúde/SVS - Sistema de Informações sobre Mortalidade – SIM. Disponível em <http://tabnet.datasus.gov.br> (Acessado em 30 de

março de 2013).

National Library Medicine. List of journals indexed for MEDLINE [monograph on the Internet]. Washington: National Library of Medicine; 2005 Jun [cited 2005 Nov 1]. Available from: <ftp://nlmpubs.nlm.nih.gov/online/journals/ljiweb.pdf>

National Library of Medicine. Bibliographic Services Division. Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals: sample references [text on the Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US); c2003 [updated 2005 Sept 19; cited 2005 Nov 17]. Available from: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

Neter J, Kutner MH, Nachtschiem CJ, Wasserman W. Applied Linear Statistical Models, 4th ed. Boston: McGraw-Hill/Irwin, 1996.

Pellizzon RF, Población DA, Goldenberg S. Pesquisa na área da saúde: seleção das principais fontes para acesso à literatura científica. Acta Cir Bras. 2003;18(6):493-6.

Pérez D'Gregorio, R. Sistema Internacional de Unidades SI. Gac Med Caracas. 2002;110(4):541-64.

Programa de Pós-Graduação em Cirurgia Plástica da Universidade Federal de São Paulo - Escola Paulista de Medicina. Como elaborar uma tese [CD- ROM]. São Paulo: CEDCP; 2004.

Siegel S. Estatística não-paramétrica, para as ciências do comportamento. Trad. Alfredo Alves de Farias. Ed. McGraw-Hill do Brasil. São Paulo, 1975, 350 p.

Siegel, S. E Castellan, JR, N.J. Estatística não para métrica para ciências do comportamento. Segunda edição-Artmed-Porto Alegre-448p 2006.

Souhami R, Tobias J. Cancer and its Management 3rd edn. Blackwell Science , Oxford.1998.

Spector N. Manual para a redação de teses, dissertações e projetos de pesquisa. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1997.

Tortora GJ, Grabowski SR. Principles of Anatomy and Physiology 8th edn. HarperCollins, Menlo Park, California. 199

ABSTRACT

EXPERIMENTAL MODEL OF RADIODERMATITIS IN RABBITS

Introduction: The cutaneous tolerance is a limiting factor for this oncologic treatment. The lack of experimental models is enormous, primarily for mid size animals, such as rabbits.

Purpose: Describe an experimental model of cutaneous radiation injury in rabbits

Methods: On this study 24 six-month-old New Zealand male rabbits, with an average weight of 2.5kg, were used. They were distributed in 4 groups (n=6 per group). The control group did not receive radiotherapy and the others received one radiotherapy session of 10, 20 and 30Gy, respectively. Photographic analysis and histopathological evaluation of the irradiated areas were carried out.

Results: After 30 days, the animals from the control group had all their hair grown. In spite of that, the animals from group 20Gy had a 60-day alopecia and from group 30Gy, a 90-day alopecia. After the 30th day, the 30Gy group demonstrated 90-day cutaneous radiation injuries, graded 3 and 4. A progressive reduction of glands and blood vessels count and an increase on collagen deposition was significant, when the control group is compared to the group 30Gy.

Conclusion: This study demonstrates the dosage 30Gy is the most effective for this experimental model of cutaneous radiation injury in rabbits.

Keywords: Radiation injuries, Rabbits, Radiodermatitis, Experimental, Animal Models.

APÊNDICE I



Universidade Federal de São Paulo
Escola Paulista de Medicina

Comitê de Ética em Pesquisa
Hospital São Paulo

São Paulo, 3 de agosto de 2012
CEP Nº: 0264/12

Ilmo(a) Sr(a)

Pesquisador(a): RAFAEL PANISI DE CAMPOS MEIRELLES

Disciplina/Departamento: Cirurgia Plástica/Cirurgia

Pesquisadores associados: Lydia Masako Ferreira (orientadora), Bernardo Hochman, Murillo Fraga

Parecer Consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo

TÍTULO DO ESTUDO: Modelo experimental de radiodermite em coelhos :

CARACTERÍSTICA PRINCIPAL DO ESTUDO: Experimental, categoria C - estudo crônico

RISCOS ADICIONAIS PARA O PACIENTE: Não se aplica

OBJETIVO DO ESTUDO: Descrever um modelo experimental de radiodermite em coelhos.

RESUMO: estudo com 40 coelhos Nova Zelândia, machos, com 6 meses. Anestésico: ketamina. Eutanásia: cloreto de potássio com anestesia geral prévia. Os animais (n=40) serão divididos em 4 grupos (n= 10 em cada grupo), sendo um grupo controle e os demais submetidos a radioterapia em 30, 45 e 60Gy, respectivamente. A lesão será fotografada e avaliada seriadamente (pré-tratamento -dia 0; 7 dias; 14 dias; 30 dias e 60 dias). A avaliação será realizada por apenas 1 cirurgião plástico da equipe (uni-cego) comparando as lesões dos diferentes grupos. A pele da área delimitada será biopsiada na 2 a ,4 a,6 a e 8 a semana após radioterapia. A fibrose será avaliada utilizando picrossirius red e hematoxilina-eosina, por patologista da Anatomia Patológica da Santa Casa de São Paulo. A área irradiada do dorso do animal será dividida em 4 quadrantes sendo biopsiada aleatoriamente, nunca repetindo o mesmo quadrante.

FUNDAMENTOS E RACIONAL: Cerca de 60% dos pacientes com câncer recebem tratamento radioterápico durante algum estágio do tratamento. A radioterapia pode ser utilizada como tratamento curativo, como método de controle tumoral ou para o manejo dos sintomas relacionados ao câncer. A mesma pode ser usada como tratamento único ou em combinação com quimioterapia ou cirurgia. A complicação mais comum do tratamento radioterápico é a reação aguda da pele conhecida como radiodermite. Isso ocorre pelo alto índice mitótico da camada basal da epiderme. Cerca de 95% dos pacientes tratados com radioterapia apresentam algum efeito colateral na pele. Todos os efeitos agudos e crônicos da radioterapia representam um desafio para a cirurgia plástica e as modalidades terapêuticas são muito limitadas. Uma das limitações nas pesquisas de radiodermite é a escassez de modelos experimentais.

MATERIAL E MÉTODO: Estão descritos os procedimentos do estudo

TCLE: Não se aplica

DETALHAMENTO FINANCEIRO: Sem financiamento externo - R\$ 6400,00

CRONOGRAMA DO ESTUDO: 18 meses

PRIMEIROS RELATÓRIOS PARCIAIS PREVISTOS PARA : 29/7/2013 e 24/7/2014

O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo ANALISOU e APROVOU o projeto de pesquisa referenciado.

1. Comunicar toda e qualquer alteração do projeto.
2. Comunicar imediatamente ao Comitê qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento do estudo.
3. Os dados individuais de todas as etapas da pesquisa devem ser mantidos em local seguro por 5 anos para possível auditoria dos órgãos competentes.

Atenciosamente,

Prof. Dr. José Osmar Medina Pestana
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa da
Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo

APÊNDICE II

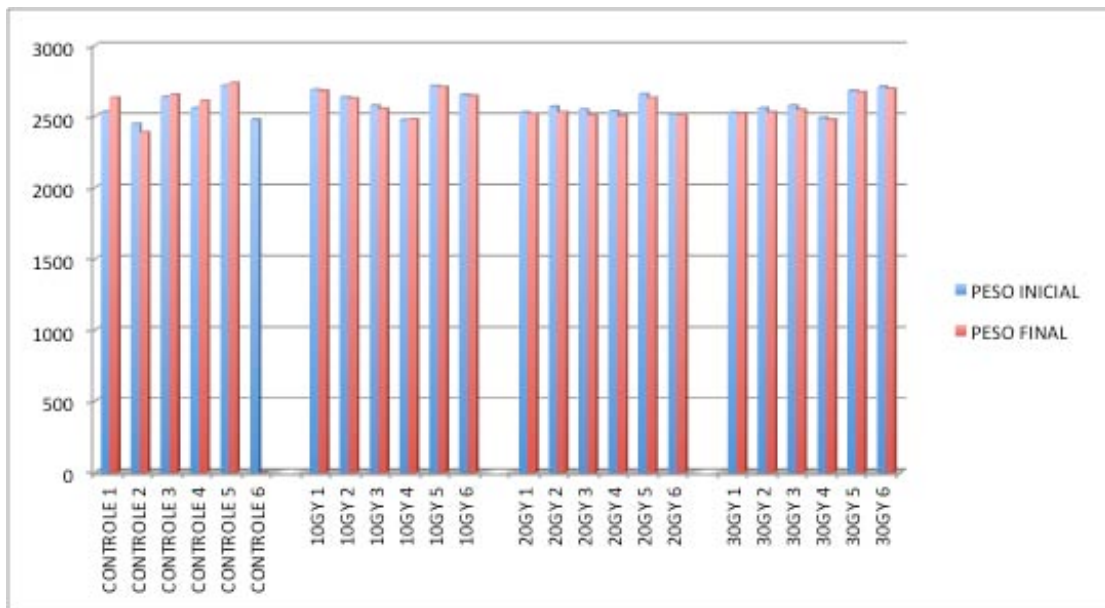


Figura 12- Gráfico demonstrando peso inicial e final nos grupos Controle, 10 Gy, 20 Gy e 30 Gy: Observado perda ponderal significativa quando comparados os grupos. O grupo controle apresentou ganho ponderal significativo já os demais grupos apresentaram perda ponderal.

APÊNDICE III

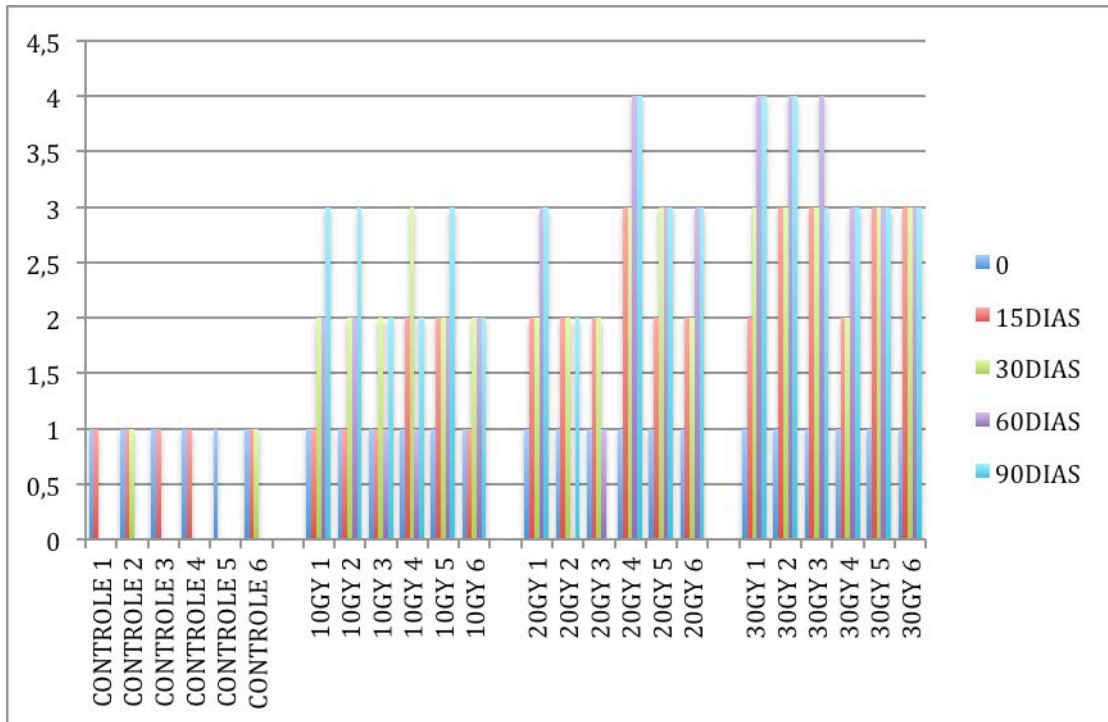


Figura 18- Classificação de radiodermatite (Radioterapeuta II) nos grupos Controle, 10 Gy, 20 Gy e 30 Gy aos 15, 30, 60 e 90 dias.

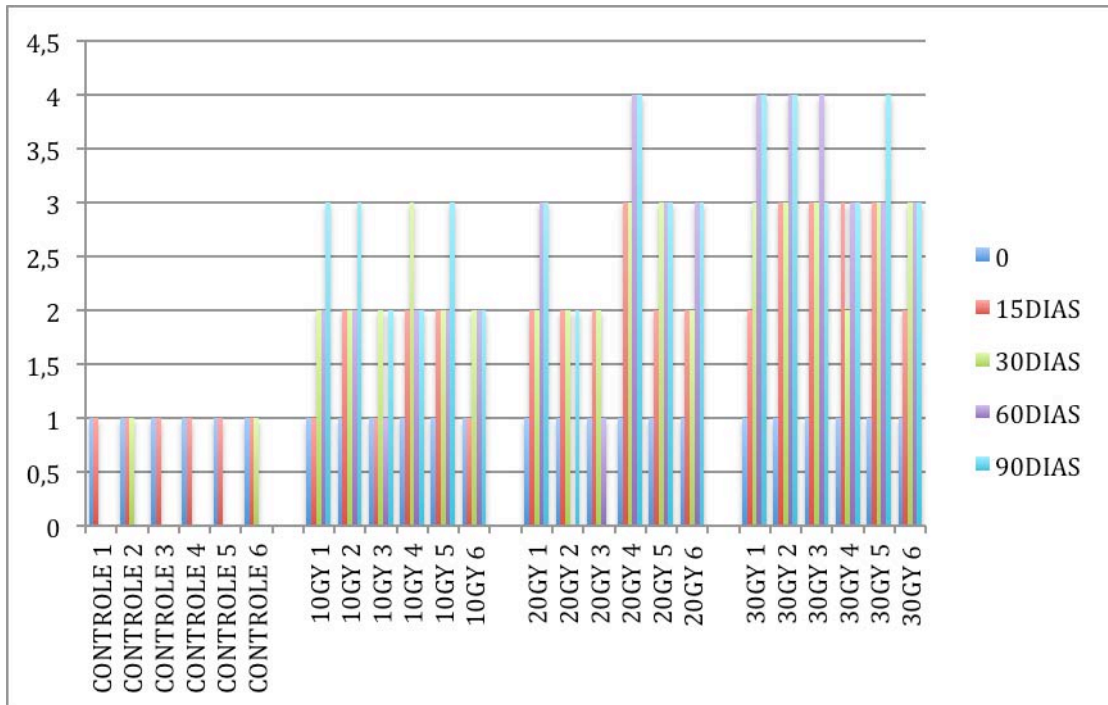


Figura 19- Classificação de radiodermatite (Radioterapeuta III) nos grupos Controle, 10 Gy, 20 Gy e 30 Gy aos 15, 30, 60 e 90 dias.