

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Instituto de Ciências Biológicas (ICB)
Programa de Pós-Graduação em Patologia

IGOR DE CAMPOS FONTES

**ESTUDO CLÍNICO E HISTOPATOLÓGICO DOS EFEITOS DA RADIAÇÃO
IONIZANTE COM DOSE SUBLETAL EM CAMUNDONGOS**

Belo Horizonte

2022

Igor de Campos Fontes

ESTUDO CLÍNICO E HISTOPATOLÓGICO DOS EFEITOS DA RADIAÇÃO
IONIZANTE COM DOSE SUBLETAL EM CAMUNDONGOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais como parte dos requisitos para a obtenção do título de mestre em Patologia – Área de concentração em Patologia Geral.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Gonçalves

Coorientador: Prof. Dra. Paula Peixoto Campos

Belo Horizonte

2022

043

Fontes, Igor de Campos.

Estudo clínico e histopatológico dos efeitos da radiação ionizante com dose subletal em camundongos [manuscrito] / Igor de Campos Fontes. – 2022.
69 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Gonçalves. Coorientador: Prof. Dra. Paula Peixoto Campos.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Patologia.

1. Patologia. 2. Radiação Ionizante. 3. Síndrome Aguda da Radiação. 4. Modelos Animais. I. Gonçalves, Ricardo. II. Campos, Paula Peixoto. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 616



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA DA UFMG

ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO N° 448 DE IGOR DE CAMPOS FONTES

Realizou-se, no dia 13 de julho de 2022, às 14 horas, on-line, a defesa de Dissertação, intitulada *"ESTUDO CLÍNICO E HISTOPATOLÓGICO DOS EFEITOS DA RADIAÇÃO IONIZANTE COM DOSE SUBLETAL EM CAMUNDONGOS"*, apresentada por Igor de Campos Fontes, número de registro 2020673635, graduado no curso de Medicina Veterinária, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em PATOLOGIA, à seguinte Comissão Examinadora: *Profª. Amanda Maria Sena Reis - ICB/UFMG; Residente Pós-Doutorado Dr. Gregório Guilherme Almeida – Fiocruz MG; Profª. Paula Peixoto Campos Lopes, ICB/UFMG – COORIENTADORA; Prof. Ricardo Gonçalves, ICB/UFMG – ORIENTADOR.*

A Comissão considerou a Dissertação:

(X) Aprovada

() Reprovada

Finalizados os trabalhos, lavrei a presente ata que, lida e aprovada, vai assinada por mim e pelos membros da Comissão.

Belo Horizonte, 08 de julho de 2022.

* De acordo com as Normas Gerais de Pós-Graduação da UFMG o grau de Mestre só será concedido ao aluno que entregar ao Colegiado do Curso, no prazo máximo de 60 dias, a versão final da Dissertação, em conformidade com as indicações da Comissão Examinadora. Após a entrega da versão final com a documentação exigida para emissão de Diploma, a secretaria emitirá Certificado de Conclusão do Mestrado.



Documento assinado eletronicamente por Ricardo Gonçalves, Professor do Magistério Superior, em 27/07/2022, às 18:14, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por Paula Peixoto Campos Lopes, Professora do Magistério Superior, em 27/07/2022, às 18:27, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por Amanda Maria Sena Reis, Professora do Magistério Superior, em 28/07/2022, às 18:37, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por Gregório Guilherme Almeida, Usuário Externo, em 01/08/2022, às 12:35, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orcao_acesso_externo=0, informando o código verificador 1621608 e o código CRC E1E25129.

Agradecimento

Nesses 2 anos de jornada muitas coisas aconteceram, vivemos momentos difíceis com a pandemia e muita gente querida se foi nesse período. Talvez agradecer a oportunidade de chegar aqui e reconhecer quem nos ajudou nesses dias em nossa história, seja necessário. E nesse caminho longo de 2 anos de mestrado tenho muito a agradecer as pessoas que se fizeram presentes e participaram ativamente ou em sentimento.

Primeiramente gostaria de agradecer aos meus familiares, minha mãe Maria, que ajudou no que era preciso para finalizar o mestrado. Meu irmão Filipe pelos conselhos e bate papos noturnos sobre a vida. Minhas sobrinhas Ana Clara e Júlia pelas risadas.

Gostaria de agradecer ao meu orientador Ricardo Gonçalves por abrir as portas do LABIM e permitir a descoberta de um mundo novo dos macrófagos. E a todos os meus colegas de laboratório que me ajudaram a desenvolver como mestrando.

Gostaria de agradecer as técnicas do setor de patologia geral, que sempre me aconselharam, em especial: Luciana, Vânia, Jacqueline e a Nay.

Agradecer aos professores do programa que dividiram seus conhecimentos.

E por fim, duas pessoas que apareceram na minha vida e que sem elas eu não conseguiria chegar até o final. Gostaria de agradecer imensamente a Leticia Cristine e a Professora Paula Peixoto Campos, por me ajudarem muito nesse momento e me apoiarem para conseguir finalizar esse ciclo, sou muito grato as duas.

“Ao redor do buraco, tudo é beira”

Ariano Suassuna

RESUMO

A radiação ionizante tem sido utilizada em vários tratamentos de doenças, principalmente na área oncológica, mostrando-se uma interessante ferramenta junto a quimioterapia para a cura ou tratamento paliativo de pacientes. Por outro lado, a radiação pode ser utilizada também como uma arma de destruição em massa, que gera compostos radioativos de difícil rastreamento impedindo o controle clínico adequado dos pacientes. A exposição à radiação acidental ou presumida por radioterapia, pode gerar efeitos colaterais, caracterizados pela chamada doença aguda da radiação e os tratamentos direcionados para as lesões induzidas pela radiação dependem dos sintomas, da dose de exposição bem como do tecido irradiado. Devido às diversas possibilidades de exposição à radiação e as variadas formas de apresentação das doenças causadas pela radiação, modelos experimentais capazes de mimetizar algumas destas situações são importantes ferramentas de estudo. Nesse contexto, o modelo animal de doença de radiação utilizado neste estudo avaliou os efeitos da exposição no corpo inteiro de camundongos C57BL/6, durante um período aproximado de 30 dias após doses letais (7 Gray), subletais (5 Gray) por uma taxa de dose de $0,75 \text{ min}^{-1}$ de raios Gama. Os dados clínicos analisados foram: temperatura e peso corporal, alterações de mucosa e consumo de alimentos. As análises anatomopatológicas foram realizadas nos seguintes órgãos: intestino, pulmão e medula óssea nos grupos de 5 Gy e do grupo controle sem irradiação ao final de 30 dias. Clinicamente, foi observado que a sobrevivência do grupo 7 Gy foi reduzida chegando até 11 dias pós-irradiação e os animais de grupo 5Gy sobreviveram aproximadamente 30 dias após irradiação. As alterações de mucosas e extremidades (patas e focinho) foram mais frequentes no grupo de animais 7 Gy em relação aos animais do grupo 5 Gy. A análise da medula óssea demonstrou hipoplasia de progenitores hematopoiéticos e um aumento do número de adipócitos no grupo 5 Gy. No pulmão foi observado intenso processo inflamatório com espessamento de septo alveolar após 30 dias de irradiação. No intestino as células caliciformes, bem como a arquitetura do colón, estavam preservadas e sem alterações de criptas ou de mucosa ao final do experimento.

Palavras-chave: Modelo experimental; Síndrome Aguda da Radiação; Radiação; Radiação ionizante.

ABSTRACT:

Ionizing radiation has been used in various disease treatments, mainly in the oncology area, proving to be an interesting tool alongside chemotherapy for the cure or palliative treatment of patients. On the other hand, radiation can also be used as a weapon of mass destruction, which generates radioactive compounds that are difficult to trace, preventing adequate clinical control of patients. Exposure to radiation, accidental or presumed by radiotherapy, can generate side effects, characterized by the so-called acute radiation sickness and treatments aimed at radiation-induced injuries depend on the symptoms, the dose of exposure as well as the tissue irradiated. Due to the diverse possibilities of exposure to radiation and the varied forms of presentation of diseases caused by radiation, experimental models capable of mimicking some of these situations are important study tools. In this context, the animal model of radiation disease used in this study evaluated the effects of exposure on the entire body of C57BL/6 mice, during a period of approximately 30 days after lethal (7 Gray) and sublethal (5 Gray) doses at a rate dose of 0.75 min⁻¹ of Gamma rays. The clinical data analyzed were: temperature and body weight, mucosal changes and food consumption. The anatomopathological analyzes were performed on the following organs: intestine, lung and bone marrow in the 5 Gy groups and the control group without irradiation at the end of 30 days. Clinically, it was observed that the survival of the 7 Gy group was reduced up to 11 days post-irradiation and the animals in the 5 Gy group survived approximately 30 days after irradiation. Changes in mucous membranes and extremities (paws and snout) were more frequent in the 7 Gy group of animals compared to animals in the 5 Gy group. Bone marrow analysis demonstrated hypoplasia of hematopoietic progenitors and an increased number of adipocytes in the 5 Gy group. In the lung, an intense inflammatory process with thickening of the alveolar septum was observed after 30 days of irradiation. In the intestine, the goblet cells, as well as the architecture of the colon, were preserved and without changes to the crypts or mucosa at the end of the experiment.

Keywords: Experimental model; Acute Radiation Syndrome; Radiation; Ionizing radiation.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: representação gráfica do espectro eletromagnético	14
Figura 2: Apoptose em células tronco	16
Figura 3: Delineamento experimental	25
Figura 4: Perfil de mucosas	26
Figura 5: Metodologia de quantificação	28
Figura 6: Curva de sobrevivência	29
Figura 7: Consumo médio água	30
Figura 8: Consumo médio ração	31
Figura 9: Peso dos animais 5 e 7 Gy	32
Figura 10: Peso do grupo 5 Gy	33
Figura 11: Temperatura	34
Figura 12: Foto medula óssea	36
Figura 13: Gráfico medula óssea	37
Figura 14: H&E Pulmão	39
Figura 15: PicroSirus Pulmão	40
Figura 16: Gráfico colágeno	41
Figura 17: H&E colón	42
Figura 18: PAS colón	43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Radiossensibilidade dos órgãos	15
Tabela 2: Alterações por observação diária dos camundongos C57BL/6	35
Tabela 3: Perfis inflamatórios nos pulmões	38

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

CDTN - Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear

CID - Classificação Estatística Internacional de Doenças

CTH – Células Tronco Hematopoiética

DDR - DNA Damage Response

DNA - Ácido Desoxirribonucleico

DSB - DNA double-strand break

FDA - Food and Drug Administration

G-CSF - Fator Estimulador de Colônias Granulocitárias

H2ak - Histone cluster

HZ - Hertz

IL-10 – Interleucina 10

IL-1 β – Interleucina -1 β

IL-6 – Interleucina 6

IR – Radiação Ionizante

NF- κ B - factor nuclear kappa B

PAS - Ácido Periódico de Schiff

PBS - Phosphate Buffered Saline

PUMA - Upregulated modulator of apoptosis

RNA - Acido ribonucleico

ROS - Reactive oxygen species

RT – Radioterapia

SAR – Síndrome Aguda da Radiação

Sumário

Sumário

1. INTRODUÇÃO.....	14
1.1 Radiação.....	15
1.2.1 Radiação não ionizante	16
1.2.2 Radiação ionizante	16
1.3 Uso da radiação ionizante como tratamento	18
1.4 Manejo e tratamento de pacientes irradiados.....	18
1.5 Síndrome aguda da radiação (SAR).....	19
1.5.1 Síndrome Hematopoiética	19
1.5.2 Síndrome cerebrovascular.....	20
1.5.3 Síndrome gastrointestinal	20
1.5.4 Síndrome cutânea.....	20
1.6 Órgãos alvo na SAR	21
1.6.1 Medula	21
1.6.2 Pulmão	21
1.6.3 Intestino	22
1.7 Modelos Experimentais	22
2. JUSTIFICATIVA	24
3. OBJETIVO	24
3.1 Objetivos Específicos	24
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	25
3.1 Animais.....	25
3.2 Irradiador	25
3.3 Avaliação dos parâmetros clínicos.....	26
3.4 Análises Anatomopatológicas.....	27
3.5 Contagem de células calciformes e adipócitos – cólon e medula marrom.....	28
3.6 Análises estatísticas	29
4. RESULTADOS	30
4.1 Dados clínicos.....	30
4.1.1 Curva de sobrevida	30
4.1.2 Consumo de água.....	30
4.1.3 Consumo de Ração	31
4.1.5 Peso avaliação semanal – Grupos Controle e 5 Gy	33
4.1.6 Temperatura	34

4.1.7 Alterações observadas.....	35
4.2 Histopatologia.....	36
4.2.1 Medula	36
4.2.2 Pulmão	38
4.2.2.1 Colágeno pulmonar.....	40
4.3 Cólon.....	43
5 DISCUSSÃO.....	45
CONCLUSÃO.....	47
REFERÊNCIA	48
ANEXO 1: PETÉQUIAS NA MUCOSA DO COLÓN DOS ANIMAIS 5 GY E 7 GY.....	57
ANEXO2: MUDANÇA DE PELO AOS 60 DIAS.....	57
ANEXO 3: CERTIFICADO CEUA 132/2021.....	58

1. INTRODUÇÃO

A radiação é a propagação de energia de um ponto a outro, podendo ser dividida em dois grupos: a radiação eletromagnética (luz visível, raios UV, raios X, raios gama, entre outras) e a radiação corpuscular (partículas alfa, beta e prótons). Atualmente, existe uma crescente utilização e aplicabilidade das formas de radiação fazendo parte do cotidiano das pessoas nas áreas médicas, espaciais e das telecomunicações (BELPOMME *et al.*, 2018; GUPTA; SHARMA; SINGH, 2022). O espectro da radiação depende da sua energia, propagando-se pelo espaço ou por meio material (PERCUOCO, 2013). Dessa maneira, quanto mais energética é a radiação, maior é a possibilidade de causar alterações em átomos ou sistemas orgânicos mais complexos (SHAO; LUO; ZHOU, 2014). Em organismos vivos, a radiação pode causar ionização e mudanças nas estruturas atômicas, levando a alterações conformacionais nas proteínas, lipídios e outros componentes celulares, causando assim diferentes patologias. Contudo, as patologias causadas pelas radiações ionizantes são dependentes da dose recebida, taxa de exposição e área corporal acometida (SHAO; LUO; ZHOU, 2014; VAÑÓ *et al.*, 2017).

A exposição completa do corpo a uma dose superior a 1 Gray de radiação em seres humanos pode causar a Síndrome Aguda da Radiação (SAR). Além disso, doses locais elevadas podem desencadear danos teciduais severos e morte de diferentes tipos celulares (LÓPEZ; MARTÍN, 2011). A SAR pode progredir com alterações sistêmicas que acarretam mudanças na fisiologia de tecidos orgânicos, ocasionando sub-síndromes em diversos sistemas, tais como sanguíneo, digestivo, nervoso e tegumentar (HIRAMA *et al.*, 2003; VAÑÓ *et al.*, 2017). Os estudos das alterações patológicas da SAR podem ser diferentes dependendo da região corporal atingida, podendo apresentar alterações locais ou sistêmicas (LÓPEZ; MARTÍN, 2011; VAÑÓ *et al.*, 2017). Por isso, vários modelos experimentais vêm sendo estudados para elucidar essas alterações causadas pela radiação e para a descobertas de novos tratamentos (SINGH *et al.*, 2015). Os modelos experimentais para os danos causados pela radiação ionizante ajudam no desenvolvimento de novas drogas e terapias, e regras para utilização de animais experimentais são recomendadas por agências fiscalizadoras pelo mundo (VAÑÓ *et al.*, 2017; WILLIAMS *et al.*, 2010). Uma das exigências para novos fármacos, além do teste *in vitro*, é o teste em duas ou mais espécies diferentes de modelos animais (VAÑÓ *et al.*, 2017). Dessa maneira, a utilização de linhagens que são de fácil criação e manejo como roedores, em especial os camundongos,

é de grande importância para a elucidação dos mecanismos de lesão celular induzidos pela radiação.

Neste trabalho, utilizamos camundongos C57BL6 para avaliar um modelo de dose subletal e dose letal de radiação ionizante em 30 dias, e avaliamos as alterações clínicas e histológicas após a aplicação das doses 5 e 7 Gy de radiação gama.

1.1 Radiação

A propagação de energia pelo espaço ou através da matéria se faz presente no nosso dia a dia. Constantemente, somos expostos a radiação através das ondas eletromagnéticas não ionizantes emitidas por equipamentos domésticos, tais como o micro-ondas; eletroeletrônicos, principalmente celulares e antenas de rádio. Também temos a exposição de radiação ionizante através dos equipamentos de diagnósticos (Figura 1) (BELPOMME *et al.*, 2018; GUPTA; SHARMA; SINGH, 2022; HENDRY *et al.*, 2009; SHAHBAZI-GAHROUEI; SETAYANDEH; GHOLAMI, 2013; ICNIRP., 2020).

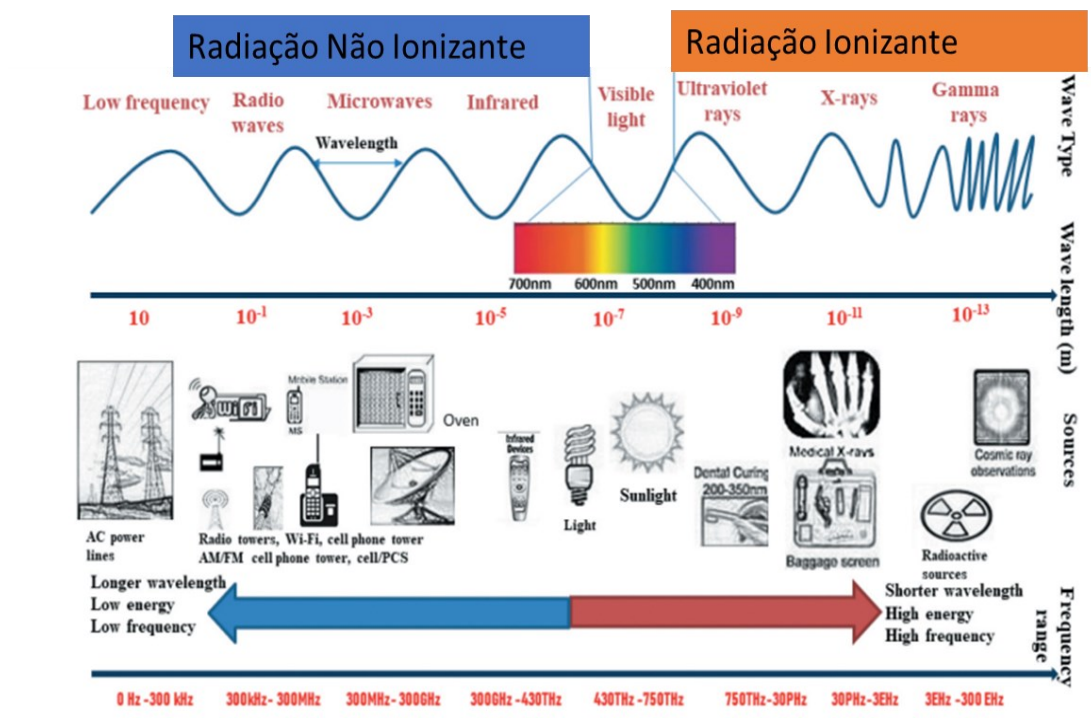


Figura 1: Representação gráfica do espectro eletromagnético. Espectro da radiação não ionizante à esquerda da imagem e ionizante à direita. Na parte inferior, são demonstradas as aplicações das radiações no dia a dia. Imagem editada de: Shiwangi *et al.*, (2020).

1.2.1 Radiação não ionizante

A Radiação não ionizante é a energia eletromagnética que está nos espectros mais baixos de ondas emitidas, inferior a 10 eV, correspondendo a frequências inferiores a 3 PHz (3×10^{15} Hz). A dispersão dessa energia não é capaz de ionizar compostos orgânicos, mas geram alterações energéticas nas estruturas moleculares. Especialistas sugerem a necessidade de mais estudos para avaliar se as radiações não ionizantes podem causar câncer ou alterações relacionadas a outras doenças (BELPOMME *et al.*, 2018; GUPTA; SHARMA; SINGH, 2022; ICNIRP, 2020).

1.2.2 Radiação ionizante

As radiações ionizantes têm como característica a remoção de elétrons de componentes orgânicos, levando à ionização. Isso ocorre pela interação energética com elétrons dessas moléculas. Nos seres vivos a radiação ionizante interage principalmente com os ácidos nucleicos (DNA e RNA), e outros componentes celulares como as membranas lipídicas. Além disso, a radiação pode levar à produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), aumentando os danos teciduais. A dose necessária para causar danos teciduais muda dependendo do órgão alvo, representando uma radiosensibilidade individual para cada tecido exposto (Tabela 1). Assim, elevadas taxas de dose de radiação ionizante (IR) podem levar à Síndrome Aguda da Radiação (SAR), uma síndrome caracterizada por diferentes lesões em diferentes órgãos do corpo (DATTA *et al.*, 2012; PERCUOCO, 2013; VAÑÓ *et al.*, 2017).

Tecidos	WT
Gônadas	0.20
Colón	0.12
Pulmão	0.12
Medula vermelha	0.12
Estomago	0.12
Bexiga	0.05
Mama	0.05
Fígado	0.05
Esôfago	0.05
Tireoide	0.05
Pele	0.01

Superfícies ósseas	0.01
Outros órgãos	0.05

Tabela 1 - Radiossensibilidade demonstrando a sensibilidade à radiação em cada órgão. WT representa a sensibilidade relativa dos órgãos a IR em tratamentos radioterápicos. Quanto maior o valor de WT, maior a sensibilidade daquele órgão à radiação. Fonte: ICPR 2007

A IR induz vários danos ao DNA, que incluem alterações de base, reticulação, quebras de fita simples e quebras de fita dupla (DSBs). Dentre eles, os DSBs são os danos mais prejudiciais ao DNA de uma célula, uma vez que podem provocar quebra nos cromossomos e translocações que estão associadas a muitas doenças humanas, incluindo neoplasias malignas, caso não ocorra o reparo ou a correção genética adequada. Em contrapartida, os DSBs podem efetivamente desencadear uma série de reações denominadas resposta a danos no DNA (DDR) para garantir a detecção rápida e o reparo de DSBs (RITHIDECH *et al.*, 2013; SHAO; LUO; ZHOU, 2014). Alterações no DNA podem induzir as células à apoptose, ativando caspases 3 e 9, através das interações com PUMA (p53 upregulated modulator of apoptosis). Esse processo em lesões causadas por irradiação, afeta principalmente células tronco em fase de proliferação- (Figura - 2) (MARSHMAN *et al.*, 2001; SHAO; LUO; ZHOU, 2014; WU *et al.*, 2005).

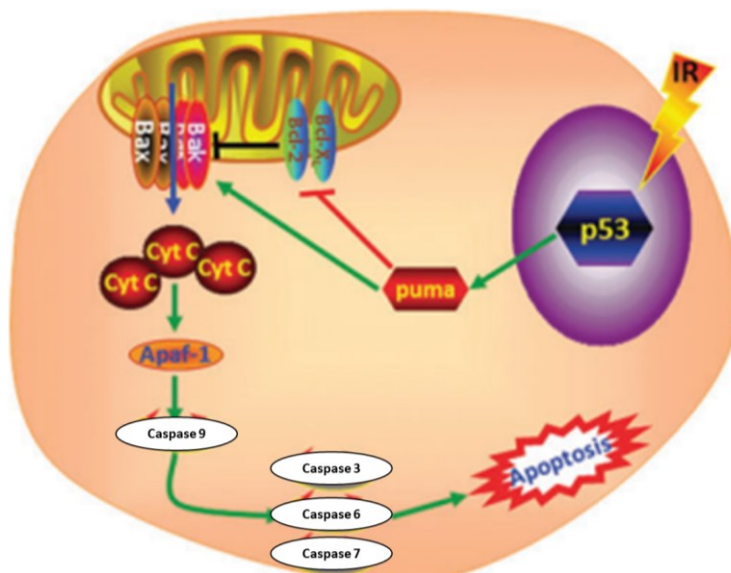


Figura 2: Ativação das vias de apoptose por radiação ionizante. A radiação ionizante desencadeia a ativação da p53, que interage com o complexo de proteínas PUMA. Esta interação é crucial para iniciar a via de apoptose mitocondrial, onde as caspases, especialmente as caspases 3, 6 e 7, desempenham papéis essenciais na execução e modulação do processo de morte celular programada em resposta a condições de estresse. Adaptado. Fonte: Lijan Shao, 2014.

1.3 Uso da radiação ionizante como tratamento

Atualmente, há um crescimento das terapias que utilizam a radiação ionizante para o tratamento de doenças. Em alguns lugares do mundo, o uso da radiação ionizante para o tratamento de câncer pode chegar a ser indicado em até 50% dos casos (LIEVENS; BORRAS; GRAU, 2020). Os avanços atuais nos equipamentos de radioterapia (RT) permitem uma maior entrega da dose em tecidos acometidos por neoplasias malignas, diminuindo os efeitos colaterais e preservando uma maior quantidade de tecidos saudáveis adjacentes. Esse efeito anti-neoplásico se dá por sua capacidade de eliminar células cancerosas, uma vez que estimula a produção de fatores antiproliferativos induzindo apoptose destas células (HILL *et al.*, 2011; KRISHNAN *et al.*, 2019; TALBOT *et al.*, 2019). Desta forma a IR vem sendo empregada de várias formas, podendo ser utilizada como forma de tratamento de tumores de mama, linfomas cutâneos, entre outros. A RT pode ser empregada de forma individual ou associada com outros fármacos oncológicos, contudo, efeitos colaterais podem ser observados (HILL *et al.*, 2011; KRISHNAN *et al.*, 2019; LIEVENS; BORRAS; GRAU, 2020).

1.4 Manejo e tratamento de pacientes irradiados

Devido à magnitude dos acidentes nucleares que já ocorreram no mundo, nos quais um grande número de pessoas foram expostas à radiação, tornou-se de grande relevância clínica a busca por tratamentos capazes de mitigar os efeitos desses acidentes. Um exemplo disso foi a explosão da bomba atômica em Hiroshima em 1945, que deixou cerca de 140 mil pessoas afetadas, resultando em 78 mil mortes (TOMONAGA, 2019). Acidentes nucleares podem gerar milhares de vítimas, levando ao colapso do sistema de saúde e dos hospitais. Por isso, o manejo médico desses pacientes é crucial, envolvendo o cálculo da dose de exposição para adequar o suporte clínico e os medicamentos necessários.(GOANS; WALD, 2005; HIRAMA *et al.*, 2003). Transfusões sanguíneas e possíveis transplantes de células-troncos Hematopoiéticas (CTH) são imprescindíveis em pacientes que tiveram o acometimento medular severo devido à intensa irradiação. O emprego de hemoderivados provenientes de plaquetas pode ser utilizado para controle hemorrágico e transfusão sanguínea com o intuito de recuperar leucócitos totais circulantes. Nas condições de altas doses e acidentes com grande área corporal atingida em doses superiores > 4 Gy, células troncos oriundas do cordão umbilical podem ser utilizadas para recuperação de células progenitoras mieloides (HIRAMA *et al.*, 2003; NAGAYAMA *et al.*, 2002). O uso do fator estimulador de colônias granulócitos (G-CSF) é um importante medicamento utilizado em casos de acidentes radioativos e aprovado para tratar a SAR, com

efeitos estimuladores da medula e capacidade de aumentar a linhagem leucocitária circulante, além de estimular a produção de citocinas e fatores de crescimento na circulação de pessoas atingidas pela IR (HIRAMA *et al.*, 2003; SINGH *et al.*, 2014).

1.5 Síndrome aguda da radiação (SAR)

A SAR ocorre em casos de grande exposição à radiação ionizante, podendo se manifestar no corpo inteiro ou localmente. Devido ao intervalo de horas ou até mesmo dias para o começo dos sintomas, torna-se difícil o diagnóstico precoce da síndrome em pessoas que sofreram um acidente radioativo, o que também retarda o início das contramedidas para o tratamento. No geral, a Síndrome Aguda da Radiação pode ser dividida em subsíndromes, que podem se manifestar em conjunto levando a um quadro de disfunção de múltiplos órgãos. Entre as subsíndromes mais estudadas estão a síndrome hematocitopoiética, síndrome gastrointestinal, cerebrovascular e cutânea (LÓPEZ; MARTÍN, 2011; WASELENKO *et al.*, 2004). Elas podem se manifestar de acordo com a dose e taxa de IR que uma pessoa é exposta, entre outros fatores. Estas subsíndromes apresentam diversos sintomas e sinais. Quando a dose ultrapassa 1 Gy em seres humanos sua manifestação pode apresentar-se através de náuseas, vômitos e febre, o que pode caracterizar o estágio inicial da doença, ou também conhecida como fase prodrômica. Alguns fatores estão envolvidos no agravamento da síndrome, como: ciclo estral, horário da exposição e idade do paciente (DONNELLY *et al.*, 2010).

1.5.1 Síndrome Hematopoiética

As células progenitoras do sistema hematopoiético armazenadas na medula óssea são bastante sensíveis à radiação devido a sua elevada taxa mitótica. Assim, a irradiação pode corroborar com uma perda significativa nos componentes sólidos do sangue. Na fase aguda, após a exposição à radiação ocorre leucopenia severa, afetando principalmente as células polimorfonucleares e os linfócitos circulantes, bem como trombocitopenia que pode estar relacionada a perda de megacariócitos na medula vermelha, predispondo a sangramentos e dificuldade na hemostasia (LÓPEZ; MARTÍN, 2011; SHAO; LUO; ZHOU, 2014; WASELENKO *et al.*, 2004). O aparecimento da linfopenia também é uma consequência comum, podendo ocorrer uma redução dos linfócitos em até 50% em pessoas que receberam uma dose de corpo inteiro (DAINIAK, 2002; LÓPEZ; MARTÍN, 2011; WASELENKO *et al.*, 2004).

1.5.2 Síndrome cerebrovascular

A síndrome cerebrovascular se desenvolve após exposições a doses elevadas de IR. A síndrome cerebrovascular é menos conhecida do que outras síndromes, apresentando alterações cognitivas, febre e hipotensão em exposições acima de 10 Gy. A fase inicial é caracterizada por desorientação, perda de equilíbrio e convulsões. O exame físico pode mostrar papiledema no ventrículo cerebelar, ataxia e alterações dos reflexos de tendões e da córnea. Há a possibilidade de que ocorra melhora clínica dos pacientes no estágio inicial, porém com o tempo os sintomas retornam e o indivíduo evolui para a morte em poucos dias. Em ratos irradiados com dose de 10 Gy foi observado alterações nos níveis de colesterol e diminuição da vasculatura cardíaca com desenvolvimento de fibrose na camada íntima das artérias (ADAMS *et al.*, 2003; BAKER; MOULDER; HOPEWELL, 2011; SHAO; LUO; ZHOU, 2014).

1.5.3 Síndrome gastrointestinal

Alterações intestinais podem ocorrer como diarreia severa, colite aguda e o desenvolvimento de sangramento. Mudanças tardias obstrutivas podem se desenvolver após doses altas locais, onde o espessamento e oclusão do lúmen intestinal acompanham edema de submucosa. As alterações nas vilosidades intestinais podem ser persistentes e culminar com mudança do tipo celular, caracterizando a metaplasia escamosa no colón (FOLLOWILL; KESTER; TRAVIS, 1993).

1.5.4 Síndrome cutânea

O desenvolvimento da síndrome cutânea pode acontecer logo após exposição à radiação, isso dependerá do tipo de exposição e do material radioativo ao qual se foi exposto. As lesões iniciais incluem eritema, edema e descamação. Outras lesões que indicam exposição a altas doses de radiação, incluem bolhas, descamação úmida, úlceras não cicatrizantes e gangrena seca, que pode ser relacionada com a obstrução do leito vascular nas extremidades. É comum ocorrer alopecia e mudanças de coloração dos pelos na região da pele acometida, isso se deve ao fato das células tronco do folículo piloso se diferenciarem sem gerar novas células tronco, o que impede a renovação de sua linhagem (HEMPELMANN *et al.*, 2016; INOMATA *et al.*, 2009). Na radioterapia, as alterações regionais cutâneas são de caráter agudo ou crônico, tem o seu tratamento direcionado aos sintomas, utilizando-se de antissépticos para as infecções

oportunistas e esteroides, para aliviar o processo inflamatório causado pela RT. Os principais sintomas como dermatite escamosa e eritemas podem ser persistentes e alterar a qualidade de vida do paciente, principalmente devido a hipopigmentação e a hiperpigmentação da pele que pode ocorrer ao longo do tempo. As alterações crônicas ocorrem em períodos de meses a anos, com formação de úlceras de difícil cicatrização e telangiectasia na região irradiada o que resulta na formação de fibrose (BRAY *et al.*, 2016; HYMES, STROM, FIFE, 2006).

1.6 Órgãos alvo na SAR

1.6.1 Medula

Células progenitoras da medula óssea (CTH) estão entre as mais sensíveis do organismo e estão sujeitas a aberrações cromossômicas (CAs) e mutações em diferentes níveis. Quando expostas à radiação, as CTH mostram uma parada na fase de proliferação em G2 e uma diminuição de células na fase G1 (RITHIDECH *et al.*, 2013; VALDIGLESIAS *et al.*, 2013). Além disso, uma maior concentração da histona γ H2AX - uma forma fosforilada da H2AX – presente na célula indica uma resposta a quebra da fita dupla do DNA em células da medula. Outras mudanças cromossômicas, como translocação e quebras do DNA também são notadas nas células medulares (RITHIDECH *et al.*, 2013). O perfil de citocinas da medula óssea também sofre variação a IR. Em camundongos irradiados alterações positivas nos níveis de citocinas pro-inflamatórias são detectadas, havendo um aumento nos níveis de NF- κ B, IL-1 β e IL-6 e uma redução de IL-10 após uma hora e meia da exposição à IR (RITHIDECH *et al.*, 2010).

1.6.2 Pulmão

O pulmão é um órgão que sofre alterações morfológicas e celulares quando irradiado, de forma que alterações inflamatórias e pneumonias são evidentes em pacientes pós-radioterapia (L.S.STEFAN *et al.*, 1998). Interleucinas inflamatórias são liberadas nas primeiras horas após IR e o aumento nas concentrações de IL-1 β já foram descritas junto com proporções elevadas de IL-6 nas células epiteliais dos brônquios através de imunohistoquímica (RÜBE *et al.*, 2005).

1.6.3 Intestino

As lesões intestinais por radiação ionizante se manifestam através de úlceras nas mucosas, bem como alterar a conformação das criptas devido às alterações das células tronco. Além disso, a indução de apoptose ocorre em células da submucosa e potenciais quebras da barreira intestinal predisõem a passagem de micro-organismo. Células do sistema de defesa intestinal sofre processo de depleção e mastócitos podem estar reduzidos quando seguimentos ou todo o intestino é exposto a radiação (CAGIN *et al.*, 2016). Em pacientes tratados com RT no sistema circulatório intestinal pode-se encontrar arteriosclerose e formação de edema da submucosa. Alterações crônicas como deposição de fibras no tecido intestinal ocorrem e posteriormente há formação de aderência de alças no abdômen (DEITEL, VASIC, 1979).

1.7 Modelos Experimentais

Modelos experimentais são utilizados para uma melhor compreensão dos eventos da radiação ionizante em situações cotidianas ou acidentais, contudo, os modelos atuais apresentam limitações uma vez que a forma de apresentação da doença pode ter variações dependendo do sítio anatômico afetado, do sexo dos indivíduos afetados, dentre outros. Dessa forma, os órgãos de controle Governamentais como a Food and Drugs Administration (FDA) solicitam que para que um medicamento ou tratamento seja autorizado, experimentos em 2 modelos de diferentes espécies tenham sido avaliadas, ou que sejam utilizados modelos bem caracterizados que simulem a respostas da IR em humanos (SINGH *et al.*, 2015; WILLIAMS *et al.*, 2010).

Os camundongos são os animais mais comumente usados para estudar os efeitos da radiação ionizante (RI). Em experimentos com furões, observou-se que a RI pode causar coagulação intravascular disseminada (CID) e alterações no hemograma. No entanto, esses efeitos não foram observados em roedores quando exposto na mesma faixa de dose ou menores, o que levanta questões sobre as diferenças de resposta à radiação em animais diferentes. Em modelos animais que não apresentam alterações na coagulação, outras mudanças, como alterações medulares e de apoptose, podem ser mais evidentes em baixas doses menores que 2 Gy. (KRIGSFELD *et al.*, 2014; SANZARI *et al.*, 2013). Em cobaias, já foram avaliados os efeitos radiativos em componentes sanguíneos como micronúcleos de linfócitos, e também neurogênicos para receptores colinérgicos na bexiga e contratilidade muscular (J.KEREKES *et al.*, 1988; MCDONNELL *et al.*, 2018)

Os modelos experimentais precisam considerar diversas variáveis, visto que as alterações orgânicas observadas após exposição à radiação, podem variar bastante, seja por exposição acidental de trabalhadores que utilizam a IR em equipamentos médicos para diagnóstico, em casos de terrorismo e também em acidentes de grandes escalas em usinas nucleares. Em situações como em uma explosão de bomba atômica ou acidentes que ocorreram em Chernobyl e Fukushima, os níveis de radiação podem variar de baixas doses a doses agudas. (AEBERSOLD, 2012; AUGUSTINE *et al.*, 2005).

2. JUSTIFICATIVA

Os efeitos da radiação ionizante podem se apresentar de formas diferentes e desencadear desde alterações graves como lesões neoplásicas devido ao seu efeito mutagênico, com desencadeamento de vários tipos de câncer e alterações genéticas, até reações inflamatórias agudas ou crônicas, também deletérias para os indivíduos. Respostas inflamatórias agudas podem gerar graves lesões em alguns órgãos, como por exemplo mucosites, alterando a permeabilidade das mucosas, podendo levar por exemplo à translocação da microbiota e processos infecciosos graves. Já as respostas crônicas com formação de matriz e deposição de colágeno ocorrem entre meses a anos, podendo levar à perda funcional do tecido. Apesar dessas alterações estarem presentes nos tecidos expostos à radiação, o seu desenvolvimento se deve à forma de exposição a RI, as doses e taxas que podem induzir diferentes respostas no organismo. Devido ao aumento da utilização de equipamentos e dispositivos que emitem radiação ionizante, bem como o alto grau de alterações anatomopatológicas provocadas e a falta de tratamento específicos para sua exposição, se faz necessário uma melhor compreensão dos seus efeitos e danos teciduais, e para isso novos modelos que simulem todas as variáveis são de interesse clínico para controle e mitigação dos efeitos da radiação ionizante.

3. OBJETIVO

Analisar um modelo experimental de irradiação para o estudo de alterações clínicas e teciduais características da Síndrome Aguda da Radiação.

3.1 Objetivos Específicos

- Avaliar diferenças de sobrevivência entre animais experimentais submetidos a diferentes doses de radiação (5 e 7 Gy);
- Avaliar os parâmetros clínicos como peso, consumo de água e ração e temperatura nos animais irradiados (5 e 7 Gy) e animais não irradiados;
- Avaliar as alterações anatomopatológicas nos grupos experimentais;

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados camundongos entre 6 a 8 semanas de vida, da linhagem C57BL/6, selvagens, machos, que foram obtidos do Biotério Central da UFMG. Os animais foram mantidos no biotério do Departamento de Patologia Geral sob condições controladas de temperatura (24°C) e luminosidade (ciclo claro/ escuro de 12h) com acesso à ração e água livre durante todo o experimento. Esse trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Minas Gerais (CEUA-UFMG), com o número de protocolo: 132\2021.

1º Experimento: Parâmetros clínicos

- Grupo Controle: Camundongos C57BL/6 controle (N=10).
- Grupo 5 Gy: Camundongos C57BL/6 irradiados com a dose de 5 Gy e taxa 0.75 min (N=10).
- Grupo 7 Gy: Camundongos C57BL/6 irradiados com a dose de 7 Gy e taxa 0.75 min (N=10).

2º Experimento: Parâmetros clínicos e anatomopatológicos

- Grupo 5 Gy: Camundongos C57BL/6 irradiados com a dose de 5 Gy e taxa 0.75 min, (N=5).
- Grupo Controle: Camundongos C57BL/6 controle, (N=5).

3.2 Irradiador

Os animais foram irradiados no Laboratório de Irradiação Gama - LIG do CDTN em um Irradiador Panorâmico Múltipropósito de Categoria II, fabricado pela MDS Nordion no Canadá, Modelo/número de série IR-214 e tipo GB-127, equipado com uma fonte de Cobalto-60 estocada a seco com atividade máxima de 2.200 TBq ou 60.000 Ci.

Delineamento experimental 5 Gy - Monitoramento clínico

O monitoramento clínico ocorreu durante os 30 dias após a exposição a 5 e 7 Gy, a uma taxa de 0.75min^{-1} . Foram utilizados 10 camundongos machos da linhagem C57BL/6 observados diariamente com avaliações visuais até 3 vezes ao dia. Foi analisada a mucosa, a deambulação ao estímulo, alterações de pelo e mudanças no tecido tegumentar. O acompanhamento de temperatura e peso foi feito sempre no mesmo horário uma vez ao dia e, além disso, foi feita a mensuração do consumo de água e alimentos secos.

Delineamento experimental 5 Gy – Anatomopatológico

Os animais foram irradiados e 30 dias após a exposição a 5 Gy (N = 5), a uma taxa de 0.75min^{-1} , foram eutanasiados e os órgãos: medula, pulmão e colón foram coletados para análises histopatológicas. Um grupo controle sem exposição à radiação (N= 5) simulando o trajeto foi utilizado.

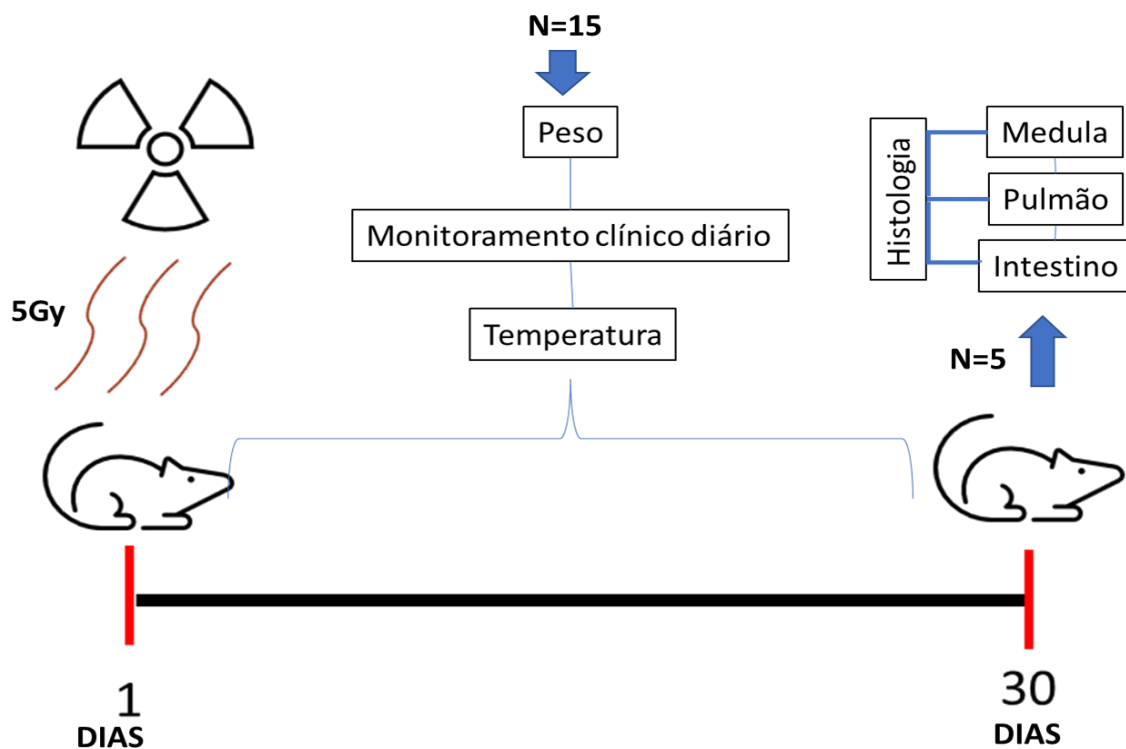


Figura 3: Delineamento experimental mostrando o curso do experimento. O ciclo começa com a irradiação dos animais em um irradiador de Cobalto-60 no Centro de Desenvolvimento de Tecnologia Nuclear (CDTN), seguido pelos processos de avaliação clínica dos animais e posterior processamento histológico.

3.3 Avaliação dos parâmetros clínicos

Os animais e a ração foram pesados em balança semianalítica da marca BD 000,1g / 320g. Com o objetivo de observar o desenvolvimento de massa corporal obtida no início da indução da irradiação de corpo inteiro (dia 0), o peso inicial foi considerado 100%, sendo as alterações diárias (perda ou ganho de massa) computadas individualmente em relação à massa inicial e expressas em porcentagem. Após a pesagem diária dos animais, foram realizadas as medidas de temperatura com termômetro infravermelho da marca Multilaser e coletadas as informações de consumo diário de água e ração. Para o monitoramento de alterações físicas causadas pela irradiação foi utilizado o sistema de recomendação de intervenção para camundongos (MISS),(KOCH *et al.*, 2016), no qual parâmetros como cor de mucosa (Figura 4), peso e comportamentos são utilizados para intervenção.

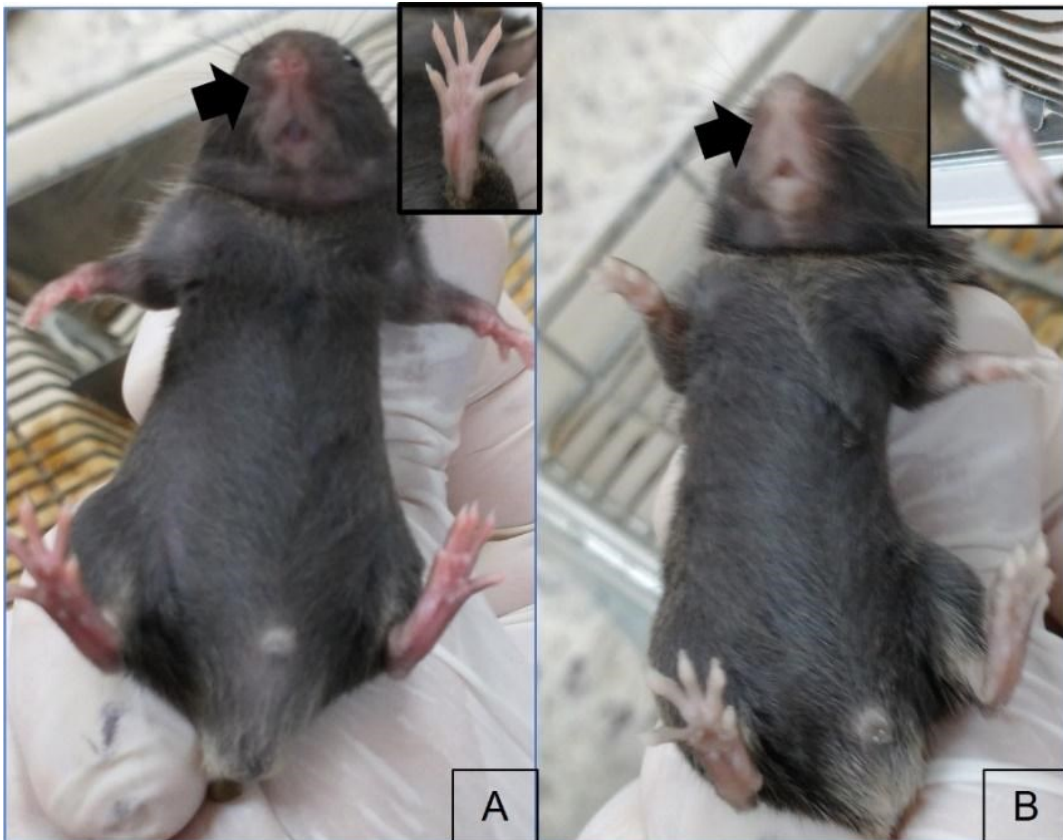


Figura 4: Avaliações clínicas das mucosas dos camundongos: Palidez de focinho e patas de camundongos C57BL/6. A) camundongo controle não irradiados com mucosas coradas. B) Camundongos irradiados com mucosas e peles pálidas.

3.4 Análises Anatomopatológicas

A medula óssea foi colocada em solução de formol tamponado a 4% durante 48 horas e após esse processo foi adicionado em solução descalcificadora contendo 5 ml de ácido fórmico

e depois adicionado 95 ml de água destilada, e permaneceu nessa solução por 24h e posteriormente foi enviado para o processamento e corte histológico, tendo sido corados em H&E. Posteriormente, foi analisado o critério de substituição de medula marrom por medula amarela em coloração de H&E, utilizamos o perímetro da medula óssea vermelha, excluindo as partes de ossos esponjosos e compactos. O preenchimento gerado pelos adipócitos na medula marrom no fêmur dos camundongos foi quantificado por configuração do classificador de pixel do Qupath e empregados em todas as imagens da medula, onde os espaços intramedulares em formato circular do fêmur foram quantificados e selecionados (TRATWAL *et al.*, 2020)

O Pulmão foi removido cuidadosamente e fixado em formol 4% tamponado e posteriormente corado em H&E para análise histológica e avaliação do score inflamatório. Para a quantificação do colágeno as lâminas de tecido do pulmão foram preparadas com uma coloração especial de Picosirus Red, onde o tecido foi desparafinado e hidratado em soluções alcoólicas crescente de álcool, incubado por 1 hora em solução de Sirius red a 0,1%, conforme a padronização da coloração e posterior diferenciação pra avaliação de colágenos do tipo 1 e 3 em luz polarizada (DAYAN *et al.*, 1989).

3.5 Contagem de células caliciformes e adipócitos – cólon e medula marrom

O intestino foi coletado e fixado com em solução de formol e ácido pícrico, enrolado em forma de rocambole e corado usando o corante Ácido Periódico de Schiff (PAS). A contagem de células caliciformes do cólon foi realizada através de 10 fotografias por lâmina/animal, com o total de 50 capturas aleatórias com o auxílio de um microscópio óptico (Olympus BX53) acoplado ao sistema de aquisição de imagens. As áreas das células caliciformes intactas foram então quantificadas com o auxílio do software QuPath configurado o reconhecimento da coloração na mucosa e submucosa, sendo os resultados expressos em áreas por campo subtraindo os espaços negativos e região não glandular no cólon (Figura 5 A). Na medula foram feitas medidas dos padrões das células em imagem negativa da medula e removida a região do osso esponjoso da região medular do fêmur (LIU *et al.*, 2011)(Figura 5-B).

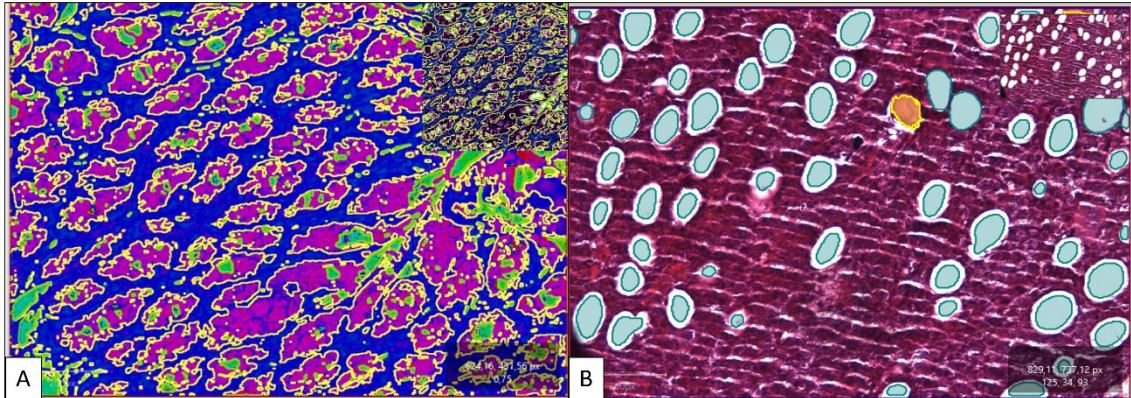


Figura 5: Metodologia de quantificação do padrão intestinal e da medula marrom em software de análise de bioimagem Quptha. A: Na cor azul mostrando células do epitélio intestinal coradas com hematoxilina; cor verde mostra espaço negativo reconhecido pelo software. B: Medula vermelha de fêmur de camundongo mostrando imagem negativa de células da medula amarela preenchendo o espaço.

3.6 Análises estatísticas

Os dados foram analisados conforme a distribuição e normalidade paramétricas e não paramétricas. Para as avaliações clínicas foram utilizados ANOVA e pós-teste de Tukey's ou KRUSKAL-WALLISS pelo pós-teste de DUNNS e para quantificação histológica os métodos utilizados foram o TEST-T ou MANN-WHITNEY. Os valores foram considerados significativos quando $P < 0.05$. As análises ocorreram no software GraphPad Prism V8.0.

4. RESULTADOS

4.1 Dados clínicos

4.1.1 Curva de sobrevida

A irradiação de corpo inteiro pode gerar mudanças clínicas e comportamentais nos camundongos (KOCH *et al.*, 2016). Avaliamos a sobrevida dos animais em 2 faixas de doses, 7 Gy e 5Gy. Os camundongos que receberam a dose 5 Gy tiveram uma taxa de sobrevivência de 100% em 30 dias. Os camundongos irradiados com dose maior, de 7 Gy tiveram uma letalidade de 100 %, (LD 100\30) ao final do experimento (Figura 6).

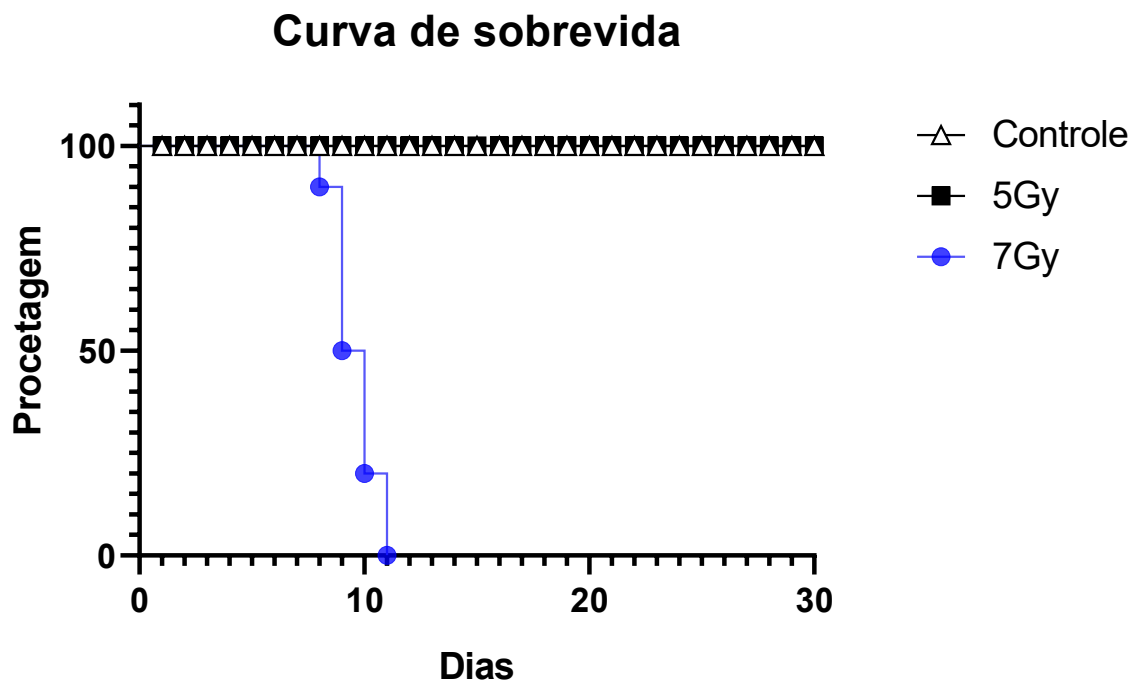


Figura 6: Curva de sobrevida de camundongos após irradiação de corpo inteiro (TBI) $P < 0.0001$ pelo teste de Kaplan-Meier: Os camundongos 5 Gy (N=10) (quadrado) e o grupo Controle (N=10) (Triângulo), uma taxa de sobrevivência de 100% em 30 dias. Camundongos irradiados com dose de 7 Gy (círculo), uma letalidade de 100 % em 11 dias.

4.1.2 Consumo de água

Os grupos irradiados de 7Gy e 5 Gy apresentaram redução significativa da ingestão de água na primeira semana após o evento de radiação quando comparado com o grupo controle.

A avaliação mostrou que o grupo que recebeu 5 Gy recuperou o consumo na última semana, se igualando ao grupo controle (Figura 7).

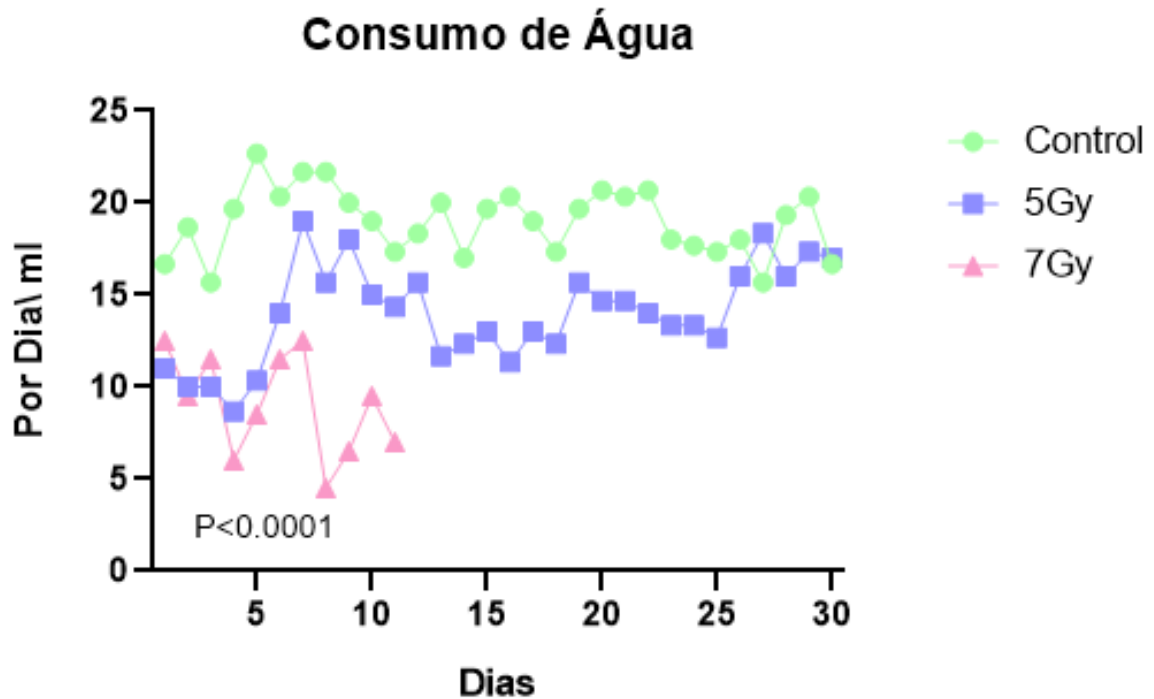


Figura 7: Consumo médio de água dos grupos irradiados comparados com grupo controle. Grupo controle N=10, Grupo 5 Gy N= 10 e grupo 7 Gy N= 10. A avaliação estatística foi feita através do ANOVA, seguido dos pós teste de Tukey P 0.0001 Diferenças significativas em relação ao grupo controle foram encontrados comparadas com o Grupo 5Gy e 7Gy.

4.1.3 Consumo de Ração

A avaliação do consumo de alimentos sólidos seguiu uma tendência de queda nos primeiros dias, sendo que os grupos irradiados apresentaram uma redução mais acentuada do que o grupo controle. Os dados foram analisados usando o ANOVA com o pós teste de Tukey para dados paramétricos. A diferença estatística avaliada foi de $P < 0.0001$ para os grupos em 30 dias. O grupo irradiado com 7 Gy apresentou menor ingestão de matéria seca logo nos primeiros dias após irradiação, com recuperação e um pico de consumo próximo ao sétimo dia. Uma tendência de estabilidade foi avaliada nos animais 5 Gy durante a segunda semana, em contrapartida, os animais com 7 Gy apresentaram outro período de redução da ingestão, o qual durou até o dia do óbito desses animais. Os dados mostram que no final da quarta semana o grupo controle e 5Gy se equiparam na ingestão em gramas dos alimentos. (Figura 8). A ingestão de ração pelos animais que receberam doses de radiação mais baixa também pode ocorrer,

avaliações de dose 2Gy e 4Gy já foram estudadas em um período de 15 dias, onde os animais apresentaram uma redução brusca no consumo de ração já no primeiro dia após exposição a IR, com recuperação do consumo nos dias seguintes (YAMANOUCHI *et al.*, 2019).

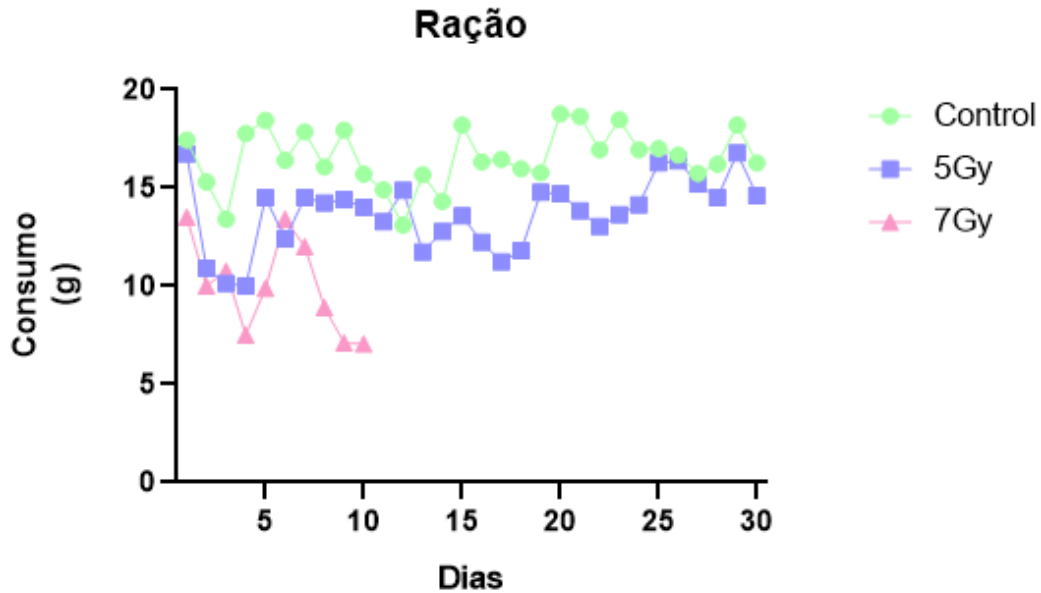


Figura: 8 Consumo médio de ração dos grupos irradiados comparados com grupo controle: $P < 0.0001$ por grupo. Grupo controle $N=10$, Grupo 5 Gy $N= 10$ e grupo 7 Gy $N= 10$. A avaliação estatística foi feita através do ANOVA, seguido dos pós teste de Tukey. Diferenças significativas em relação ao grupo controle foram encontradas comparadas com o Grupo 5Gy e 7Gy.

4.1.4 Peso

A perda de peso é documentada nas avaliações de grupos irradiados com dose letal em modelos de SAR (MOCCIA *et al.*, 2010; YAMANOUCHI *et al.*, 2019). O grupo irradiado com 7 Gy mostrou uma perda progressiva da massa corporal sem recuperação após os 10 dias (Figura 9), já o grupo de dose subletal apresentou a maior diferença de peso na terceira semana após irradiação de corpo inteiro (Figura 10).

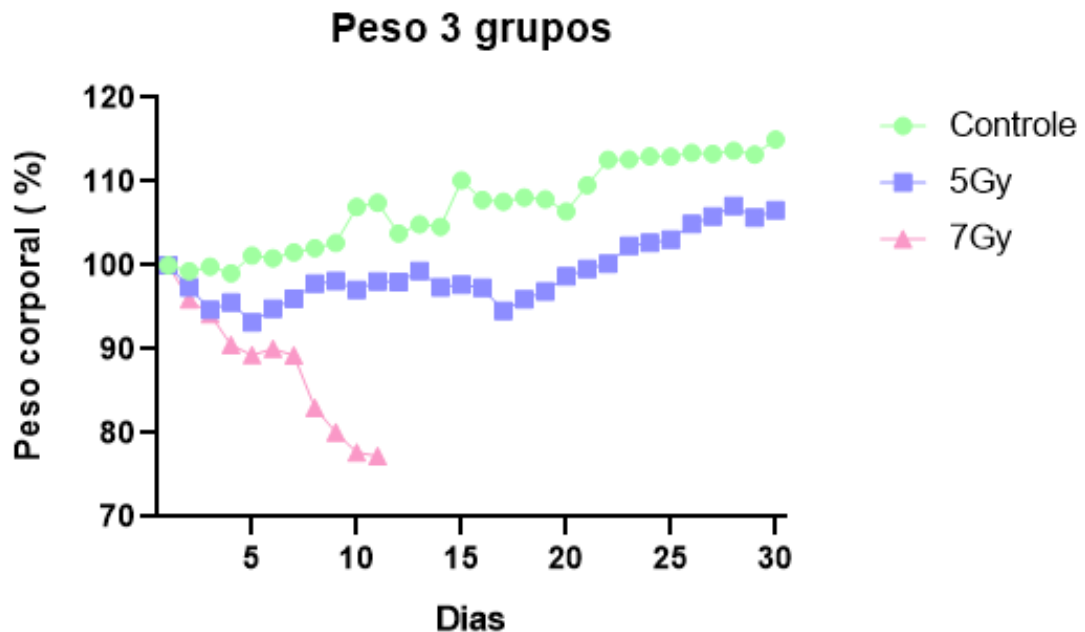


Figura 9: Avaliação da massa corporal média. Os camundongos que foram irradiados com 7Gy (N=10) e 5Gy (N=10) mostraram diferença no perfil de peso corporal, as mensurações eram feitas diariamente e peso dos animais irradiados com 7 Gy um perfil descendente. A avaliação estatística foi feita através do kruskal-wallis, seguido dos pós teste de Dunn. Diferenças significativas em relação ao grupo controle foram encontradas comparados com o Grupo 5Gy e 7Gy, O nível de significância entre os Grupos irradiados 7Gy e 5Gy comparados ao controle foi $P < 0.0001$.

4.1.5 Peso avaliação semanal – Grupos Controle e 5 Gy

No intuito de avaliar melhor as alterações de massa corporal causadas pela exposição às radiações ionizantes reagrupamos os dados por semanas. As análises utilizaram os métodos estatísticos Kruskal-Wallis e Dunns, no qual as diferenças de peso se deram em maior proporção na terceira semana de avaliação, com o $P < 0.0003$ quando comparado com o grupo controle. Na primeira semana não foi demonstrado diferenças estatísticas em alterações de peso, o que evidencia um caráter progressivo da perda de peso nos grupos que sobreviveram.

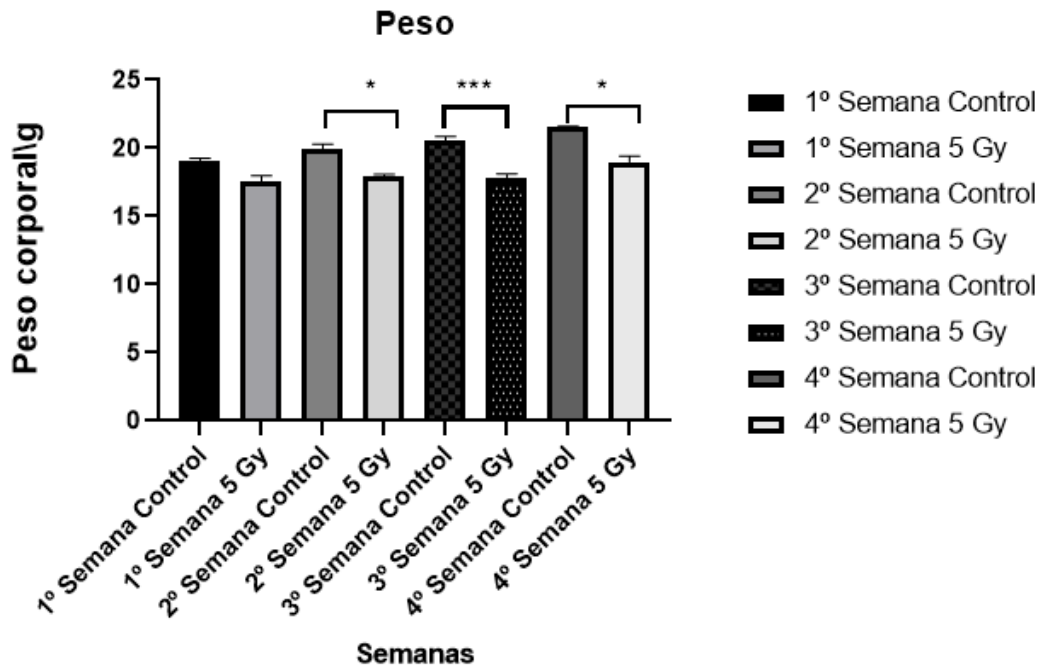


Figura 10: Avaliação da massa corporal média, 1ª à 4ª semana, dos grupos controle e 5 Gy. Notar diferença estatística na 3ª semana após irradiação. $P < 0.05$ e pós-teste de Dunns < 0.0003 , 3ª semana de observação. A segunda semana apresentou diferença < 0.0198 . A quarta semana apresentou diferença < 0.0174 .

4.1.6 Temperatura

A avaliação da temperatura corporal foi mensurada diariamente através de um termômetro de infravermelho totalizando 300 aferições para o grupo controle e 300 aferições para o 5 Gy (Figura 11). Devido a letalidade no grupo 7 Gy foram adquiridas somente 90 aferições. O grupo 5 Gy apresentou diferenças estáticas com o $P < 0.0001$ nos testes quando comparado com os outros grupos. O grupo 7 Gy não apresentou diferenças estatísticas em relação aos outros grupos.

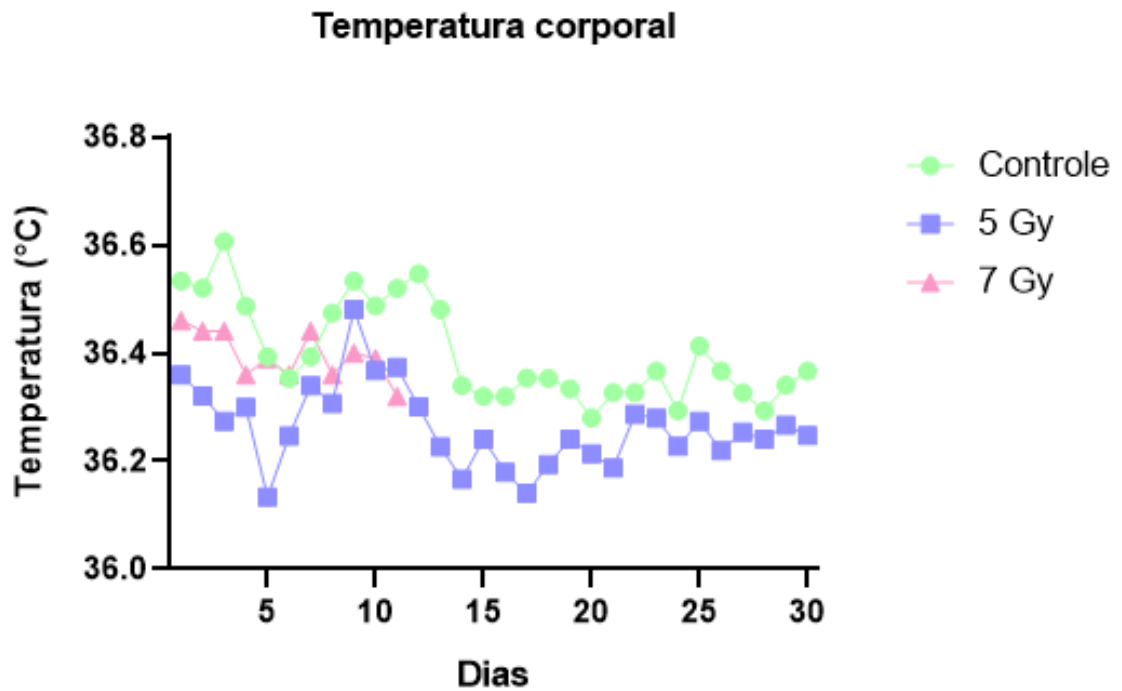


Figura 11: Avaliação da temperatura corporal. Os camundongos que foram irradiados com 5Gy mostraram diferença de temperatura comparados com os grupos Controle e 7Gy, as mensurações foram feitas diariamente e a temperatura dos animais irradiados com 7 Gy não demonstrou diferenças entre o grupo controle. A avaliação estatística foi feita através do kruskal wallis seguido por Dunns. Diferenças significativas em relação ao grupo controle foram encontrados comparados com o Grupo 5Gy, O nível de significância entre os Grupo irradiado 5Gy comparados aos controles e 7 Gy foi $P < 0.0001$.

4.1.7 Alterações observadas

As alterações observadas foram quantificadas em um questionário de monitoramento visual das mudanças causadas pela exposição à radiação (Tabela 2), e as mudanças se apresentaram em maior proporção no grupo exposto a 7 Gy. Alterações em órgãos-alvo vistas na necropsia estão descritas no anexo (1).

Alterações Observáveis 5 Gy -N 15		
Alterações	Nº totais	%
Pelos arrepiados	9	60
Letargia	12	80
Palidez	1	6,667

Alterações Observáveis 7 Gy – N 10		
Alterações	Nº totais	%
Pelos arrepiados	7	70
Letargia	9	90
Palidez	8	80

Tabela 2: Alterações por observação diária dos camundongos C57BL/6.

4.2 Histopatologia

4.2.1 Medula

A exposição à radiação ionizante leva à morte de células progenitoras da medula óssea e a substituição por células adiposas, as quais são resistentes à radiação. Os adipócitos medulares fazem preenchimento do espaço e estimulam outras células do microambiente medular (HOROWITZ *et al.*, 2017). Recentemente foi observado um efeito negativo das células de gordura no tecido medular, pois provocam uma regulação supressora na hematopoiese de animais irradiados (NAVEIRAS *et al.*, 2009).

A avaliação tecidual da medula demonstrou uma perda das células progenitoras nos animais irradiados. As grandes áreas arredondadas de imagem negativa na histologia sugerem a mudança de tecido medular e de células tronco por células de gordura (Figura 12). A avaliação foi significativamente relevante com o $P < 0,0159$ (Figura 13). Essas alterações já foram demonstradas em experimentos semelhantes em doses letais de radiação de corpo inteiro. Apesar dessas alterações, células progenitoras ainda se mantiveram presentes na medula e sua persistência em períodos superiores a 30 dias demonstra a capacidade de resistência dessas células de linhagem sanguínea a determinada dose de radiação administrada.

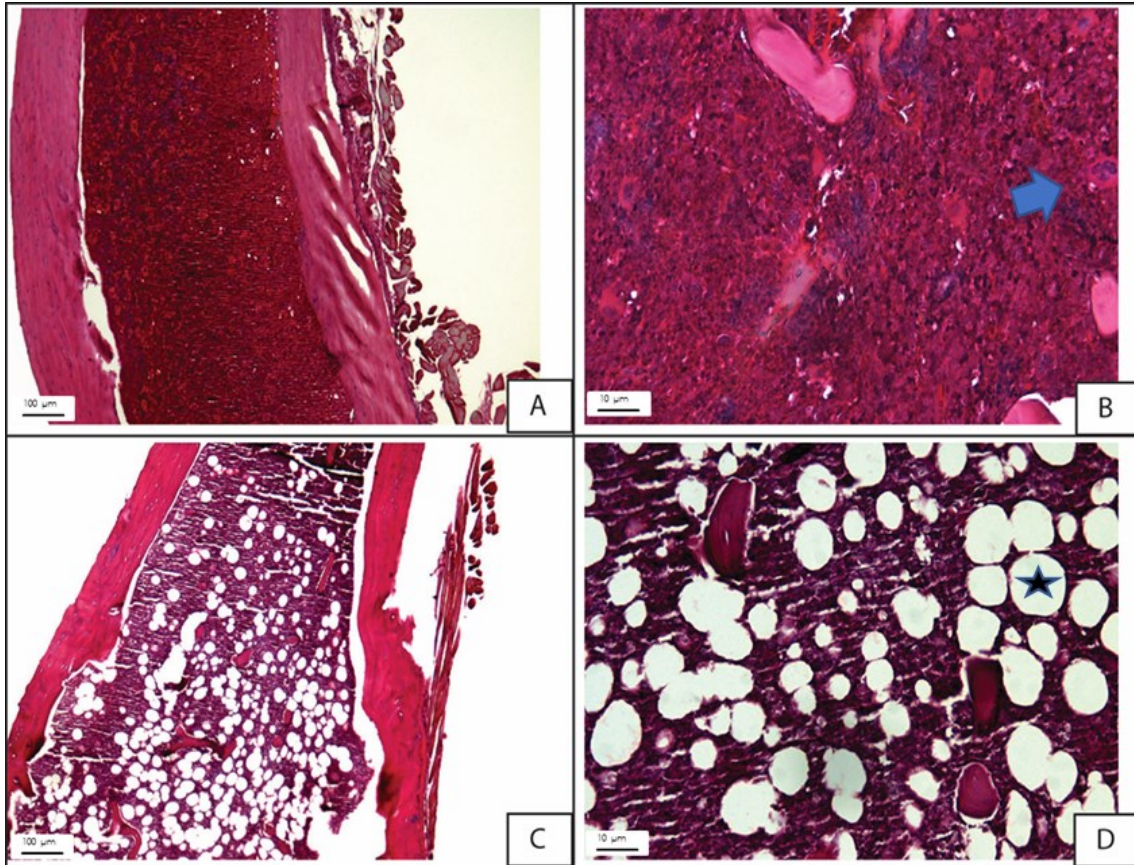


Figura 12: Foto da medula óssea de fêmur de camundongo controle e irradiados 5 Gy.

Imagens A) e B) Demonstra o espaço medular de animais controle sem formação de células adiposas no seu interior, com células troncos diversificadas com parênquima íntegro. Notar a presença de megacariócitos em maior aumento imagem B (seta azul) imagens em 4X e barra em 100 μm e 40X e barra em 10 μm respectivamente. C) e D) Aplasia de medula com formação de células adiposas em imagem negativa no parênquima medular (estrela preta) imagens em 4X e barra em 100 μm e 40X e barra em 10 μm respectivamente.

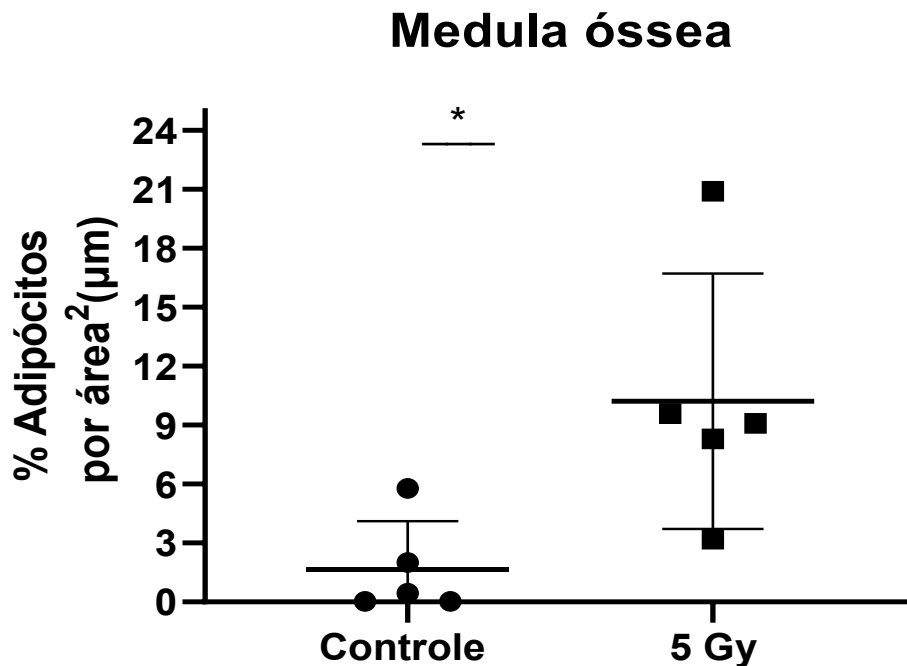


Figura 13: Gráfico Quantificação de adipócitos em coloração H&E em medula óssea de camundongos irradiados-5-Gy (N=5) e controle (N=5). Os camundongos que foram irradiados com 5Gy mostraram um aumento nas células de gordura no interior da medula com diferença estatística $P < 0,0159$ na quantificação. O teste usado foi de Mann-Whitney.

4.2.2 Pulmão

Alterações pulmonares em pessoas que foram expostas a radiação devido ao tratamento de câncer ou em acidentes nucleares têm gerado dúvidas, uma vez que não se sabe como essas alterações são desencadeadas. Os animais irradiados a 5 Gy apresentaram um espessamento de septo alveolar, tal como alterações inflamatórias condizentes com uma pneumonite intersticial crônica. O espaço alveolar não apresentava processos infecciosos, estando livre de exsudato ou extravasamento de líquido característico de edema, mas em contrapartida foi observado um infiltrado inflamatório com presença de células mononucleares em sua maioria composta por macrófagos e linfócitos. Os animais controle tiveram alterações focais em 2 animais com quadro leve de inflamação alveolar, sendo representado por 40% de cada parâmetro avaliado (figura 14). O grupo 5 Gy apresentou em 100% de seus animais um infiltrado inflamatório, sendo caracterizado como leve em 40%, moderado em 40% e 20% dos animais com processo inflamatório intenso. A distribuição no órgão respiratório também foi avaliada e as porcentagem foram de 60% multifocal e 40% local. Os dados são demonstrados na tabela 3

<i>Controle</i>				
<i>Lâminas</i>	Intensidade	Intensidade%	Distribuição	Distribuição%
<i>7 A</i>	Leve	40	Focal	40
<i>8 A</i>	0	60	0	60
<i>9 A</i>	0	60	0	60
<i>10 A</i>	Leve	40	Focal	40
<i>21 A</i>	0	60	0	60
<i>5 Gy</i>				
<i>Lâminas</i>	Intensidade	Intensidade%	Distribuição	Distribuição%
<i>57 B</i>	Intenso	20	Multifocal	40
<i>58 B</i>	Moderado	40	Focal	60
<i>59 B</i>	Leve	40	Multifocal	60
<i>60 B</i>	Leve	40	Focal	40
<i>61 B</i>	Moderado	40	Multifocal	60

Tabela 3: Perfis inflamatórios nos pulmões. Alterações dos perfis inflamatórios nos pulmões de camundongos irradiados (N=5) e camundongos controle (N=5) após 30 dias. Dados demonstrados em porcentagem dos animais observados.

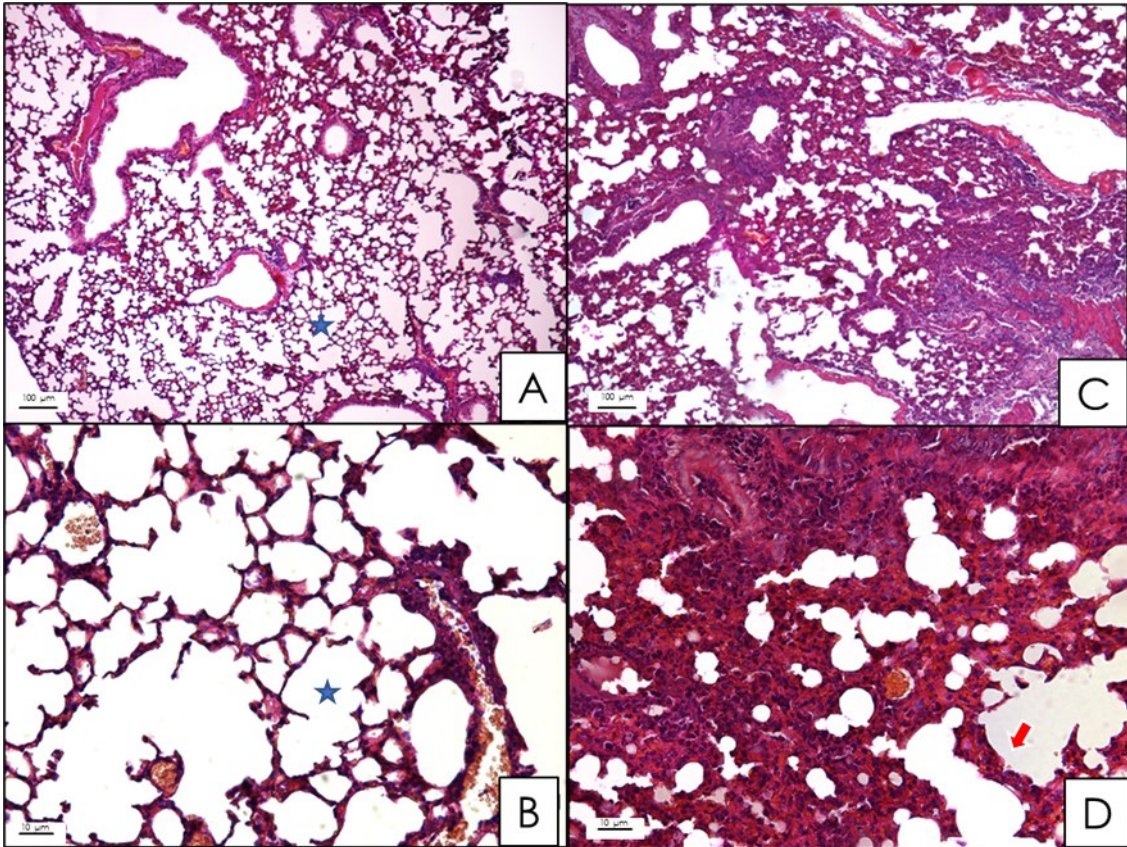


Figura 14: Pneumonia intersticial em animais irradiados a 5Gy de radiação Gama.

Imagens A) e B) mostram animais controle sem infiltrado inflamatório nos alvéolos pulmonares. Notar uma estrela azul evidenciando sacos alveolares limpos sem exsudato e transudato. Imagens C) e D) infiltrado inflamatório multifocal com espessamento de septo (seta vermelha). Imagens A) e C) em objetiva de 4X e barra em 100 µm. Imagens B) e D) em objetiva de 40X e barra em 10 µm.

4.2.2.1 Colágeno pulmonar

A deposição do colágeno nos alvéolos pulmonares dos animais 5 Gy e controle (Figura 15) foram quantificadas histologicamente. O perfil dos colágenos demonstra uma maior concentração na deposição de colágeno no grupo de 5Gy em relação ao grupo controle. Na análise de comparação entre os tipos de colágenos depositados, observou-se uma maior presença de colágeno do tipo III, no grupo 5 Gy ($P < 0,0359$). As deposições somadas dos colágenos do tipo I e III também demonstraram aumento quando comparados com o grupo controle (Figura 16).

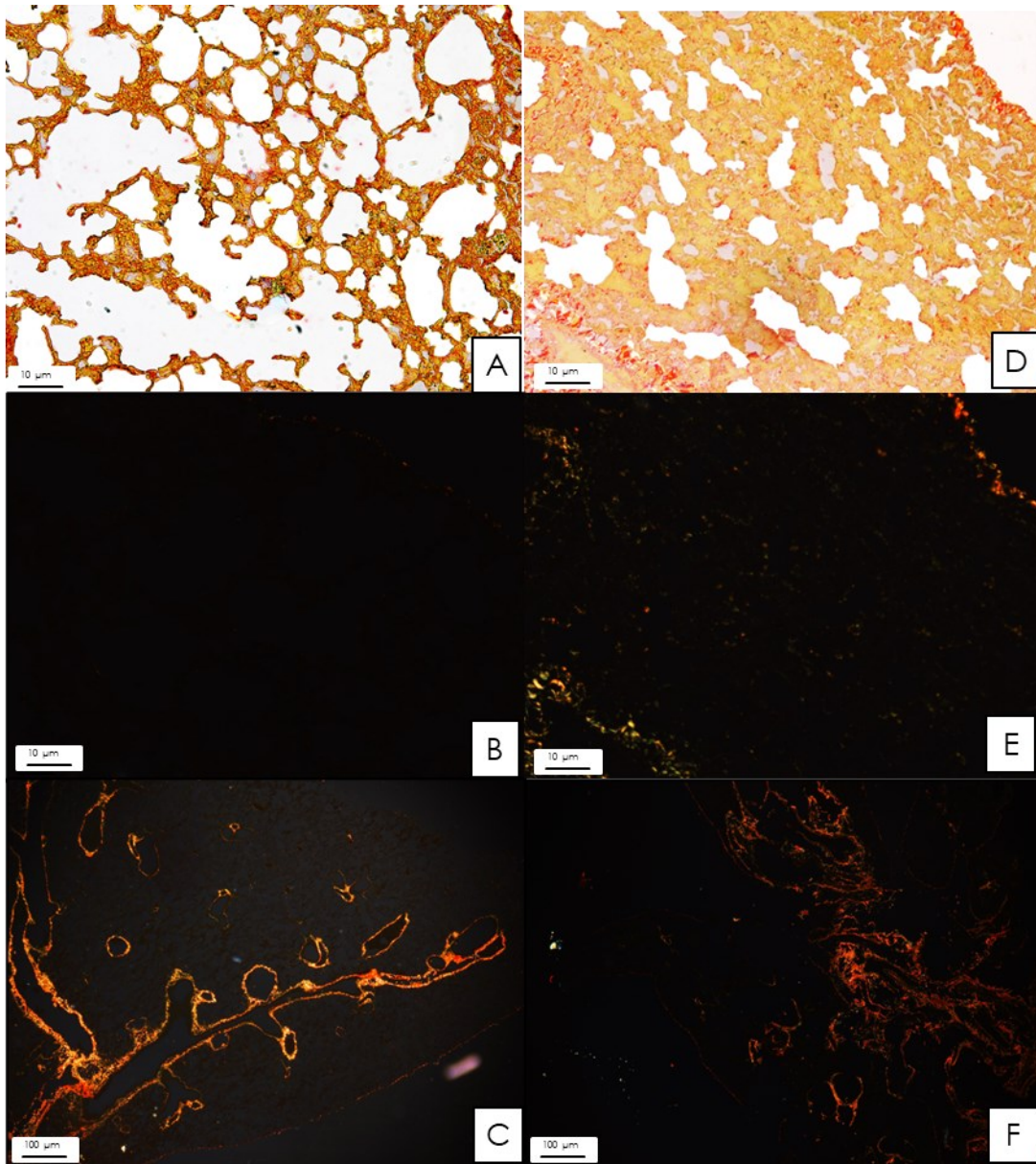


Figura 15: Picrosirius- Red em pulmão de animais C57BL/6 - 5Gy de radiação Gama

Imagens A) e D) mostrando em aumento maior (40x), a sem refringência em luz polarizada no pulmão. Animais controle e 5 Gy de radiação. Imagens B) e E) Em aumento de 40 X, barra em 10 μm . Imagens mostrando maior concentração de reticulina nos alvéolos pulmonares dos animais irradiados com 5Gy ao final de 30 dias após exposição. C) e F) Mostrando em aumento menor (4x) imagem dos animais controle e 5 Gy .

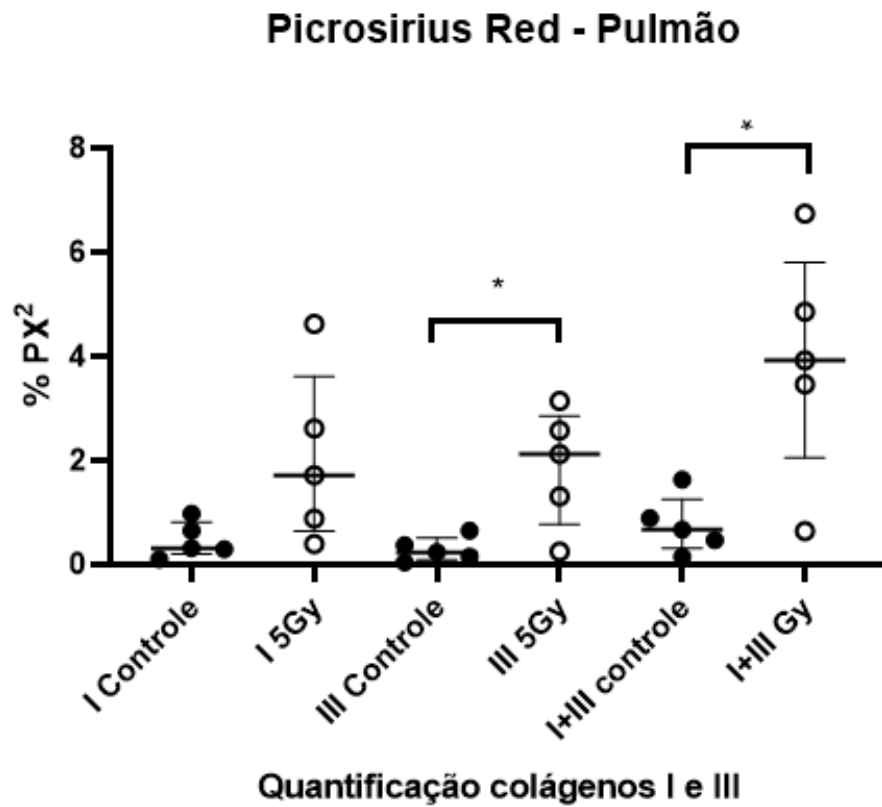


Figura 16: Quantificação de Fibras colágenas em coloração especial de Picrosirius Red em tecido pulmonar de camundongos irradiados- 5-Gy (N=5) e controle (N=5). Diferenças estatísticas na quantificação do colágeno 3 entre grupo controle e irradiados com 5Gy mostraram um aumento na deposição de fibras colágenas no órgão a estatística $P < 0,0359$ na quantificação usando o TEST-T.

4.3 Cólon

Com o objetivo de avaliar alterações anatomopatológicas do intestino grosso, foi analisado o cólon dos animais do grupo 5 Gy, os quais foram irradiados e sobreviveram após os 30 dias de experimento. As principais alterações já descritas que foram observadas nesse segmento do intestino após exposição à radiação são a presença de fusões de criptas e úlceras de mucosa, que não foram encontradas em nossas avaliações (Figura 17). Por meio de análises histoquímicas foram quantificadas as células caliciformes secretoras de muco através da coloração de PAS e não foram observadas diferenças estatísticas na análise (Figura 18).

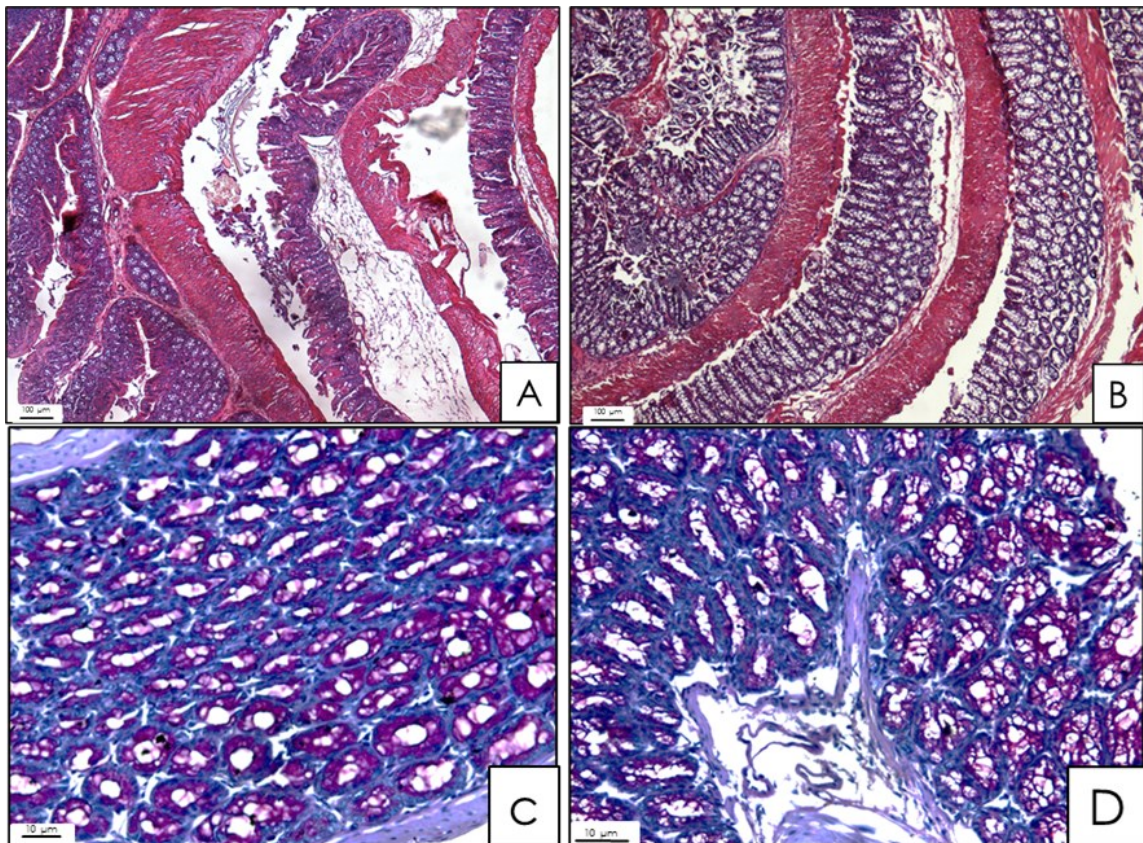


Figura 17: Imagem representativa de cólon de animais controle sem radiação e animais irradiados com 5 Gy após 30 dias de observação. Imagens A) e B) em coloração de H&E demonstrando as camadas do colon: mucosa muscular e adventícia bem preservadas C) e D) coloração de PAS marcando muco em células caliciformes. Imagens A) e B) em objetiva de 4X e barra em 100 µm. Imagens C) e D) em objetiva de 40X e barra em 10 µm.

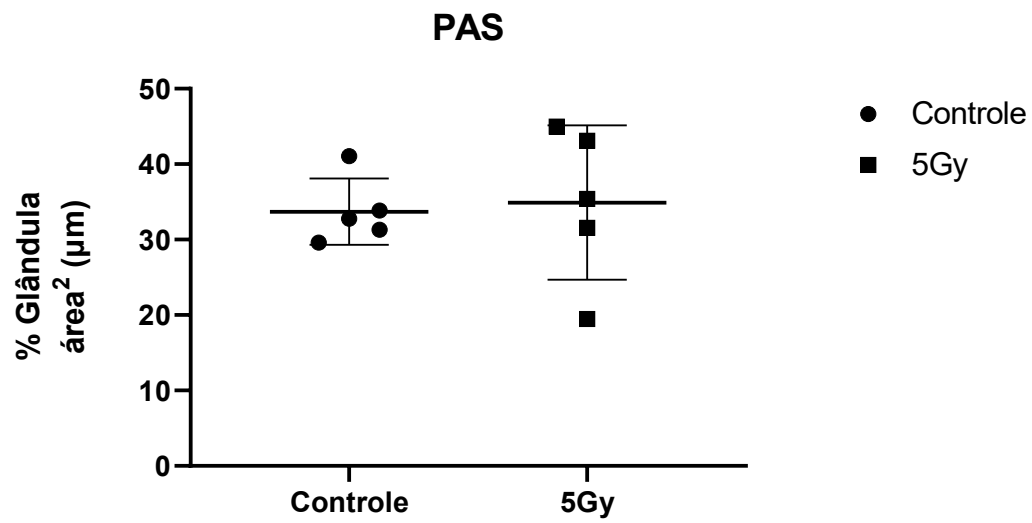


Figura 18: Quantificação de células caliciformes em coloração PAS em segmento de cólon de camundongos irradiados- 5-Gy (N=5) e controle (N=5). Os camundongos que foram irradiados com 5Gy não mostraram alterações nas glândulas do colón, sem diferença estatística $P < 0,0854$ na quantificação. *teste T de student* .

5 DISCUSSÃO

Os efeitos e as consequências da exposição de seres humanos à radiação são motivos de grande preocupação e de demasiada importância clínica. Uma vez que a utilização de equipamentos e dispositivos que emitem radiação ionizante vem aumentando, em tratamentos médicos e diagnóstico complementar nos sistemas de saúde, cada vez mais pessoas e trabalhadores estão expostos a diferentes taxas e doses de radiação. Além disso, recentes tensões e conflitos também trazem apreensão e vem gerando temor devido a possibilidade de utilização de armas nucleares em meio às populações, capazes de liberar grandes taxas de IR e provocar enormes consequências (AHMAD *et al.*, 2019; LEVIN *et al.*, 2005; SURZYKIEWICZ *et al.*, 2022).

Com a finalidade de mitigar os possíveis danos e lesões causadas pela exposição à radiação ionizante, diversos grupos de pesquisa têm buscado modelos experimentais que sejam capazes de mimetizar as alterações orgânicas ocasionadas pela radiação, além de formas de tratamentos que correspondam às necessidades atuais da medicina (SINGH *et al.*, 2015). Entretanto, ainda há uma carência de modelos experimentais que descrevem estas lesões orgânicas quando administradas doses subletais de radiação ionizante.

Sendo assim, para avaliar os efeitos das doses subletais de radiação ionizante utilizamos camundongos da linhagem C57BL/6 que receberam diferentes doses de radiação de corpo inteiro. A radiação ionizante tem a capacidade de desencadear uma cascata de citocinas no organismo e gerar alterações em diferentes tecidos, induzindo apoptose nos tecidos radiosensíveis (LI *et al.*, 2018).

A sobrevida dos animais de 5 Gy foi de 100 % durante os 30 dias observados, contudo, os animais submetidos a 7 Gy morreram até o décimo primeiro dia após exposição. A mortalidade dos animais expostos a dose de 7Gy observada neste estudo pode ter sido influenciada por diversos fatores, visto que em outros trabalhos animais expostos a mesma dose de radiação obtiveram resultados diferentes (DIAZ *et al.*, 2020; PLETT *et al.*, 2011; WILLIAMS *et al.*, 2010). As variáveis metodológicas que podem ocorrer em modelos experimentais são inúmeras, como: O tempo de exposição, sexo, e fatores estressantes (DIAZ *et al.*, 2020; WILLIAMS *et al.*, 2010). O que pode justificar o resultado apresentado neste estudo.

Dentro dos primeiros sintomas que aparecem em indivíduos expostos a radiação estão a anorexia e a apatia, os quais são bem documentados na literatura. Em pessoas expostas a IR, sinais semelhantes ao que ocorre com os animais são descritos, sendo observado uma redução

do consumo de alimentos e de água. Em avaliação de pacientes em radioterapia, em especial aqueles que estão sendo tratados contra o câncer, essas alterações são frequentes (STONE *et al.*, 2004).

O consumo de alimentos e de água dos animais irradiados diminuiu conforme o aumento da quantidade de radiação a que os animais foram expostos, estes resultados corroboram com um perfil já apresentado em outros modelos de dose letal (PLETT *et al.*, 2011). Contudo, os animais do grupo irradiado a 5 Gy recuperaram o consumo alimentar diário e não apresentaram alterações clínicas significativas durante o experimento.

A necessidade de vários modelos experimentais para o estudo das lesões causadas pela exposição à radiação ionizante decorre da característica complexa e diversificada da apresentação destas lesões, que são multissistêmicas e tecido/tempo dependente, além de estarem relacionadas a taxa, dose e a frequência da exposição à IR (SINGH *et al.*, 2015). Nos modelos de radiação definidos, observa-se que distintas doses e taxas de IR às quais os animais são expostos podem corroborar com mudanças no comportamento e na sobrevivência dos animais de acordo com o modelo. Doses baixas de IR, consideradas menores que 1 Gy, oferecem pouco riscos de manifestações da SAR (SINGH *et al.*, 2015; STONE *et al.*, 2004).

Apesar da sobrevivência de 100 % dos animais durante os 30 dias observados, as análises morfológicas dos tecidos, identificaram alterações na medula óssea que permaneceram até final do experimento, mostrando uma substituição da medula marrom por células de gordura, essas alterações podem ser de longa duração, o que pode resultar em alterações nos leucócitos sanguíneos. Além disso a trombocitopenia pode ser um fator resultante da diminuição das células progenitoras medulares, levando a sangramento e complicações que resultam no aparecimento da síndrome aguda da radiação hematopoiética (LI *et al.*, 2018; SCHAUE, 2017).

Em baixas doses, foi visto que a radiação ionizante tem o potencial de atenuar a pneumonia causada por doenças virais como a COVID-19 em pacientes tratados (AMERI *et al.*, 2020), por outro lado, doses mais elevadas têm a capacidade de causar o aparecimento de alterações inflamatórias mediadas por eosinófilos e linfócitos Th2 em órgãos como o pulmão (COTTIN *et al.*, 2004).

Nesse contexto, nossos resultados mostraram alteração inflamatória de diferentes intensidades e de caráter difuso em camundongos irradiados a 5 Gy, podendo ser uma manifestação crônica da radiação gama. Apesar do processo inflamatório pulmonar ser evidente nos animais após 30 dias de experimento, nas análises histológicas dos animais irradiados a 7 Gy não foi observada essas alterações, uma vez que os animais morreram entre os dias nove e onze, podendo ser uma manifestação dependente de tempo. Em relação ao processo de

deposição de colágeno nos animais, observadas através da coloração de Picrosirius Red, notou-se uma maior deposição de colágeno nos alvéolos pulmonares no grupo 5Gy em relação ao grupo controle. A coloração em H&E evidenciou um espessamento do septo quando o processo inflamatório estava presente.

As alterações gastrointestinais devido à IR podem afetar boca, estômago e todos os segmentos do intestino, resultando em alterações inflamatórias e mucosites orais e intestinais, que podem posteriormente levar a úlceras (CAGIN *et al.*, 2016; GOANS; WALD, 2005). Além disso, a presença de estenose luminal no cólon, tal como a maior deposição de fibras colágenas (fibrilopose), foram descritas na literatura. Contudo, em nosso experimento não foram observadas alterações significativas no cólon. Esse resultado pode ter se dado devido à regeneração das vilosidades intestinais ou também devido ao tempo de duração do experimento (CAGIN *et al.*, 2016; DEITEL; VASIC, 1979).

CONCLUSÃO

Os achados clínicos e histopatológicos indicam que a irradiação em dose subletal neste modelo mimetiza as alterações do organismo exposto a uma grande quantidade de radiação sem levar ao óbito dos animais permitindo avaliar alterações orgânicas a longo prazo.

REFERÊNCIA

Adams MJ, Hardenbergh PH, Constine LS, Lipshultz SE. Radiation-associated cardiovascular disease. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2003 Jan;45(1):55-75. doi: 10.1016/s1040-8428(01)00227-x. PMID: 12482572.

Aebersold P. FDA Experience with Medical Countermeasures under the Animal Rule. *Adv Prev Med*. 2012;2012:507571. doi: 10.1155/2012/507571. Epub 2011 Sep 20. PMID: 21991452; PMCID: PMC3177089.

Ahmad, I.M.; Abdalla, M.Y.; Moore, T.A.; Bartenhagen, L.; Case, A.J.; Zimmerman, M.C. Healthcare Workers Occupationally Exposed to Ionizing Radiation Exhibit Altered Levels of Inflammatory Cytokines and Redox Parameters. *Antioxidants* 2019, 8, 12. <https://doi.org/10.3390/antiox8010012>

Ahmad Ameri, Pooya Ameri, Nazanin Rahnama, Majid Mokhtari, Meghdad Sedaghat, Fahimeh Hadavand, Rama Bozorgmehr, Mehrdad Haghighi, Farzad Taghizadeh-Hesary, Low-Dose Whole-Lung Irradiation for COVID-19 Pneumonia: Final Results of a Pilot Study, *International Journal of Radiation Oncology*Biophysics*Physics*, Volume 109, Issue 4, 2021, Pages 859-866, ISSN 0360-3016, <https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2020.11.065>

Augustine, Alison Deckhut, Timothy Gondré-Lewis, William McBride, Lara Miller, Terry C. Pellmar, and Sara Rockwell. “Animal Models for Radiation Injury, Protection and Therapy.” *Radiation Research* 164, no. 1 (2005): 100–109. <http://www.jstor.org/stable/3581517>.

Belpomme D, Hardell L, Belyaev I, Burgio E, Carpenter DO. Thermal and non-thermal health effects of low intensity non-ionizing radiation: An international perspective. *Environ Pollut*. 2018 Nov;242(Pt A):643-658. doi: 10.1016/j.envpol.2018.07.019. Epub 2018 Jul 6. PMID: 30025338.

Bray FN, Simmons BJ, Wolfson AH, Nouri K. Acute and Chronic Cutaneous Reactions to Ionizing Radiation Therapy. *Dermatol Ther (Heidelb)*. 2016 Jun;6(2):185-206. doi: 10.1007/s13555-016-0120-y. Epub 2016 Jun 1. PMID: 27250839; PMCID: PMC4906114.

Cottin V, Frogner R, Monnot H, Levy A, DeVuyst P, Cordier JF; Groupe d'Etudes et de Recherche sur les Maladies "Orphelines" Pulmonaires. Chronic eosinophilic pneumonia after radiation therapy for breast cancer. *Eur Respir J*. 2004 Jan;23(1):9-13. doi: 10.1183/09031936.03.00071303. PMID: 14738224.

Dainiak N. Hematologic consequences of exposure to ionizing radiation. *Exp Hematol*. 2002 Jun;30(6):513-28. doi: 10.1016/s0301-472x(02)00802-0. PMID: 12063018.

Datta K, Suman S, Kallakury BV, Fornace AJ Jr. Exposure to heavy ion radiation induces persistent oxidative stress in mouse intestine. *PLoS One*. 2012;7(8):e42224. doi: 10.1371/journal.pone.0042224. Epub 2012 Aug 24. PMID: 22936983; PMCID: PMC3427298.

Dayan D, Hiss Y, Hirshberg A, Bubis JJ, Wolman M. Are the polarization colors of picrosirius red-stained collagen determined only by the diameter of the fibers? *Histochemistry*. 1989;93(1):27-9. doi: 10.1007/BF00266843. PMID: 2482274.

Deitel M, To TB. Major Intestinal Complications of Radiotherapy: Management and Nutrition. *Arch Surg*. 1987;122(12):1421–1424. doi:10.1001/archsurg.1987.01400240069012

Diaz, M.F., Horton, P.D., Dumbali, S.P. et al. Bone marrow stromal cell therapy improves survival after radiation injury but does not restore endogenous hematopoiesis. *Sci Rep* 10, 22211 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41598-020-79278-y>

Donnelly EH, Nemhauser JB, Smith JM, Kazzi ZN, Farfán EB, Chang AS, Naeem SF. Acute radiation syndrome: assessment and management. *South Med J*. 2010 Jun;103(6):541-6. doi: 10.1097/SMJ.0b013e3181ddd571. PMID: 20710137.

Followill DS, Kester D, Travis EL. Histological changes in mouse colon after single- and split-dose irradiation. *Radiat Res*. 1993 Nov;136(2):280-8. PMID: 8248486.

Goans, R E; Wald, N. Radiation accidents with multi-organ failure in the United States. *The British Journal of Radiology*, v. Supplement, n. 1, p. 41–46, 2005. Doi:<https://doi.org/10.1259/bjr/27824773>

Gupta S, Sharma RS, Singh R. Non-ionizing radiation as possible carcinogen. *Int J Environ Health Res.* 2022 Apr;32(4):916-940. doi: 10.1080/09603123.2020.1806212. Epub 2020 Sep 4. PMID: 32885667.

Hempelmann LH, LISCO H, HOFFMAN JG. The acute radiation syndrome: a study of nine cases and a review of the problem. *Ann Intern Med.* 1952 Feb;36(2:1):279-510. doi: 10.7326/0003-4819-36-2-279. PMID: 14895043.

Hendry JH, Simon SL, Wojcik A, Sohrabi M, Burkart W, Cardis E, Laurier D, Tirmarche M, Hayata I. Human exposure to high natural background radiation: what can it teach us about radiation risks? *J Radiol Prot.* 2009 Jun;29(2A):A29-42. doi: 10.1088/0952-4746/29/2A/S03. Epub 2009 May 19. PMID: 19454802; PMCID: PMC4030667.

Hill A, Kiss N, Hodgson B, Crowe TC, Walsh AD. Associations between nutritional status, weight loss, radiotherapy treatment toxicity and treatment outcomes in gastrointestinal cancer patients. *Clin Nutr.* 2011 Feb;30(1):92-8. doi: 10.1016/j.clnu.2010.07.015. Epub 2010 Aug 17. PMID: 20719409.

Hirama T, Tanosaki S, Kandatsu S, Kuroiwa N, Kamada T, Tsuji H, Yamada S, Katoh H, Yamamoto N, Tsujii H, Suzuki G, Akashi M. Initial medical management of patients severely irradiated in the Tokai-mura criticality accident. *Br J Radiol.* 2003 Apr;76(904):246-53. doi: 10.1259/bjr/82373369. PMID: 12711644.

Horowitz MC, Berry R, Holtrup B, Sebo Z, Nelson T, Fretz JA, Lindskog D, Kaplan JL, Ables G, Rodeheffer MS, Rosen CJ. Bone marrow adipocytes. *Adipocyte.* 2017 Jul 3;6(3):193-204. doi: 10.1080/21623945.2017.1367881. Epub 2017 Aug 24. PMID: 28872979; PMCID: PMC5638373.

Hymes SR, Strom EA, Fife C. Radiation dermatitis: clinical presentation, pathophysiology, and treatment 2006. *J Am Acad Dermatol.* 2006 Jan;54(1):28-46. doi: 10.1016/j.jaad.2005.08.054. PMID: 16384753.

Inomata K, Aoto T, Binh NT, Okamoto N, Tanimura S, Wakayama T, Iseki S, Hara E, Masunaga T, Shimizu H, Nishimura EK. Genotoxic stress abrogates renewal of melanocyte

stem cells by triggering their differentiation. *Cell*. 2009 Jun 12;137(6):1088-99. doi: 10.1016/j.cell.2009.03.037. PMID: 19524511.

International Commission on Non-Ionizing Radiation Protection (ICNIRP). Principles for Non-Ionizing Radiation Protection. *Health Phys*. 2020 May;118(5):477-482. doi: 10.1097/HP.0000000000001252. PMID: 32251080.

Kerekes J, Novák J, Köteles GJ. Micronucleus frequency in peripheral lymphocytes for the differential diagnosis of radiation injuries combined with thermal burns. *J Burn Care Rehabil*. 1988 May-Jun;9(3):275-8. doi: 10.1097/00004630-198805000-00008. PMID: 3417721.

Koch A, Gulani J, King G, Hieber K, Chappell M, Ossetrova N (2016) Establishment of Early Endpoints in Mouse Total-Body Irradiation Model. *PLoS ONE* 11(8): e0161079. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0161079>

Krigsfeld GS, Savage AR, Billings PC, Lin L, Kennedy AR. Evidence for radiation-induced disseminated intravascular coagulation as a major cause of radiation-induced death in ferrets. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2014 Mar 15;88(4):940-6. doi: 10.1016/j.ijrobp.2013.12.001. Epub 2014 Feb 1. PMID: 24495588; PMCID: PMC4039181.

Krishnan J, Rao S, Hegde S, Shetty J. Evaluation of Healthy Tissue Dose at Different Regions between Volumetric-Modulated Arc Therapy and Intensity-Modulated Radiation Therapy Plans in the Treatment of Various Cancers. *J Med Phys*. 2019 Jul-Sep;44(3):213-221. doi: 10.4103/jmp.JMP_122_18. PMID: 31576070; PMCID: PMC6764173.

Stefan L.S. Kwa, Joos V. Lebesque, Jacqueline C.M. Theuws, Lawrence B. Marks, Mike T. Munley, Gunilla Bentel, Dieter Oetzel, Uwe Spahn, Mary V. Graham, Robert E. Drzymala, James A. Purdy, Allen S. Lichter, Mary K. Martel, Randall K. Ten Haken, Radiation pneumonitis as a function of mean lung dose: an analysis of pooled data of 540 patients, *International Journal of Radiation Oncology*Biology*Physics*, Volume 42, Issue 1, 1998, Pages 1-9, ISSN 0360-3016, [https://doi.org/10.1016/S0360-3016\(98\)00196-5](https://doi.org/10.1016/S0360-3016(98)00196-5).

Levin, W., Kooy, H., Loeffler, J. et al. Proton beam therapy. *Br J Cancer* 93, 849–854 (2005). <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6602754>

Li X, Cui W, Hull L, Smith JT, Kiang JG, Xiao M. Effects of Low-to-Moderate Doses of Gamma Radiation on Mouse Hematopoietic System. *Radiat Res.* 2018 Dec;190(6):612-622. doi: 10.1667/RR15087.1. Epub 2018 Oct 12. PMID: 30311842.

Lievens, Y., Borrás, J.M. and Grau, C. (2020), Provision and use of radiotherapy in Europe. *Mol Oncol*, 14: 1461-1469. <https://doi.org/10.1002/1878-0261.12690>

Liu LF, Shen WJ, Ueno M, Patel S, Kraemer FB. Characterization of age-related gene expression profiling in bone marrow and epididymal adipocytes. *BMC Genomics.* 2011 May 5;12:212. doi: 10.1186/1471-2164-12-212. PMID: 21545734; PMCID: PMC3113784.

López M, Martín M. Medical management of the acute radiation syndrome. *Rep Pract Oncol Radiother.* 2011 Jul 13;16(4):138-46. doi: 10.1016/j.rpor.2011.05.001. PMID: 24376971; PMCID: PMC3863169.

Marshman E, Ottewell PD, Potten CS, Watson AJ. Caspase activation during spontaneous and radiation-induced apoptosis in the murine intestine. *J Pathol.* 2001 Oct;195(3):285-92. doi: 10.1002/path.967. PMID: 11673824.

McDonnell BM, Buchanan PJ, Prise KM, McCloskey KD. Acute radiation impacts contractility of guinea-pig bladder strips affecting mucosal-detrusor interactions. *PLoS One.* 2018 Mar 7;13(3):e0193923. doi: 10.1371/journal.pone.0193923. PMID: 29513744; PMCID: PMC5841802.

Moccia KD, Olsen CH, Mitchell JM, Landauer MR. Evaluation of hydration and nutritional gels as supportive care after total-body irradiation in mice (*Mus musculus*). *J Am Assoc Lab Anim Sci.* 2010 May;49(3):323-8. PMID: 20587164; PMCID: PMC2877305.

Nagayama, H., Misawa, K., Tanaka, H. *et al.* Transient hematopoietic stem cell rescue using umbilical cord blood for a lethally irradiated nuclear accident victim. *Bone Marrow Transplant* 29, 197–204 (2002). <https://doi.org/10.1038/sj.bmt.1703356>

Naveiras, O., Nardi, V., Wenzel, P. et al. Bone-marrow adipocytes as negative regulators of the haematopoietic microenvironment. *Nature* 460, 259–263 (2009).
<https://doi.org/10.1038/nature08099>

Robert Percuoco, Chapter 1 - Plain Radiographic Imaging, Editor(s): Dennis M. Marchiori, *Clinical Imaging (Third Edition)*, Mosby, 2014, Pages 1-43, ISBN 9780323084956,
<https://doi.org/10.1016/B978-0-323-08495-6.00001-4>.

Plett PA, Sampson CH, Chua HL, Joshi M, Booth C, Gough A, Johnson CS, Katz BP, Farese AM, Parker J, MacVittie TJ, Orschell CM. Establishing a murine model of the hematopoietic syndrome of the acute radiation syndrome. *Health Phys.* 2012 Oct;103(4):343-55. doi: 10.1097/HP.0b013e3182667309. PMID: 22929467; PMCID: PMC3743168.

Rithidech KN, Reungpatthanaphong P, Honikel L, Rusek A, Simon SR. Dose-rate effects of protons on in vivo activation of nuclear factor-kappa B and cytokines in mouse bone marrow cells. *Radiat Environ Biophys.* 2010 Aug;49(3):405-19. doi: 10.1007/s00411-010-0295-z. Epub 2010 May 28. PMID: 20508943.

Rithidech KN, Honikel LM, Reungpatthanaphong P, Tungjai M, Golightly M, Whorton EB. Effects of 100MeV protons delivered at 0.5 or 1cGy/min on the in vivo induction of early and delayed chromosomal damage. *Mutat Res.* 2013 Aug 30;756(1-2):127-40. doi: 10.1016/j.mrgentox.2013.06.001. Epub 2013 Jun 13. PMID: 23770023.

Rübe CE, Uthe D, Wilfert F, Ludwig D, Yang K, König J, Palm J, Schuck A, Willich N, Remberger K, Rübe C. The bronchiolar epithelium as a prominent source of pro-inflammatory cytokines after lung irradiation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2005 Apr 1;61(5):1482-92. doi: 10.1016/j.ijrobp.2004.12.072. PMID: 15817354.

Sanzari JK, Wan XS, Krigsfeld GS, Wroe AJ, Gridley DS, Kennedy AR. The Effects of Gamma and Proton Radiation Exposure on Hematopoietic Cell Counts in the Ferret Model. *Gravit Space Res.* 2013 Oct;1(1):79-94. PMID: 25356435; PMCID: PMC4209750.

Schaue D. A Century of Radiation Therapy and Adaptive Immunity. *Front Immunol.* 2017 Apr 11;8:431. doi: 10.3389/fimmu.2017.00431. PMID: 28443099; PMCID: PMC5387081.

Shahbazi-Gahrouei D, Gholami M, Setayandeh S. A review on natural background radiation. *Adv Biomed Res.* 2013 Jul 30;2:65. doi: 10.4103/2277-9175.115821. PMID: 24223380; PMCID: PMC3814895.

Shao L, Luo Y, Zhou D. Hematopoietic stem cell injury induced by ionizing radiation. *Antioxid Redox Signal.* 2014 Mar 20;20(9):1447-62. doi: 10.1089/ars.2013.5635. Epub 2014 Feb 10. PMID: 24124731; PMCID: PMC3936513.

Singh VK, Newman VL, Berg AN, MacVittie TJ. Animal models for acute radiation syndrome drug discovery. *Expert Opin Drug Discov.* 2015 May;10(5):497-517. doi: 10.1517/17460441.2015.1023290. Epub 2015 Mar 27. Erratum in: *Expert Opin Drug Discov.* 2017 Aug;12 (8):877. PMID: 25819367.

Singh VK, Romaine PL, Newman VL, Seed TM. Tocols induce G-CSF and mobilise progenitors that mitigate radiation injury. *Radiat Prot Dosimetry.* 2014 Nov;162(1-2):83-7. doi: 10.1093/rpd/ncu223. Epub 2014 Jul 3. PMID: 24993008; PMCID: PMC4434803.

Stone HB, Moulder JE, Coleman CN, Ang KK, Anscher MS, Barcellos-Hoff MH, Dynan WS, Fike JR, Grdina DJ, Greenberger JS, Hauer-Jensen M, Hill RP, Kolesnick RN, Macvittie TJ, Marks C, McBride WH, Metting N, Pellmar T, Purucker M, Robbins ME, Schiestl RH, Seed TM, Tomaszewski JE, Travis EL, Wallner PE, Wolpert M, Zaharevitz D. Models for evaluating agents intended for the prophylaxis, mitigation and treatment of radiation injuries. Report of an NCI Workshop, December 3-4, 2003. *Radiat Res.* 2004 Dec;162(6):711-28. doi: 10.1667/rr3276. PMID: 15548121.

Janusz Surzykiewicz, Sebastian Binyamin Skalski, Małgorzata Niesiołbódzka, Olga Gładysz, Karol Konaszewski, Brief screening measures of mental health for war-related dysfunctional

anxiety and negative persistent thinking, *Personality and Individual Differences*, Volume 195, 2022, 111697, ISSN 0191- doi.org/10.1016/j.paid.2022.111697.

Christopher J. Talbot, Marlon R. Veldwijk, David Azria, Chiara Batini, Miriam Bierbaum, Muriel Brengues, Jenny Chang-Claude, Kerstie Johnson, Anke Keller, Sheila Smith, Elena Sperk, R. Paul Symonds, Frederik Wenz, Catharine M.L. West, Carsten Herskind, Celine Bourgier, Multi-centre technical evaluation of the radiation-induced lymphocyte apoptosis assay as a predictive test for radiotherapy toxicity, *Clinical and Translational Radiation Oncology*, Volume 18, 2019, Pages 1-8, ISSN 2405-6308, <https://doi.org/10.1016/j.ctro.2019.06.001>.

Tomonaga, Masao. The Atomic Bombings of Hiroshima and Nagasaki: A Summary of the Human Consequences, 1945-2018, and Lessons for Homo sapiens to End the Nuclear Weapon Age. *Journal for Peace and Nuclear Disarmament*, v. 2, n. 2, p. 491–517, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/25751654.2019.1681226>>.

Tratwal J, Bekri D, Boussema C, Sarkis R, Kunz N, Koliqi T, Rojas-Sutterlin S, Schyrr F, Tavakol DN, Campos V, Scheller EL, Sarro R, Bárcena C, Bisig B, Nardi V, de Leval L, Burri O, Naveiras O. MarrowQuant Across Aging and Aplasia: A Digital Pathology Workflow for Quantification of Bone Marrow Compartments in Histological Sections. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2020 Sep 24;11:480. doi: 10.3389/fendo.2020.00480. PMID: 33071956; PMCID: PMC7542184.

Valdiglesias V, Giunta S, Fenech M, Neri M, Bonassi S. γ H2AX as a marker of DNA double strand breaks and genomic instability in human population studies. *Mutat Res*. 2013 Jul-Sep;753(1):24-40. doi: 10.1016/j.mrrev.2013.02.001. Epub 2013 Feb 13. PMID: 23416207.

Vañó, E et al. ICRP135 *Annals of the ICRP*. [S.l.: s.n.], 2017. v. 44. Disponível em: <www.icrp.org>.

Waselenko JK, MacVittie TJ, Blakely WF, Pesik N, Wiley AL, Dickerson WE, Tsu H, Confer DL, Coleman CN, Seed T, Lowry P, Armitage JO, Dainiak N; Strategic National Stockpile Radiation Working Group. Medical management of the acute radiation syndrome:

recommendations of the Strategic National Stockpile Radiation Working Group. *Ann Intern Med.* 2004 Jun 15;140(12):1037-51. doi: 10.7326/0003-4819-140-12-200406150-00015. PMID: 15197022.

Williams JP, Brown SL, Georges GE, Hauer-Jensen M, Hill RP, Huser AK, Kirsch DG, Macvittie TJ, Mason KA, Medhora MM, Moulder JE, Okunieff P, Otterson MF, Robbins ME, Smathers JB, McBride WH. Animal models for medical countermeasures to radiation exposure. *Radiat Res.* 2010 Apr;173(4):557-78. doi: 10.1667/RR1880.1. PMID: 20334528; PMCID: PMC3021126.

Wu WS, Heinrichs S, Xu D, Garrison SP, Zambetti GP, Adams JM, Look AT. Slug antagonizes p53-mediated apoptosis of hematopoietic progenitors by repressing puma. *Cell.* 2005 Nov 18;123(4):641-53. doi: 10.1016/j.cell.2005.09.029. PMID: 16286009.

Yamanouchi K, Tsujiguchi T, Sakamoto Y, Ito K. Short-term follow-up of intestinal flora in radiation-exposed mice. *J Radiat Res.* 2019 May 1;60(3):328-332. doi: 10.1093/jrr/rrz002. PMID: 31116852; PMCID: PMC6530617.

ANEXO 1: PETÉQUIAS NA MUCOSA DO COLÓN DOS ANIMAIS 5 GY E 7 GY**ANEXO2: MUDANÇA DE PELO AOS 60 DIAS**

ANEXO 3: CERTIFICADO CEUA 132/2021

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Prezado(a):

Esta é uma mensagem automática do sistema Solicite CEUA que indica mudança na situação de uma solicitação.

Protocolo CEUA: 132/2021

Título do projeto: Avaliação do papel dos macrófagos em diferentes estados de ativação, em um modelo experimental da Síndrome Aguda da Radiação

Finalidade: Pesquisa

Pesquisador responsável: Ricardo Goncalves

Unidade: Instituto de Ciências Biológicas

Departamento: Departamento de Patologia

Situação atual: **Decisão Final - Aprovado**

Aprovado na reunião ordinária on-line do dia 28/06/2021. Validade: 28/06/2021 à 27/06/2026

Belo Horizonte, 28/06/2021.

Atenciosamente,

Sistema Solicite CEUA UFMG

https://aplicativos.ufmg.br/solicite_ceua/Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil
Telefone: (31) 3409-4516
www.ufmg.br/bioetica/ceua - ceua@proq.ufmg.br

Revista para submissão: RADIATION RESEARCH

Analysis of an Experimental Model of sublethal dose of ionizing radiation **Igor de Campos Fontes¹; Paula Campos Peixoto²; Ricardo Gonçalves¹**

1 – Laboratory of Macrophage Immunology (LABIM), Institute of Biological Sciences, Federal University of Minas Gerais, Brazil. 2 – Laboratory of Apoptosis and Angiogenesis (LAA) Institute of Biological Sciences, Federal University of Minas Gerais, Brazil.

Abstract

Ionizing radiation injuries to the human body, either by therapy or by accidental exposure, became of interest nearly a century ago after the discovery of X-ray. Exposure to ionizing radiation produces a dose - dependent sequella of signs and symptoms that progresses over time. Experimental models that mimetizes a human body exposure situation to radiation, and describe the lesions in acute radiation syndrome (ARS) are a current need in this research field. The animal model of radiation used in this study evaluated the effects of radiation exposure on the whole body of C57BL/6 mice over a period of up to 30 days at lethal (7 Gray) group 7 Gy or sublethal (5 Gray) group 5 doses. Gy for a dose rate of 0.75 min⁻¹ of Gamma rays. Clinical data such as body temperature, mucosal alterations, food and water intake, as well as the weight of the animals were analyzed. Anatomopathological analyzes were performed on organs commonly affected in ARS such as intestine, lung and bone marrow, in the survivor group 5 Gy and the control group without radiation after 30 days. Clinically, it was observed that the survival of the 7 Gy group was reduced up to 11 days post-radiation and the animals of the 5Gy group survived at least 30 days after irradiation. Mucosal alterations and extremities (paws and snout) were more frequent in the 7 Gy group than in the 5 Gy group. Bone marrow analysis demonstrated hypoplasia of hematopoietic progenitors cells and an increase in the number of adipocytes in the 5 Gy group. In the lung, an intense inflammatory process was observed with alveolar septum thickening after 30 days of irradiation. In the intestine, the goblet cells, as well as the architecture of the colon, were preserved and without alterations in the crypts or in the mucosa at the end of the experiment.

INTRODUCTION

Beneficial and detrimental effects of ionizing radiation have received much attention since X-ray discovery, and recent conflicts have generated fear due to the possibility of using nuclear weapons (LEVIN *et al.*, 2005; SURZYKIEWICZ *et al.*, 2022). Ionizing radiation production of reactive oxygen species (ROS) causes tissue and cell damage. Changes in DNA and RNA can occur and generate mutations. In humans, early effects of relatively low doses of radiation may include weakness, fatigue, nausea, vomiting, anorexia, and headache (LEVIN *et al.*, 2005). These effects have a latency to onset of several hours and may last for hours, days or weeks. As the dose of radiation is increased up to the 30 day LD₅₀, hemopoietic damage (loss of functional blood cells) occurs in most mammals and increases in severity for up to 4-6 weeks after exposure. Further increases in dose produce lethal gastrointestinal damage within 1-2 weeks of exposure, while yet higher, supralethal doses produce cardiovascular shock, neuronal damage and death within hours or days (DONNELLY *et al.*, 2010; NAVEIRAS *et al.*, 2009).

Effects of Sublethal Doses of Ionizing Radiation on Schedule-Controlled Performance in Rats

Acute Radiation Syndrome (ARS) occurs in cases of extensive exposure to ionizing radiation, which may manifest locally or in systemically in the body. Due to an interval of hours or even days for the onset of symptoms, early diagnosis of the syndrome in people who have suffered a radioactive accident becomes difficult, which also delays the onset of countermeasures for their treatment (DATTA *et al.*, 2012; PERCUOCO, 2013; VAÑÓ *et al.*, 2017). In general, Acute Radiation Syndrome can be divided into subsyndromes, which can manifest together leading to a multiple organ dysfunction. Among the most studied subsyndromes are the hematocytopenic, gastrointestinal, cerebrovascular and cutaneous syndromes. (LÓPEZ; MARTÍN, 2011; WASELENKO *et al.*, 2004). Experimental models of irradiation are used for a better understanding of ionizing radiation injuries in human body in therapy or accidental situations, however, current models have limitations as the disease presentation that may vary depending on the affected anatomical site, the sex of the affected individuals, among others factors that can be involved. In this way, government control agents such as the Food and Drugs Administration (FDA) request that, in order to authorize a new drug or treatment in human beings, experiments in 2 models of different species has to be evaluated, or that well-characterized models that simulate responses are used of ARS in humans (SINGH *et al.*, 2015; WILLIAMS *et al.*, 2010). We present here an experimental model for studies of chronic changes in ARS when the exposure occurs in a sublethal dose.

Materials and methods

Animals

Male C57BL/6 wild mice of approximately 6-8 weeks of age (n = 10 per group) were obtained from the Central Animal House at UFMG. The animals were kept in the vivarium of the Department of General Pathology under controlled conditions of temperature (24°C) and luminosity (light/dark cycle of 12h) with free access to food and water throughout the experiment. animals were irradiated with a total-body single dose of 5Gy and 7Gy in the Gamma Irradiation Laboratory (CDTN) - in a Category II Multipurpose Panoramic Irradiator, manufactured by MDS Nordion in Canada, Model/Serial Number IR-214 and monitored for 30 days.

Clinical analysis

The parameters used to monitor physical changes were weight, body temperature, intake of acute and food.

Histopathology

The collected samples (bone marrow and lung) were stained using H&E staining technique and tissue alterations were quantified using the Qupath pixel classifier on 10 randomly photographed images of the respective organs.

Statistical Analyses

For the clinical evaluations, KRUSKAL-WALLISS were used followed by DUNNS post-test. The methods used for histological quantification were the MANN-WHITNEY test and the values were considered significant when $P < 0.05$. The analyzes took place in the GraphPad Prism V8.0 software.

RESULTS Total-body irradiation can clinical and behavioral alterations in mice (KOCH et al., 2016). We evaluated the survival of animals in two dose ranges, 7 Gy and 5Gy. Mice irradiated with a dose of 5 Gy presented a survival rate of 100% in 30 days, while mice irradiated with a dose greater than 7 Gy had a lethality of 100%, (LD 100\30) at the end of the experiment (Figure 1)

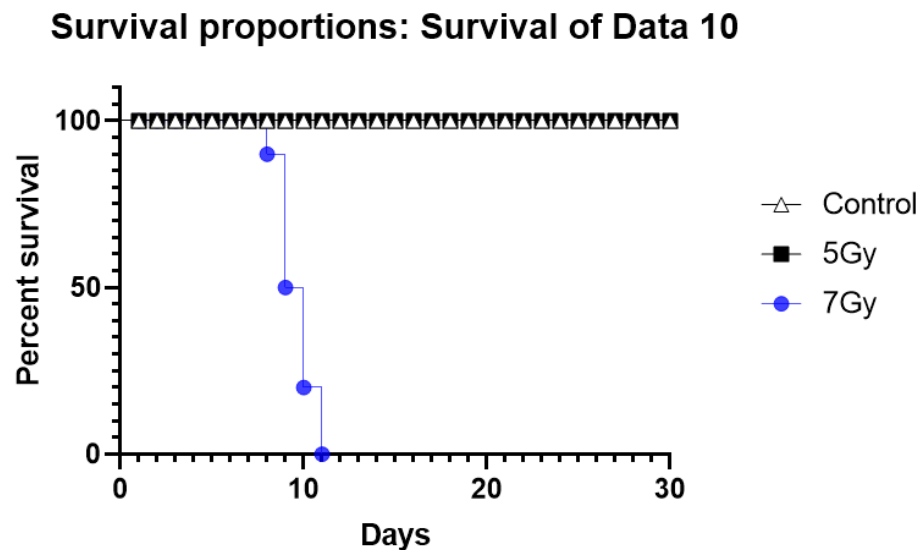


Figure 1: Survival curve of C57BL/6 mice after whole body irradiation (TBI) $P < 0.0001$: The 5 Gy mice (N=10) (black square) and the Control group (N=10) (White Triangle) had a 100% survival rate at 30 days. Mice irradiated with a dose of 7 Gy (blue dot), had a lethality of 100% in 11 days.

Both irradiation groups, 7Gy and 5Gy, showed reduced water consumption during the first week after the radiation event compared to the control group. However, 5 Gy groups recovered water consumption in the last week, returning to the initial levels of intake, equaling the control group (Figure 2 - A). In The group irradiated with 7 Gy dry matter intake were reduced in the first days after irradiation, with recovery and a peak of consumption close to the seventh day. A tendency of stability was evaluated in the mice receiving 5 Gy dose during the second week. In contrast, mice irradiated with 7Gy presented another period of reduction of the ingestion, which lasted until the day of the death of these animals. at the end of the fourth week levels of food consumption between the control group and the groups irradiated with 5Gy were equivalent (Figure 2 - B). The group irradiated with 7 Gy showed a progressive body mass loss without recovery after 10 days, whereas the sublethal dose group had the greatest difference at 3 weeks after total-body irradiation (Figure 2-C). Body temperature was measured daily using an infrared thermometer, corresponding to 300 measurements for the control group and 300 measurements for the 5 Gy. group Due the huge lethality in the 7 Gy group, only 104 measurements were acquired. The 5 Gy group presented statistic

differences The 7 Gy group did not present statistical differences when compared to the control group (Figure 2 - D)

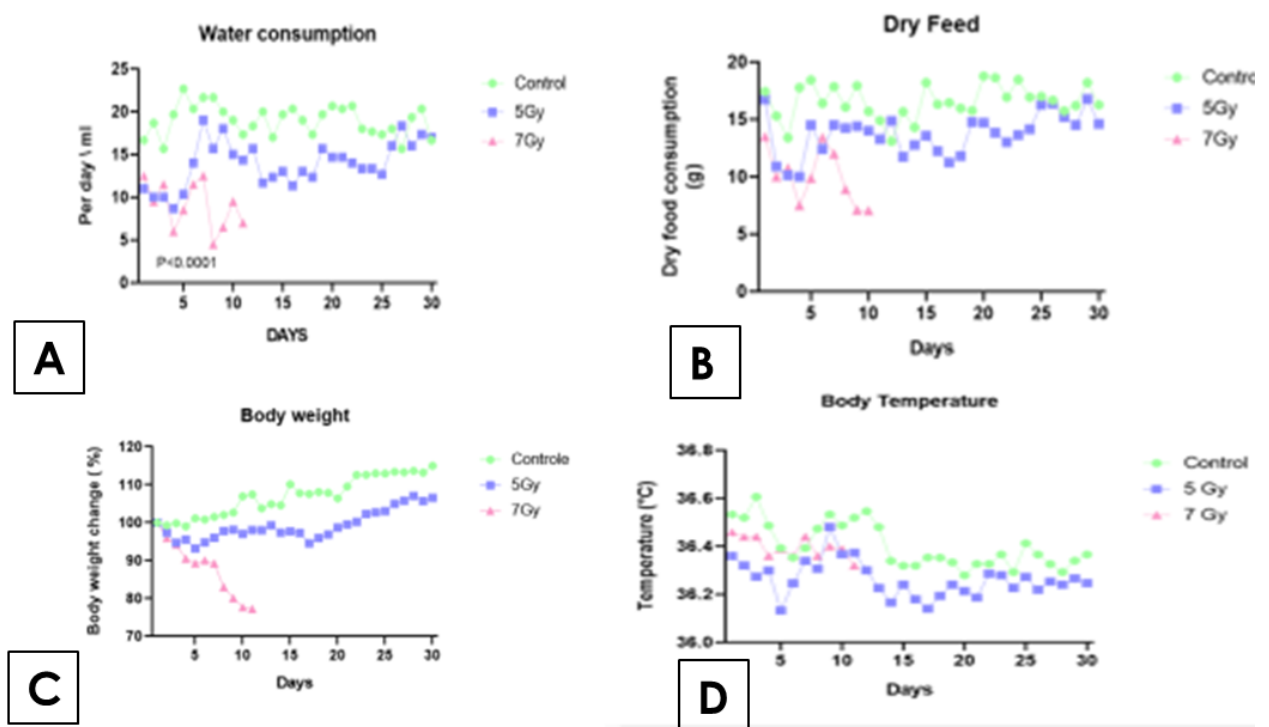


Figure 2: A) Water consumption of the irradiated groups compared to the control group. B) Breed consumption. C) Body weight D) Body temperature . Values are means \pm SEM of 10 animals in each group. * Significant difference between CT and 5Gy; $p < 0.05$; Kruskal Wallis. CT, control mice; 5Gy, irradiated mice.

Histopathological analysis

Bone marrow

Exposure to ionizing radiation leads to the death of bone marrow progenitor cells and replacement by fat cells (Figure 3), which are resistant to radiation. Then, proliferation of fat cell M in the bone-marrow microenvironment is seen, which stimulate other cells

to proliferate (HOROWITZ et al., 2017). Recently, a negative effect of fat cells on medullary tissue was observed, as they cause a suppressive regulation in the hematopoiesis of irradiated animals (NAVEIRAS et al., 2009).

Bone marrow tissue evaluation showed reduction of progenitor cells in the irradiated animals. The presence of negative rounded spots on histology image suggests the exchange of bone marrow tissue and stem cells for fat cells. Results were significantly relevant with $P < 0.0159$ (Figure 3-E). These changes have already been demonstrated in a similar experiment with lethal doses of total-body irradiation. However, a healthy and usual tissue were still present in the bone marrow. The animals survival after a period longer than 30 days, indicate the bone marrow tissue resistance after a high-dose irradiation.

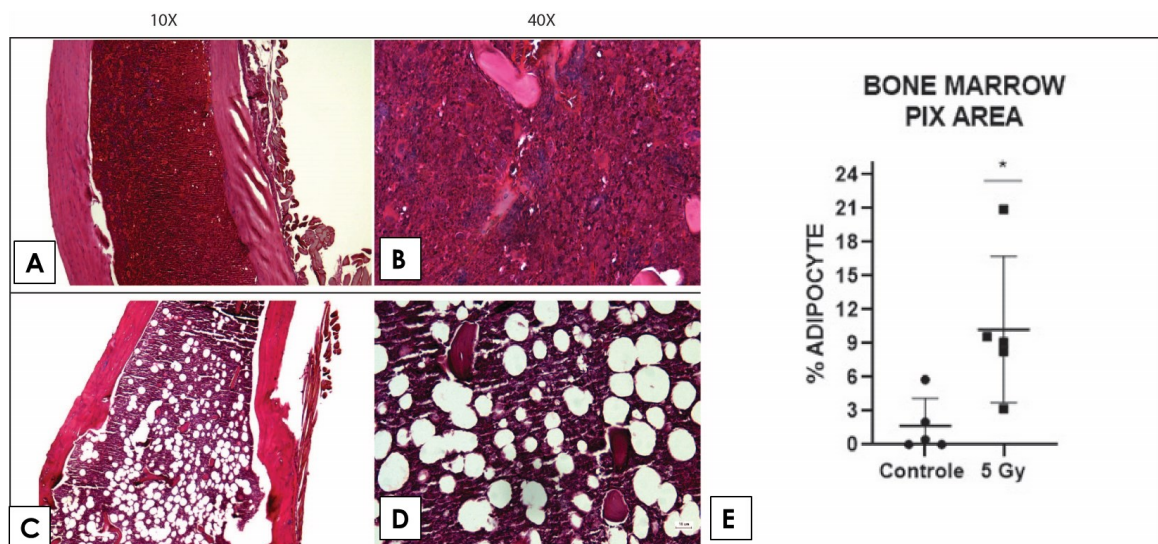


Figure -3 Bone marrow. Images A) and B) Shows the medullary space of control animals without formation of fat cells inside, with diversified stem cells with intact parenchyma. Note the presence of megakaryocytes at higher magnification B image (blue arrow) images at 4X and bar at 100 μ m and 40X and bar at 10 μ m respectively. C) and D) Bone marrow aplasia with fat cell formation in negative image in the bone marrow parenchyma (black star) images in 4X and bar in 100 μ m and 40X and bar in 10 μ m respectively. E) Quantification of adipocytes in H&E staining in bone marrow of 5-Gy-irradiated (N=5) and control (N=5) mice. Mice that were irradiated with 5Gy showed an increase in fat cells within the marrow with statistical difference $P < 0.0159$ in quantification. Values are means \pm Median of 5 animals in each group. * Significant difference between CT and 5Gy; $p < 0.05$; Mann-Whitney. CT, control mice; 5Gy, irradiated mice.

Lung

The animals irradiated with a 5 Gy dose has shown alveolar septal thickening, as well as inflammatory alterations consistent with a chronic interstitial pneumonitis. The alveolar space did not present infectious processes, being free of exudate or fluid extravasation, characteristic of edema. In contrast, an inflammatory component was observed exhibiting mononuclear cells, mostly composed of macrophages and lymphocytes. Control animals had focal alterations in 2 animals who presented mild

alveolar inflammation, representing 40% of each parameter evaluated (Table 1). The 5 Gy group presented an inflammatory infiltrate in 100% of its animals,, as they were classified as mild having about 40% infiltration and moderate between 40% and 20%.

Table 1. lung inflammation

<i>Control</i>				
<i>Blades</i>	Intensity	Intensity %	Distribution	Distribution %
<i>7 A</i>	low	40	Focal	40
<i>8 A</i>	0	60	0	60
<i>9 A</i>	0	60	0	60
<i>10 A</i>	low	40	Focal	40
<i>21 A</i>	0	60	0	60
<i>5 Gy</i>				
<i>Blades</i>	Intensity	Intensity %	Distribution	Distribution%
<i>57 B</i>	high	20	Multifocal	40
<i>58 B</i>	medium	40	Focal	60
<i>59 B</i>	low	40	Multifocal	60
<i>60 B</i>	low	40	Focal	40
<i>61 B</i>	medium	40	Multifocal	60

Table 1: Changes in inflammatory profiles in the lungs of irradiated mice (N=5) and control mice (N=5) after 30 days. Data shown in percentage of observed animals.

Analyses of collagen deposition in the lungs

Collagen deposition in the pulmonary alveoli of 5 Gy and control mice (Figure- 4) was histologically quantified. The collagen profile demonstrates a higher concentration of collagen deposition in the 5Gy group compared to the control group. In the comparison analysis between the types of collagen deposited, a greater presence of type III collagen was observed in the 5 Gy group ($P < 0.0359$). The combined deposition of collagen types I and III also showed an increase when compared to the control group (Figure - 5).

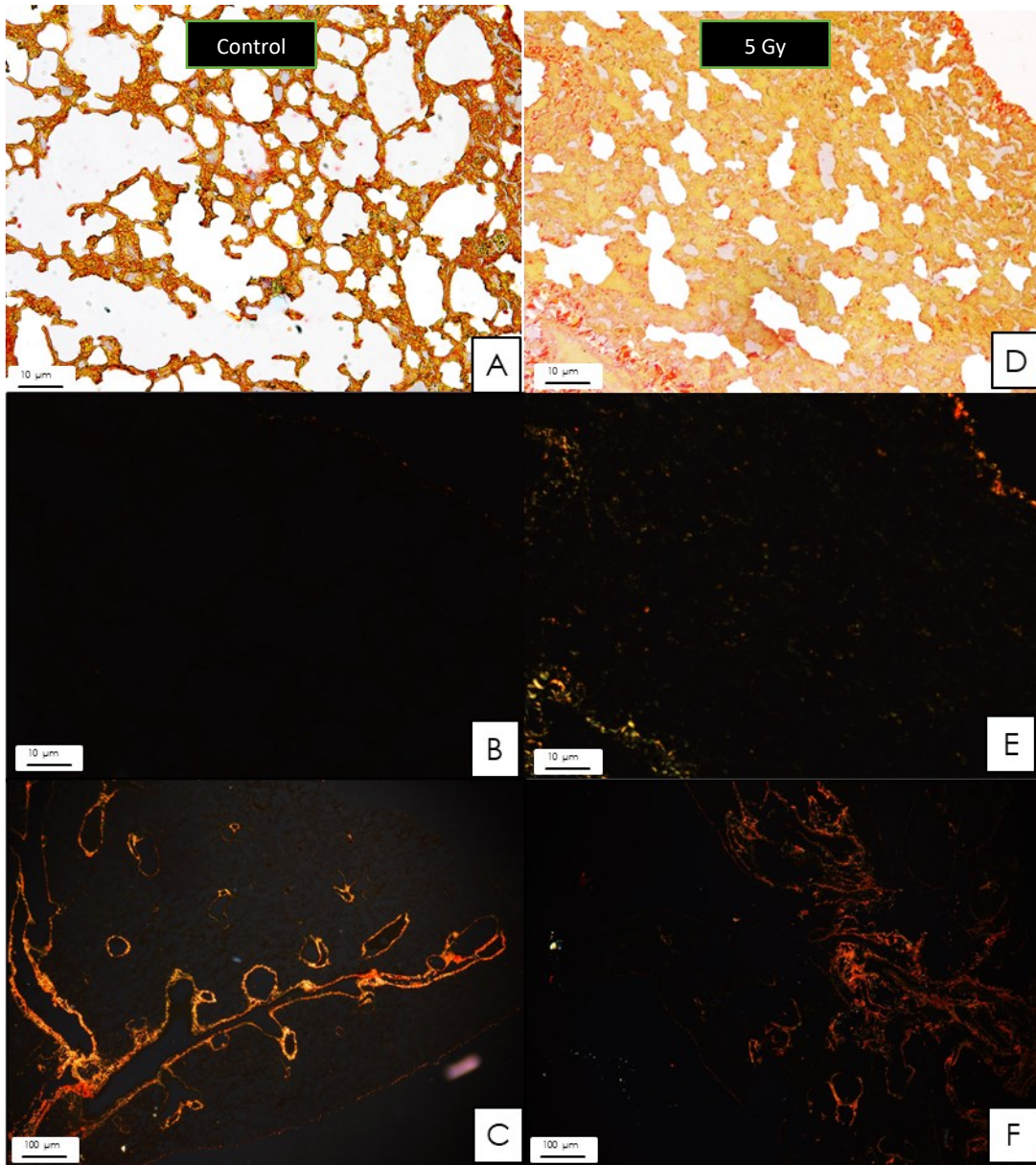


Figure- 4. Picrosirius- Red in lung of animals C57BL/6 - 5Gy of Gamma radiation

Images A) and C) showing at lower magnification (4x), the polarized light refraction of reticulin in the lung. Control animals and 5 Gy of radiation. Images B) and D) At 40X magnification, bar at 10 μm. Images D) showing a higher concentration of reticulin in the pulmonary alveoli of animals irradiated with 5Gy at the end of 30 days after exposure.

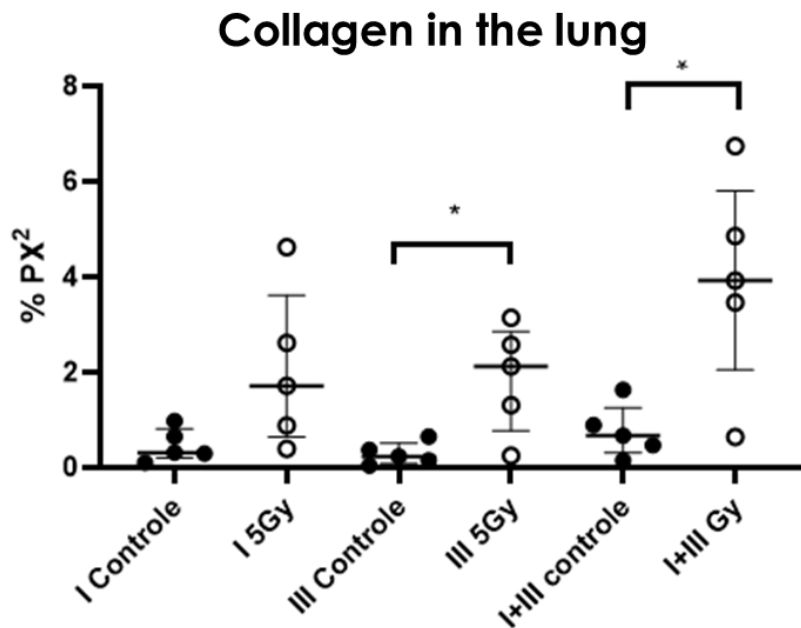


Figure 5: Quantification of collagen fibers in Picrosirius red staining in lung tissue of 5-Gy-irradiated (N=5) and control (N=5) mice. Statistical differences in the quantification of collagen 3 between the control group and those irradiated with 5Gy showed an increase in the deposition of collagen fibers in the lung at $P < 0.0359$. Values are means \pm Median of 5 animals in each group. * Significant difference between CT and 5Gy; $p < 0.05$; Mann-Whitney. CT, control mice; 5Gy, irradiated mice.

Discussion

The effects and consequences of human exposure to radiation are currently of major concern and clinical importance. Since the use of equipment and devices that emit ionizing radiation are increasing in health systems as in medical treatments and complementary diagnosis, more and more people and workers are exposed to different rates and doses of radiation. In addition, recent conflicts also bring apprehension and have been generating fear due to the possibility of using nuclear weapons among populations, capable of releasing large rates of IR and causing serious consequences (AHMAD *et al.*, 2019; LEVIN *et al.*, 2005; SURZYKIEWICZ *et al.*, 2022).

In order to mitigate the injuries caused by exposure to ionizing radiation, several research groups have sought experimental models that are capable of mimicking the organic lesions caused by radiation, as well as forms of treatment that correspond to the current needs of medicine (SINGH *et al.*, 2015). However, there is still a lack of experimental models that describe these organic lesions when sublethal doses of ionizing radiation are administered.

From what was evaluated, and the respective data collected, different doses, even if potentially close to radiation, can lead to serious effects and even a high level

of lethality. The increase in 5Gy up to 7Gy irradiation dose resulted in 100% mortality in animals irradiated at 7 Gy. Using similar doses, other research groups identified different survival rates in animals irradiated with a 7 Gy dose (DIAZ *et al.*, 2020; SUZUKI *et al.*, 2018). This difference may have occurred due to some dissimilarity in the experimental methods and materials of IR, such as the age of the animals or due to different strains of mice. (DIAZ *et al.*, 2020; PLETT *et al.*, 2011; WILLIAMS *et al.*, 2010). The consumption of food and water by irradiated animals decreased as the amount of radiation to which the animals were exposed increased. these results corroborate a data already presented in other lethal dose models(PLETT *et al.*, 2011).

At low doses, it has been seen that ionizing radiation has the potential to attenuate pneumonia caused by viral diseases such as COVID-19 in treated patients (AMERI *et al.*, 2020). In contrast, higher doses are able to cause changes on the major inflammatory cells type mediated by eosinophils and Th2 lymphocytes in organs such as the lung (COTTIN *et al.*, 2004).

In this context, our results showed inflammatory alterations of different intensities and of a diffuse character in mice irradiated with a 5 Gy dose, which may be a chronic manifestation of gamma radiation. Although the pulmonary inflammatory process was evident in the animals after 30 days of experiment, these changes were not observed in the histological analyzes of the animals irradiated with a 7 Gy dose, since the animals died after 9-10 days after total-body irradiation, which may be a time-dependent manifestation. Regarding the collagen deposition process in the animals, observed through Picrosirius Red staining, there was a greater collagen deposition in the pulmonary alveoli in the control group compared to the 5Gy group. The H&E staining showed a thickening of the alveolar septal when the inflammatory process was present.

Conclusion

The clinical and histopathological findings indicate that the sublethal dose irradiation in this model emulate the alterations in the organism due to exposition to a large amount of radiation without leading to the death of the animals, allowing the evaluation of long-term pathological alterations.

Bibliografia

AHMAD, Iman M. *et al.* Healthcare workers occupationally exposed to ionizing radiation exhibit altered levels of inflammatory cytokines and redox parameters. *Antioxidants*, v. 8, n. 1, 2019.

AMERI, Ahmad *et al.* Low-Dose Whole-Lung Irradiation for COVID-19 Pneumonia: Short Course Results. *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics*, artigo fala sobre o tratamento para covid em dose baixas de radiação. 5 pacientes avaliados em israel, v. 108, n. 5, p. 1134–1139, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2020.07.026>>.

COTTIN, V. *et al.* Chronic eosinophilic pneumonia after radiation therapy for breast cancer. *European Respiratory Journal*, artigo sobre pneumonia em mulher em tratamento de cancer com acometimento local, podendo ser bilateral, v. 23, n. 1, p. 9–13, 2004.

DATTA, Kamal *et al.* Exposure to heavy ion radiation induces persistent oxidative stress in mouse intestine. *PLoS ONE*, v. 7, n. 8, p. 1–12, 2012.

DIAZ, Miguel F. *et al.* Bone marrow stromal cell therapy improves survival after radiation injury but does not restore endogenous hematopoiesis. *Scientific Reports*, v. 10, n. 1, p. 1–19, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/s41598-020-79278-y>>.

DONNELLY, Elizabeth H. *et al.* Acute radiation syndrome: Assessment and management. *Southern Medical Journal*, v. 103, n. 6, p. 541–546, 2010.

LEVIN, W. P. *et al.* Proton beam therapy. *British Journal of Cancer*, v. 93, n. 8, p. 849–854, 2005.

NAVEIRAS, Olaia *et al.* Bone-marrow adipocytes as negative regulators of the haematopoietic microenvironment. *Nature*, v. 460, n. 7252, p. 259–263, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nature08099>>.

PERCUOCO, Robert. *Plain Radiographic Imaging*. Third Edit ed. [S.l.]: Elsevier Inc., 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-323-08495-6.00001-4>>.

PLETT, P. Artur *et al.* Establishing a murine model of the hematopoietic syndrome of the acute radiation syndrome. *Bone*, v. 23, n. 1, p. 1–7, 2011.

SINGH, Vijay K. *et al.* Animal models for acute radiation syndrome drug discovery. *Expert Opinion on Drug Discovery*, v. 10, n. 5, p. 497–517, 2015.

SURZYKIEWICZ, Janusz *et al.* Brief screening measures of mental health for war-related dysfunctional anxiety and negative persistent thinking. v. 195, n. April, 2022.

SUZUKI, Fujio *et al.* Survival of Mice with Gastrointestinal Acute Radiation Syndrome through Control of Bacterial Translocation. *The Journal of Immunology*, artigo fala sobre polarização de macrófagos M2B para melhora da translocação bacteriana em animais irradiados. Dose 7 a 10 Gy, v. 201, n. 1, p. 77–86, 2018.

VAÑÓ, E *et al.* *ICRP135 Annals of the ICRP*. [S.l.: s.n.], 2017. v. 44. Disponível em: <www.icrp.org>.

WILLIAMS, Jacqueline P. *et al.* Animal models for medical countermeasures to radiation exposure. *Radiation Research*, v. 173, n. 4, p. 557–578, 2010.