

Efeitos de baixas doses de radiação-X no desenvolvimento do sistema nervoso central: estudo experimental em ratos*

Effects of low X-radiation doses on the central nervous system development: an experimental study in rats

Liliane Lins¹, Laís Gomes², Lis Gomes², Marcelle Trindade², Leonardo Dias², Ricardo Bragança², Rodrigo Pimentel²

Resumo **OBJETIVO:** Este trabalho analisa as conseqüências da irradiação-X no desenvolvimento do sistema nervoso de fetos de ratos. **MATERIAIS E MÉTODOS:** O trabalho foi constituído de 10 *Rattus norvegicus* albinos, Wistar, fêmeas, grávidas, com idade de oito semanas. Cinco ratas fêmeas constituíram o grupo controle e outras cinco tiveram suas regiões abdominais expostas por 30 segundos a uma dose de 0,3 Gy proveniente de um aparelho odontológico Gnatus de 70 kV e 10 mA. No 17º dia gestacional, ambos os grupos foram submetidos a histerectomia. As seções selecionadas foram examinadas para análise cerebral comparativa entre os grupos. **RESULTADOS:** O exame clínico revelou não haver diferenças morfológicas entre os grupos controle e experimental e nenhum dos animais apresentou anormalidades grosseiras. Vinte e sete por cento dos animais do grupo experimental apresentaram hemorragia cerebral moderada e 73% apresentaram hemorragia severa e danos no tecido nervoso. Nenhum animal do grupo controle apresentou hemorragia cerebral ou danificações de tecido nervoso. **CONCLUSÃO:** Estas evidências demonstram que pequenas doses de radiação-X podem causar hemorragias cerebrais e, conseqüentemente, lesão tecidual nervosa. **Unitermos:** Irradiação; Malformações; Hemorragia; Sistema nervoso central.

Abstract **OBJECTIVE:** The present study analyzes the consequences of X-irradiation for the development of the nervous system of rat fetuses. **MATERIALS AND METHODS:** The sample included ten eight-week-old, pregnant *Rattus norvegicus* albinus, Wistar. Five female rats constituted the control group and other five had their abdominal region exposed for 30 seconds to a single 0.3 Gy radiation dose from a 70 kV, 10 mA Gnatus odontological apparatus. At the 17th gestational day both groups were submitted to hysterectomy. Selected sections were examined for comparative brain analysis of both groups. **RESULTS:** The clinical evaluation demonstrated no morphological difference between the control and the experimental groups. Twenty-seven percent of the animals in the experimental group presented mild brain hemorrhage, while 73% of the animals had severe cerebral cortex hemorrhage and nervous tissue damage. None of the animals in the control group presented cerebral hemorrhage or nervous tissue damage. **CONCLUSION:** These evidences demonstrate that low X-radiation doses may cause brain hemorrhage and, consequently, nervous tissue damage. **Keywords:** Irradiation; Malformations; Hemorrhage; Central nervous system.

Lins L, Gomes L, Gomes L, Trindade M, Dias L, Bragança R, Pimentel R. Efeitos de baixas doses de radiação-X no desenvolvimento do sistema nervoso central: estudo experimental em ratos. *Radiol Bras.* 2008;41(1):45-47.

INTRODUÇÃO

Neuroblastos, provavelmente o mais abundante tipo de célula presente nos fetos de mamíferos, são muito radiosensíveis e representam um estágio intermediário

entre as células neuroepiteliais e neurônios. Em camundongos, os neuroblastos aparecem sete dias após a concepção, enquanto na espécie humana são formados 18 dias após a fecundação. Tanto na espécie humana quanto em camundongos essas células estão presentes desde a gestação até o período neonatal, formando conexões com tecidos em desenvolvimento e órgãos⁽¹⁾. Sendo assim, o uso de radiação no período embrionário, quando os neuroblastos encontram-se mais concentrados, freqüentemente resulta em anomalias congênitas do sistema nervoso central e órgãos associados, tais como microftalmia, anoftalmia, microcefalia e anencefalia.

Estudos demonstraram que uma dose de algumas centenas de Gy de raios-X pode induzir significativo número de hemorragias no encéfalo, sendo a quantidade de lesões exponencialmente proporcional à elevação da dose⁽²⁾. Entretanto, ainda há a necessidade de análise dos efeitos de baixas doses de radiação-X no desenvolvimento do sistema nervoso de fetos de ratos.

O efeito da radiação na fase de pré-implantação pode ser mais bem descrito como “tudo ou nada”, dicotomicamente representado pela morte precoce do embrião ou pelo seu desenvolvimento normal. Considera-se que o dano cromossomal causado pela irradiação seja o mecanismo mais

* Trabalho realizado na Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública, Salvador, BA, Brasil.

1. Doutora, Professora Titular de Embriologia da Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública, Salvador, BA, Brasil.

2. Acadêmicos de Medicina da Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública, Salvador, BA, Brasil.

Endereço para correspondência: Dra. Liliane Lins, Departamento de Morfologia, Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública, Rua Frei Henrique, 8, Nazaré, Salvador, BA, Brasil, 40050-420. E-mail: liliane@linsreabilitacao.com.br

Recebido para publicação em 15/5/2006. Aceito, após revisão, em 16/8/2007.

importante responsável pela morte do embrião, pois promove a degeneração de células primitivas.

O principal efeito da exposição à radiação na organogênese é o desenvolvimento de malformações⁽³⁾. As anomalias induzidas dependem dos órgãos sofrendo organogênese no período da irradiação, do estágio da diferenciação e da dose aplicada⁽⁴⁾. Déficits graves e persistentes no cérebro adulto, arquitetura cortical desorganizada, redução do tamanho cortical e do peso cerebral, microcefalia e disfunção motora foram observadas no estudo de Miki et al.⁽⁵⁾, que aplicaram irradiações sucessivas, do 13º ao 18º dia gestacional, de raios-X em doses de 1,0 Gy a 2,0 Gy.

Takai et al.⁽⁶⁾ expuseram ratos adultos a uma dose de radiação-X de 1,5 Gy no hipocampo, resultando em disfunção cognitiva, relacionada à ectopia de células. Ainda em relação às alterações hipocampais, Schmitz et al.⁽⁷⁾, trabalhando com radiação gama, relataram diminuição de células de Purkinje e aumento volumétrico como resultado da aplicação de uma dose de 3,0 Gy, do 13º ao 16º dias gestacionais.

Devido à necessidade de mais estudos histomorfológicos que caracterizem os efeitos dos raios-X no desenvolvimento embrionário, o objetivo do presente estudo é analisar os efeitos de baixas doses de radiação-X no desenvolvimento do sistema nervoso de fetos de ratos.

MATERIAIS E MÉTODOS

O presente estudo foi constituído de 15 *Rattus norvegicus* albinos, Wistar, sendo dez fêmeas e cinco machos com, aproximadamente, oito semanas de idade e peso médio de 275 gramas. Machos e fêmeas foram mantidos em um ciclo de 12 horas claro/escuro e tiveram acesso irrestrito a água e comida. As fêmeas foram fertilizadas de acordo com uma adaptação do método de Chahoud e Kwasigroch⁽⁸⁾. Para a detecção do tampão vaginal, foi utilizado um otoscópio, estabelecendo-se o dia da concepção⁽⁹⁾.

Cinco fêmeas no oitavo dia gestacional, com 37 embriões, foram mantidas em padrões normais de sobrevivência, compondo o grupo controle. Outras cinco fêmeas, também no oitavo dia gestacional, com 39

embriões, foram expostas a uma única dose de raios-X, de 0,3 Gy, por 30 segundos, na região abdominal. Foi usado, para a irradiação, um aparelho odontológico Gnatus, de 70 kV e 10 mA. Todos os ratos foram confinados em gaiolas separadas e anestesiados com éter para os procedimentos de irradiação e perfusão. No 17º dia de gestação, ambos os grupos foram submetidos a histerectomia e sacrificados com injeção de éter na cavidade abdominal, sob anestesia de ketamina 0,2 ml/100 g.

Após a histerectomia, os úteros dos animais de ambos os grupos foram fixados em formol a 10%, desidratados e embebidos em parafina. Várias secções de 4 µm foram feitas com um micrótomo. Secções selecionadas foram coradas com hematoxilina-eosina e examinadas para análise comparativa do encéfalo dos fetos de ambos os grupos. A análise macroscópica foi baseada no fechamento do neuróporo rostral e a análise microscópica consistiu em avaliação morfológica do encéfalo utilizando magnificação de dez vezes. As áreas analisadas foram hipocampo e cerebelo, além da ectopia neuronal, perda da arquitetura do tecido e hemorragia, sendo esta classificada em leve, moderada e severa, de acordo com a intensidade da congestão dos vasos e o volume de hemácias extravasado. Para a análise estatística utilizou-se o programa Epi-Info 2004 (CDC, versão 3.3), de acordo com o teste do qui-quadrado para as variáveis hemorragia e alteração da arquitetura do tecido nervoso, comparando os grupos controle e experimental. Os resultados foram considerados estatisticamente significantes quando $p \leq 0,05$.

RESULTADOS

Foram analisados 37 e 39 embriões, respectivamente, nos grupos controle e experimental, não ocorrendo perda de seguimento. Exames clínicos revelaram ausência de diferenças macroscópicas entre os grupos controle e experimental, uma vez que 100% dos animais obtiveram fechamento normal do neuróporo rostral e nenhum deles (0%) apresentou sinais como anoftalmia, microcefalia e anencefalia.

Análises microscópicas revelaram hemorragia do córtex cerebral do grupo experimental, variando entre moderada a se-

vera. Vinte e sete por cento dos animais do grupo experimental apresentaram hemorragia cerebral moderada e 77% apresentaram hemorragia severa ($p < 0,05$; Figura 1). Os animais com hemorragia severa também apresentaram perda da arquitetura do tecido nervoso ($p = 0,05$). Nenhum animal do grupo controle apresentou hemorragia cerebral ou perda de arquitetura do tecido nervoso (Figura 2).

DISCUSSÃO

Todas as gestações evoluíram normalmente até o período da análise, não tendo sido observada nenhuma alteração comportamental no grupo experimental, quando comparado ao grupo controle. A detecção do *plug* vaginal foi realizada de forma efetiva por um otoscópio, o que permitiu a determinação do dia exato da concepção e o aumento da predictabilidade da gravidez, como demonstrado por Voipio e Nevalainen⁽⁹⁾. Esse método não causa nenhum estresse ou dor aos animais, é rápido e de fácil realização. Dessa forma, a introdução do otoscópio não apresenta efeitos morfológicos no desenvolvimento da gravidez; por conseguinte, os animais não sofreram interferência externa durante o estudo.

Uma vez que as células do tecido nervoso são extremamente sensíveis à radiação, lesões do tecido nervoso e hemorragias foram os principais achados deste estudo. Entretanto, outros efeitos como disfunções motoras e cognitivas, atrofia das células de Purkinje, microcefalia e ectopia hipocampal foram detectadas por outros autores^(5,6), contudo, não foram investigadas no presente estudo.

As hemorragias detectadas no cérebro de ratos expostos à radiação são evidências consistentes com os achados de Yang e Tobias⁽²⁾, os quais demonstraram que uma baixa dose de radiação-X pode causar hemorragias cerebrais e, conseqüentemente, lesão tecidual nervosa. Nenhum dos animais apresentou anormalidades como anoftalmia, microcefalia e anencefalia, provavelmente devido à baixa dose aplicada, segundo os achados de Friedberg et al.⁽⁴⁾.

Apesar do grupo experimental ter apresentado altos níveis de hemorragia cerebral, não houve diferenças morfológicas entre os grupos experimental e controle.

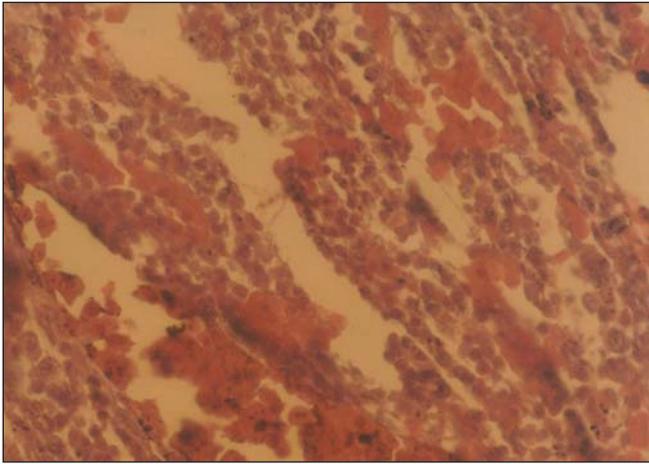


Figura 1. Fotomicrografia da região encefálica de feto experimental de 17 dias. Pode-se observar hemorragia cerebral severa e difusa e perda da arquitetura tecidual nervosa. (Hematoxilina-eosina; aumento de dez vezes).

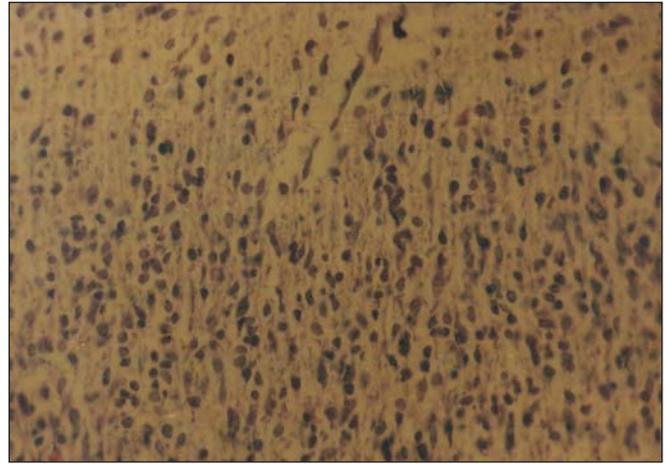


Figura 2. Fotomicrografia da região encefálica de feto controle de 17 dias. Pode-se observar o tecido cerebral intacto. (Hematoxilina-eosina; aumento de dez vezes).

Esses achados são consistentes com Wang et al.⁽¹⁰⁾, que encontraram poucas alterações induzidas pela radiação.

A descrição do efeito da irradiação no período de pré-implantação como “tudo ou nada”⁽³⁾ foi confirmada no presente estudo, uma vez que os embriões se desenvolveram normalmente até o 17º dia gestacional, não havendo perda de seguimento. Vos⁽³⁾ ainda afirma, em seu estudo, que o principal efeito da exposição aos raios-X na fase da organogênese é o desenvolvimento de malformações. Apesar de no presente estudo o grupo experimental ter sido irradiado no período da organogênese, nenhuma malformação foi evidenciada. Contudo, o tecido nervoso com perda da arquitetura e hemorragia provavelmente acarretaria distúrbios de desenvolvimento posteriores.

De acordo com Schmitz et al.⁽⁷⁾, irradiação pré-natal resulta não somente em perda neuronal, mas também em decréscimo massivo de volume nas regiões cerebrais investigadas. Isso não foi observado neste estudo, provavelmente devido à baixa dose aplicada. Sabe-se que as células progeni-

toras podem ser lesadas pela radiação e não se dividem durante a exposição, mas talvez uma única dose de irradiação não seja suficiente para causar danos nos estágios de desenvolvimento celular. Esses autores aplicaram graus diferentes de irradiação, o que pode ter sido a causa de interferência nos fatores de crescimento.

Em conclusão, os achados do presente trabalho suportam a assertiva de que radiação-X, na forma e condições aqui aplicadas, pode determinar a ocorrência de hemorragias cerebrais e lesões teciduais nervosas em fetos de ratos.

Agradecimentos

Este trabalho foi em parte apoiado pela Fundação Bahiana para Desenvolvimento das Ciências.

REFERÊNCIAS

1. Rugh R. X-ray-induced teratogenesis in the mouse and its possible significance to man. *Radiology*. 1971;99:433-43.
2. Yang T, Tobias C. Effects of heavy ion irradiation on the brain vascular system and embryonic development. *Adv Space Res*. 1984;4:239-45.
3. Vos O. Effects and consequences of prenatal ir-

radiation. *Boll Soc Ital Biol Sper*. 1989;65:481-500.

4. Friedberg W, Faulkner DN, Neas BR, et al. Dose-incidence relationships for exencephalia, anophthalmia and prenatal mortality in mouse embryos irradiated with fission neutrons or 250 kV X-rays. *Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med*. 1987;52:223-36.
5. Miki T, Fukui Y, Takeuchi Y, et al. A quantitative study of the effects of prenatal X-irradiation on the development of cerebral cortex in rats. *Neurosci Res*. 1995;23:241-7.
6. Takai N, Sun XZ, Ando K, et al. Ectopic neurons in the hippocampus may be a cause of learning disability after prenatal exposure to X-rays in rats. *J Radiat Res*. 2004;45:563-9.
7. Schmitz C, Born M, Dolezel P, et al. Prenatal protracted irradiation at very low dose rate induces severe neuronal loss in rat hippocampus and cerebellum. *Neuroscience*. 2005;130:935-48.
8. Chahoud I, Kwasigroch TE. Controlled breeding of laboratory animals In: Neubert D, Merker HJ, Kwasigroch TE, editors. *Methods in prenatal toxicology*. Stuttgart: Georg Thieme; 1977. p.78-91.
9. Voipio HM, Nevalainen T. Improved method for vaginal plug detection in rats. *Scand J Lab Anim Sci*. 1998;25:5-9.
10. Wang H, Chen D, Gao C, et al. Effects of low level prenatal ⁶⁰Co gamma-irradiation on postnatal growth and behavior in mice. *Teratology*. 1993; 48:451-7.