

RENATA CRISTIANE GENNARI BIANCHI

**ANÁLISE COMPARATIVA DOS EFEITOS DA ATIVIDADE
FÍSICA ATRAVÉS DA MENSURAÇÃO DE CITOCINAS PRÓ-
INFLAMATÓRIAS EM PULMÕES IRRADIADOS DE RATOS**

Campinas

2012



UNICAMP

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Faculdade de Ciências Médicas

**ANÁLISE COMPARATIVA DOS EFEITOS DA ATIVIDADE
FÍSICA ATRAVÉS DA MENSURAÇÃO DE CITOCINAS PRÓ-
INFLAMATÓRIAS EM PULMÕES IRRADIADOS DE RATOS**

RENATA CRISTIANE GENNARI BIANCHI

Tese de Doutorado apresentada à Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP, para obtenção do título de Doutor em Ciências. Sob orientação do Prof. Dr. Luiz Roberto Lopes.

Campinas

2012

Unidade B-02
UNICAMP
Cutter _____
Ed. _____
Tombo BC 972/2
Proc. 16 100-112
C. 0 1
Preço 171 41,00
Data 17/04/12
Cod. tit. 24336

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
ROSANA EVANGELISTA PODEROSO – CRB8/6652
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP

B47a

Bianchi, Renata Cristiane Gennari, 1978 -

Análise comparativa dos efeitos da atividade física através da mensuração de citocinas pró-inflamatórias em pulmões irradiados de ratos / Renata Cristiane Gennari Bianchi. – Campinas, SP : [s.n.], 2012.

Orientador : Luiz Roberto Lopes

Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Radioterapia. 2. Pneumonite por radiação. 3. Fibrose pulmonar. 4. Neoplasias esofágicas. 5. Fisioterapia. I. Lopes, Luiz Roberto. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês: Comparative analysis of the effects of physical activity through the measurement of proinflammatory cytokines in irradiated lungs of rats.

Palavras-chave em inglês:

Radiotherapy

Radiation pneumonitis

Pulmonary fibrosis

Esophageal neoplasms

Physical therapy

Área de concentração: Fisiopatologia Cirúrgica

Titulação: Doutor em Ciências

Banca examinadora:

Luiz Roberto Lopes [Orientador]

Ivete Alonso Breda Saad

Ivan Felizardo Contrera Toro

José Luis Braga de Aquino

Erica Passos Baciuk

Data da defesa: 25-01-2012

Programa de Pós-Graduação: Ciências da Cirurgia

Errata: Érica Passos Baciuk

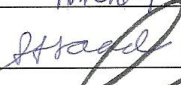
Profª Drª Ilka de Fátima S. Ferreira Boin
Coordenadora do Programa de
Pós-Graduação em Ciências da Cirurgia
FUMUNESP
Matrícula 059170

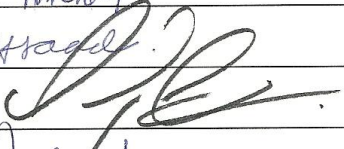
Banca Examinadora da Defesa de Doutorado
Renata Cristiane Gennari Bianchi

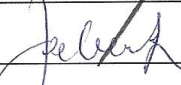
Orientador: Prof. Dr. Luiz Roberto Lopes

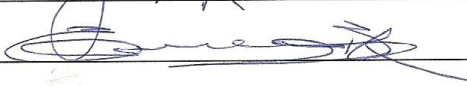
Membros:

1. Prof(a). Dr(a). Luiz Roberto Lopes - 

2. Prof(a). Dr(a). Ivete Alonso Bredda Saad - 

3. Prof(a). Dr(a). Ivan Felizardo Contrera Toro - 

4. Prof(a). Dr(a). José Luis Braga de Aquino - 

5. Prof(a). Dr(a). Érica Passos Baciuk - 

Curso de Pós-Graduação em Ciências da Cirurgia da Faculdade de
Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 25/01/2012

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Antonio Carlos Bianchi e Maria Aparecida Gennari Bianchi, fontes da minha maior motivação de persistência nesta caminhada.

À minha irmã, Rachel Cristina Gennari Bianchi, por compartilhar os momentos importantes da minha vida.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Ao Prof. Dr. Luiz Roberto Lopes, serei sempre grata pela acolhida, credibilidade, incentivo e dedicação na orientação deste trabalho. Muito além de um mestre, é um ser humano excepcional, o qual serve de exemplo a ser seguido. Estou certa de que levarei seus ensinamentos pelo resto de minha vida.

AGRADECIMENTOS

Aos funcionários do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na Área da Ciência em Animais de Laboratório da UNICAMP (CEMIB), pela ajuda prestada.

Aos colegas Eduardo Rochete Ropelle e Carlos Kiyoshi Katashima, do Laboratório de Sinalização Celular do Departamento de Clínica Médica da FCM-UNICAMP, pela importante ajuda na confecção das técnicas e resultados deste trabalho, o qual não poderia ter sido finalizado sem tais preciosas colaborações.

Ao Dr. Eduardo Baldon Pereira, diretor técnico do Serviço de Radioterapia do HC-UNICAMP, pela ajuda prestada em relação à irradiação dos animais deste estudo.

À Renata Rodrigues dos Santos Lixandrão, física médica do CEB-UNICAMP, que muito contribuiu para a elucidação da descrição da metodologia relacionada à radioterapia.

Ao Prof. Dr. Nelson Adami Andreollo por suas importantes considerações em relação a este estudo.

Ao reitor do UNIFAE, Prof. Valdemir Samonetto, pela disponibilidade em conceder o biotério para alocar os animais do estudo e ao funcionário Jair Candido, pela ajuda na manutenção diária dos animais.

Ao colega Hugo Evangelista Brandino, pelo auxílio prestado em relação ao protocolo da atividade física dos animais e sacrifício dos mesmos.

Aos funcionários da Secretaria da Comissão de Pós-Graduação de Ciências da Cirurgia da FCM-UNICAMP, por toda ajuda e atenção no que diz respeito aos assuntos burocráticos da pesquisa.

“Diante de alguma dificuldade, se estiver para desanimar, aqueça os sentidos, revigore a fé, e ouvirá a voz da consciência dizer: persevere e vencerá”.

(Renato Kehl)

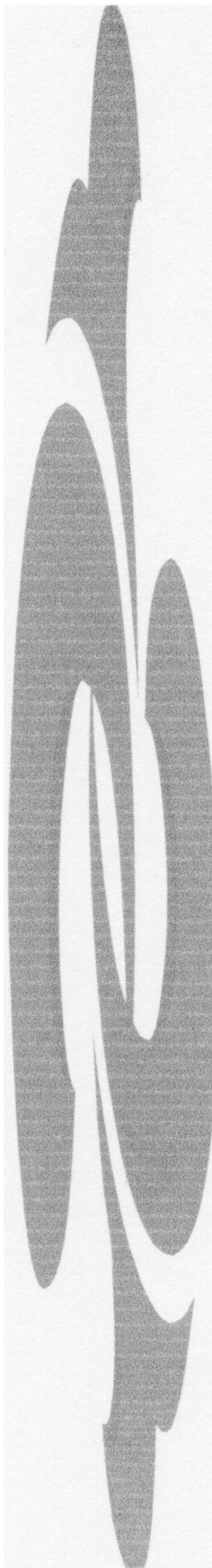
	PÁG.
RESUMO.....	xxi
ABSTRACT.....	xxv
1- INTRODUÇÃO.....	29
1.1- Considerações gerais sobre câncer esofágico.....	31
1.2- Terapia multimodal para o tratamento de câncer esofágico...	32
1.3- Injúria pulmonar radioinduzida.....	34
1.4- Citocinas pró-inflamatórias pulmonares.....	36
1.5- Atividade física.....	40
2- OBJETIVOS.....	43
3- MATERIAIS E MÉTODO.....	47
4- RESULTADOS.....	55
5- DISCUSSÃO.....	61
6- CONCLUSÃO.....	83
7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	87
8- ANEXOS.....	109
Anexo 1- Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa da CEEA/UNICAMP.....	111

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CE	Câncer esofágico
cGy/min	Centigray por minuto
cm	Centímetro
^{60}Co	Cobalto 60
DNA	Ácido desoxirribonucléico
ERO	Espécies reativas do oxigênio
g	Gramas
Gy	Gray
IKK β	quinase de proteína <i>beta</i>
IL	Interleucina
MeV	Megaeletrovolts
MIP-2	Proteínas inflamatórias macrofágicas
ml/Kg	Mililitros por quilograma
NF-KB	Fator de transcrição nuclear <i>kappa b</i>
RQT	Radioquimioterapia
TGF- β	fator transformador de crescimento – <i>beta</i>
TNF- α	fator de necrose tumoral – <i>alfa</i>

LISTA DE FIGURAS

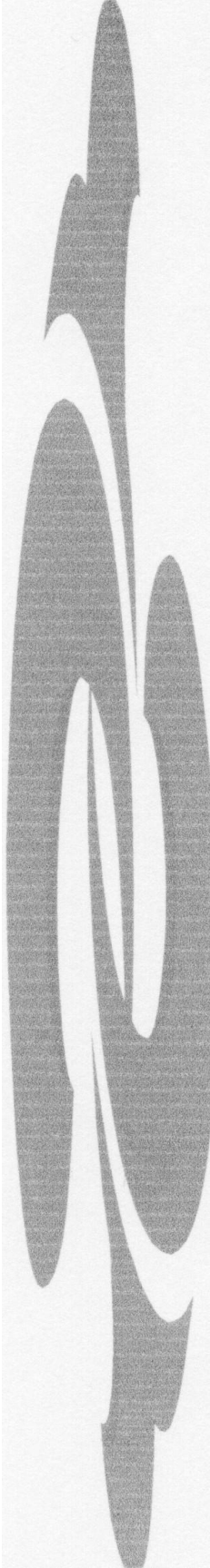
	PÁG.
Figura 1- Animais do estudo realizando natação.....	50
Figura 2- Caixa de madeira para irradiação dos animais.....	51
Figura 3- <i>Imunoblotting</i> de pIKK β	57
Figura 4- <i>Imunoblotting</i> de TNF- α	58
Figura 5- <i>Imunoblotting</i> de IL-6.....	59
Figura 6- <i>Imunoblotting</i> de TGF- β	60



RESUMO

As neoplasias esofágicas passíveis de tratamento por radioterapia podem induzir seqüelas clínicas importantes como a pneumonite radioinduzida e a fibrose pulmonar. É sabido que os exercícios físicos promovem uma sequência de liberação de citocinas pró-inflamatórias, com diminuição dos efeitos deletérios das desordens cardiovasculares e promoção de efeito protetor contra as doenças associadas à inflamação sistêmica. Diante deste fato, o presente estudo teve o objetivo de verificar se a atividade física pré-radioterapia possui elementos radioprotetores, medindo-se a ativação de citocinas pró-inflamatórias como a interleucina-6 (IL-6), fator transformador de crescimento-*beta* (TGF- β), fator de necrose tumoral-*alfa* (TNF- α) e quinase de proteína *beta* (IKK β), por meio da análise de *Western Blotting* (WB). Para isto, foi realizado um estudo randomizado empregando 28 ratos Wistar Hannover, machos, com idade média de 90 dias e peso aproximado de 200 gramas. Os animais foram divididos em 3 grupos. GI (grupo controle), GII (grupo que foi submetido à radioterapia e sacrificado no 1º dia pós-radioterapia – GIIa ou sacrificado no 7º dia pós-radioterapia – GIIb) e GIII (grupo que realizou atividade física e radioterapia e foi sacrificado no 1º dia pós-radioterapia- GIIIa ou sacrificado no 7º dia pós-radioterapia- GIIIb). A atividade física do grupo GIII consistiu em natação, durante 8 semanas (carga zero, 3 vezes por semana, cerca de 30 minutos). Após tal atividade física, GII e GIII foram submetidos à irradiação por cobaltoterapia, dose única de 3,5 grays em corpo inteiro. Todos os animais foram sacrificados por overdose de pentobarbital, de acordo com o tempo de análise de citocinas, e em seguida, um fragmento do lobo inferior do pulmão direito foi analisado por WB. Como resultado, a expressão das citocinas IKK β , TNF- α e IL-6 induzidas por radiação no pulmão foi menor nos animais que se exercitaram e que foram sacrificados no 7º dia pós-radioterapia (GIIIb), com significância estatística através do teste de ANOVA ($p < 0,05$). No entanto, o exercício não alterou o aumento induzido pela radiação em relação à TGF- β . Concluiu-se que a atividade física possui elementos radioprotetores, pois houve menor aumento de IKK β , TNF- α e IL-6 nos grupos pós-atividade física (GIIIb),

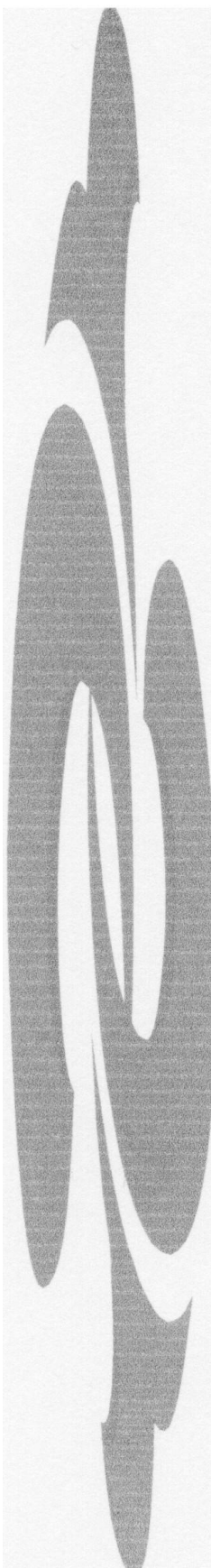
com sugestão de menor inflamação e lesão tecidual pós-radioterapia. Possivelmente não houve significância estatística em relação à TGF- β , pois tal citocina tem papel preponderante numa fase mais tardia de injúria tecidual, ou seja, na fibrose pulmonar. Além disso, as citocinas analisadas mostraram-se bons marcadores para mensurar a resposta inflamatória tecidual pulmonar.



ABSTRACT

Esophageal neoplasms amenable to treatment by radiation therapy may induce important clinical radioinduced sequelae as pneumonitis and pulmonary fibrosis. It is known that exercise promotes a sequence of release of proinflammatory cytokines, decreasing the deleterious effects of cardiovascular disorders and promotion of protective effect against diseases associated with systemic inflammation. Given this fact, this study aimed to determine whether physical activity pre-radiotherapy has radioprotective elements by measuring the activation of proinflammatory cytokines such as interleukin-6 (IL-6), transforming growth factor-beta (TGF- β), tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) and beta protein kinase (IKK β) by means of Western Blotting (WB) analysis. For this, we performed a randomized study using 28 male Wistar Hannover rats, males with a mean age of 90 days and weighing approximately 200 grams. The animals were divided into 3 groups. GI (control group), GII (group underwent radiotherapy and sacrificed on day 1 after radiation therapy - GIIa or sacrificed on day 7 post-radiotherapy - GIIb) and GIII (the group that performed physical activity and radiotherapy and was sacrificed on day 1 post-radiotherapy-GIIIa or sacrificed on day 7 post-radiotherapy-GIIIb). The physical activity of the group GIII consisted of swimming for 8 weeks (zero load, three times per week, about 30 minutes). After this activity, GII and GIII were subjected to irradiation by cobalt, a single dose of 3.5 Gy of whole body. All animals were sacrificed by an overdose of pentobarbital, according to the analysis time of cytokines, and then a fragment of the lower lobe of right lung was analyzed by WB. As a result, the expression of cytokines IKK β , TNF- α and IL-6 induced by radiation in the lungs was lower in the exercised animals and that were sacrificed on day 7 post-radiotherapy (GIIIb), with statistical significance by ANOVA test ($p < 0,05$) . However, the exercise did not affect the increase induced by radiation in relation to TGF- β . It was concluded that physical activity has radioprotective elements because there was a lower increase of IKK β , TNF- α and IL-6 in post-exercise groups (GIIIb), with suggestion of less inflammation and tissue injury after radiation therapy. Possibly there was no statistical significance in relation to TGF- β , as this cytokine plays an important role in a later phase of tissue

injury, namely pulmonary fibrosis. Furthermore, the cytokines analyzed proved to be good markers to measure the pulmonary inflammatory response.



1- INTRODUÇÃO

1.1-Considerações gerais sobre câncer esofágico

Câncer esofágico (CE) ainda permanece uma ameaça à saúde. Este tipo de câncer tem tido atenção especial nas últimas três décadas por causa da mudança dos perfis epidemiológicos e o aumento das opções de tratamento. No mundo inteiro é a sexta causa de óbito por câncer (LIAO et al., 2007). Além disso, é considerada uma malignidade virulenta, associada a um tempo de sobrevida de cinco anos em aproximadamente 5% dos casos (D'AMICO, 2007).

Nos últimos anos houve um aumento de 350% dos casos de adenocarcinoma do esôfago inferior e da junção gastroesofágica. Adenocarcinoma tem sido associado à obesidade, doença do refluxo gastroesofágico e esôfago de *Barret* (LIAO et al., 2007). Já carcinoma esofágico de células escamosas é um dos tumores mais malignos, apresentando alta mortalidade. A maioria dos pacientes apresenta retardo do curso da doença e o tempo de sobrevida é pouco. A taxa dos cinco anos de sobrevida é em torno de 10 a 20% nos grupos de pacientes com carcinoma esofágico de células escamosas avançado (estágio III) tratados com cirurgia como a modalidade primária (CAO et al., 2009). Segundo o *American Joint Committee on Cancer*, a taxa de sobrevivência dos cinco anos pós-operatórios para carcinoma esofágico de células escamosas no estágio I é aproximadamente 90%, mas isto decresce para 45% no estágio II, 20% no estágio III e somente 10% nos pacientes no estágio IV da doença (TAKEUCHI et al., 2010).

A prevenção do câncer é um sistema de várias medidas com o objetivo de evitar tal doença. A prevenção do câncer primário inclui a identificação ou a destruição dos fatores de risco conhecidos. Os principais desses fatores são: tabagismo, dieta inadequada, consumo excessivo de álcool, fatores ocupacionais, poluição ambiental, radiação eletromagnética, infecção, medicamentos e inatividade física. Sabe-se atualmente que aproximadamente de um a 30% dos tumores malignos podem ser evitados através da implementação de várias medidas preventivas como, por exemplo, a exclusão de tais fatores de risco (ULECKIENE et al., 2008).

1.2- Terapia multimodal para o tratamento de câncer esofágico

Recentemente, a terapêutica para tais pacientes tem sido bem estudada, incluindo o surgimento de terapias neoadjuvantes. Esofagectomia foi a melhor conduta para o CE por décadas (EARLAM e CUNHA-MELO, 1980; MULLER et al., 1990; MIYATA et al., 2009), porém o resultado somente da cirurgia para CE avançado local é, infelizmente, insatisfatório (MIYATA et al., 2009). Para melhorar tal prognóstico, terapia multimodal, incluindo cirurgia, radioterapia e quimioterapia, tem sido introduzida (ARNOTT et al., 1992; ANDO et al., 1997; KELSEN et al., 1998; BERNARD et al., 2001; MIYATA et al., 2009). Uma das estratégias mais promissoras entre as terapias multimodais no estágio avançado da doença é a radioquimioterapia (RQT) neoadjuvante seguida por ressecção cirúrgica (MIYATA et al., 2009). Especula-se que a RQT aumente a taxa de ressecção, com obtenção de margens de segurança mais claras, além de reduzir a reincidência local e metástases (CAO et al., 2009; TERCIOTI JUNIOR et al., 2011). Os avanços da técnica de radioterapia em particular, segundo LIAO et al. (2007), permitem atingir mais precisamente o volume tumoral e preservar o tecido normal, com consequente melhora dos resultados apresentados. Pneumonite por irradiação é uma das maiores complicações neste tipo de câncer em pacientes tratados com RQT definitiva (ASAKURA et al., 2010).

RQT pré-operatória e esofagectomia estão associadas a 2% a 18% de mortalidade, geralmente secundária à sepse, pneumonia e síndrome da angústia respiratória aguda (ADELSTEIN et al., 2000; CHOI et al., 2004). As complicações pulmonares são as mais sérias morbidades após esofagectomia e a causa principal de mortalidade pós-operatória entre os pacientes tratados com cirurgia para câncer de esôfago. A incidência de complicações pulmonares pós-operatórias é de 30% ou maior e a taxa de mortalidade intra-hospitalar é de 55% (LAW et al., 2004). Fatores de risco como debilidade orgânica, baixa função pulmonar e idade avançada têm sido usados para selecionar de forma criteriosa

os pacientes para cirurgia (FANG et al., 2003). Além disso, o tempo prolongado de cirurgia e perda sanguínea excessiva está associado ao aumento da morbidade e mortalidade após esofagectomia (FANG et al., 2003; LIAO et al., 2007).

O pulmão é o órgão de maior dose-limite para câncer dentro da radioterapia da região torácica (GEARA et al., 1998; SAKAI et al., 2008). A graduação da dose de radiação é frequentemente limitada pela tolerância à radiação dos tecidos normais. A graduação da dose, entretanto, também leva à exposição excessiva dos órgãos com maior risco, como o pulmão, coração, esôfago e medula espinhal (STROIAN et al., 2008; JIN et al., 2009).

Radioterapia convencional com doses na faixa de 60 a 70 grays (Gy) é frequentemente insuficiente para erradicar o tumor com uma faixa de controle anual de somente 10 a 20% (LEE et al., 2006a; THOMAS et al., 2008). A escala de dose de radioterapia é uma aproximação, mas é limitada pela baixa tolerância do tecido pulmonar normal adjacente. Pneumonite por radiação, a qual representa a fase aguda da injúria pulmonar radioinduzida, é a maior toxicidade dose-limítrofe na radioterapia para tais tumores (RÜBE et al., 2008).

A primeira unidade de cobalto (Gravicert), foi desenhada por Lázló Bozóky sete anos após a primeira instalação mundial de unidade de cobalto no Canadá. A energia de megavoltagem da base do cobalto 60 (^{60}Co) - média: 1,25 megaeletrovolts (MeV) resultou em tratamentos mais sucedidos de tumores mais profundos comparados com a terapia de raio-x. Nas duas-três décadas seguintes, apesar de largamente utilizada as altas energias dos aceleradores lineares, a teleterapia por ^{60}Co significou um tratamento moderno por radiação pelo mundo todo. Melhora da qualidade das técnicas de radiação necessitavam localização exata do tumor e o desenvolvimento de métodos de tratamento. No começo, a localização foi realizada por máquinas de radiografia, enquanto o plano de tratamento era feito manualmente. Em 1965, o tipo de unidade de cobalto Rotacert

foi utilizado na Hungria. Esta máquina já era capaz de realizar irradiação em direções múltiplas e trabalhar em modo rotativo. Este modelo de aparelho foi copiado em outros países e, com isso, instalado em outros centros de radioterapia. A qualidade dos tratamentos foi melhorado significativamente e pela introdução do plano de tratamento computadorizado e respaldado pelo *National Treatment Planning Network* em 1978 foi um passo importante nesse processo. O próximo desenvolvimento importante foi o começo da imagem de tomografia computadorizada baseada no plano de tratamento em 1981. Com a utilização em larga escala dos modernos acelerados lineares, o uso das unidades de cobaltoterapia sofreu um declínio, mas agora, entretanto, aproximadamente 2500 unidades ainda são utilizadas mundialmente. Sua utilização poderia ser aumentada pela expansão dos estudos concernentes ao tumor (GYARMATHY et al., 2008).

Desde o advento da teleterapia, tanto as técnicas de tratamento quanto de equipamentos melhoram significativamente e protocolos foram estabelecidos tanto para os operadores, quanto para o público alvo devido à exposição à radiação. Muitas publicações têm sido avaliadas ao longo dos anos para elucidar os efeitos destas mudanças nas técnicas protetoras (FACURE et al., 2010).

1.3- Injúria pulmonar radioinduzida

De acordo com a literatura, a descrição clássica de injúria pulmonar radioinduzida se dá em duas fases clínicas distintas: pneumonite e fibrose pulmonar. A descrição original por Rubin e Casseratt (RUBIN e CASSERATT, 1968) e colaboradores (COGGLE et al., 1986) divide o quadro clínico da resposta à radiação em três fases: 1) fase inicial onde existe um período latente de pneumonite que ocorre no primeiro mês; 2) fase intermediária, com uma

pneumonite aguda (exsudativa – terceira semana a vários meses); 3) fase tardia, (com fibrose – a partir do sexto mês).

A fase inicial ou latente resulta em perda de pneumócitos alveolares do tipo I, culminando em um epitélio desnudo com mudanças estruturais significativas subseqüentes aos corpos lamelares dos pneumócitos do tipo II (precursores das células do tipo I alveolares), os quais secretam o surfactante. A perda de surfactante também causa a transudação de proteínas séricas para dentro dos alvéolos (MOLLIS e VAN BEUNINGEN, 1991). Nas primeiras semanas pós-irradiação, nenhuma mudança é observada à microscopia óptica. Com o microscópio eletrônico podem ser observadas mudanças degenerativas de células tipo I e II, permeabilidade capilar aumentada, espessamento da membrana basal, além de mudanças endoteliais. Ainda há o edema do espaço intersticial e um número aumentado de macrófagos alveolares. Essas alterações são dose-dependentes e somente aparecem acima da dose limítrofe (MORGAN et al., 1995).

A fase intermediária da pneumonite aguda pode ser observada ao microscópio óptico. É caracterizada por um extravasamento de proteínas dentro do espaço alveolar, espessamento do septo alveolar, edema intersticial, alteração capilar e mudanças nos pneumócitos do tipo II e macrófagos alveolares (MORGAN et al., 1995).

A fase tardia da fibrose é caracterizada pela perda de capilares, juntamente com a diminuição dos pneumócitos tipo I e eventualmente o retorno dos pneumócitos do tipo II. Além disso, também é constatado um aumento da deposição de colágeno (MORGAN et al., 1995). O tempo de deposição do colágeno varia de acordo com a espécie e a linhagem do animal, sugerindo uma variabilidade genética (DOWN e STEEL, 1983; MORGAN et al., 1995). A fibrose é uma consequência comum da inflamação crônica ou injúria. Fibrose pulmonar

pode resultar de uma reparação anormal após uma resposta inflamatória aguda. O processo de reparação iniciado por um insulto tissular é ativado por células específicas a fim de produzir mediadores biológicos importantes como as citocinas e fatores de crescimento e quimiocinas, os quais manejam e permeiam a maioria dos aspectos da resposta inflamatória. Consequentemente, a regulação alterada da produção dessas citocinas inflamatórias e quimiocinas após a injúria e reparação tecidual, contribuem de maneira significativa para a fibrose (JOHNSTON et al., 2002). A fibrose permanente leva de seis a 24 meses para se estabelecer, mas geralmente permanece estável após dois anos (MOVSAS et al., 1997). Apesar da incidência de fibrose pulmonar depender de vários fatores clínicos, incluindo dose total, dose por fração e a combinação de radioterapia e quimioterapia, o risco de fibrose permanece influenciado por fatores específicos individuais e inerentes (GEARA et al., 1998; SAKAI et al., 2008).

Os sintomas clínicos da pneumonite causada por radiação incluem dispneia, tosse, febre e até óbito por falência respiratória. Estes sintomas ocorrem aproximadamente um mês após o término da radioterapia (RÜBE et al., 2008; YU et al., 2008).

1.4- Citocinas pró-inflamatórias pulmonares

Como o pulmão é um órgão muito radiossensível, o prejuízo da radioterapia, tanto para esôfago quanto para pulmão *per si*, pode levar a sérias complicações a mais de 50% desses pacientes submetidos à radioterapia. (NOVAKOVA-JIRESOVA et al., 2005). As citocinas inflamatórias são a chave para melhorar e otimizar os efeitos da pneumonite causada por irradiação pulmonar (SAKAI et al., 2008).

Embora haja o ajuste dos parâmetros como a média da dose de irradiação, o volume irradiado e a dose por fração para minimizar o risco de pneumonite aguda por irradiação (BENTZEN et al., 2000; ARPIN et al., 2009), a susceptibilidade individual para a toxicidade da radioterapia torácica permanece significativa, direcionando pesquisas para os marcadores intrínsecos biológicos do paciente. Em particular, tem-se sugerido o envolvimento precoce de certas citocinas na ocorrência de pneumonite durante a irradiação (ARPIN et al., 2009).

Segundo BAO et al. (2009), os estudos mostram que citocinas pró-inflamatórias como a interleucina (IL)-6, fator transformador de crescimento – *beta*1 (TGF- β 1) e fator de necrose tumoral - *alfa* (TNF- α) desempenham um papel muito importante, tanto diretamente quanto indiretamente, na injúria pulmonar induzida por irradiação e o processo consequentemente de fibrose. Após o dano tissular inicial radioinduzido, essas citocinas podem causar inclusive um influxo de produção de macrófagos e outras células inflamatórias (KYAS et al., 2007; BAO et al., 2009). Além disso, espécies reativas do oxigênio (ERO) induzidas por essa resposta inflamatória desempenham um importante papel na indução do dano de ácido desoxirribonucléico (DNA), tanto na irradiação localizada, quanto na de corpo inteiro (CALVELEY et al., 2005). Esses radicais livres são muito instáveis e reagem rapidamente com outros grupos ou substâncias no organismo, levando, portanto, à injúria celular ou tissular (LIU et al., 2009).

De acordo com muitos estudos, a proteína *beta* quinase (IKK β) também desempenha um papel preponderante na inflamação (LIXUAN et al., 2010). Funções bem documentadas de IKK β , incluem a ativação do fator de transcrição nuclear - kappa B (NF-KB) pela via clássica através de fosforilação dos inibidores de IKK β (HACKER e KARIN, 2006; SCHEIDEREIT, 2006; PERKINS, 2007). Fatores de transcrição NF-KB desempenham um papel importante no equilíbrio entre as células saudáveis e apoptose e estão envolvidas na regulação da proliferação e desenvolvimento celular ou diferenciação de vários tipos de células

(HAYDEN e GHOSH, 2004; PERKINS e GILMORE, 2006). Mudanças na atividade e/ou regulação de IKK β e NF-KB são constatadas em muitas doenças associadas à inflamação aguda ou crônica e mais recentemente tornou-se evidente que NF-KB apresenta uma maior atividade constitutiva ou regulatória anormal em várias formas de câncer (SCHMID e BIRBACH, 2008).

Ainda tomando-se por base as funções do NF-KB, este regula a expressão de genes da maioria de citocinas pró-inflamatórias, como por exemplo, TNF- α , IL1- β , quimiocinas, proteínas inflamatórias macrofágicas (MIP-2), entre outros, os quais desempenham um papel na injúria pulmonar (CHOPRA et al., 2009). Além disso, a ativação de NF-KB é necessária para uma resposta de defesa eficiente por parte do organismo, porém uma excessiva ativação desta proteína resulta numa resposta inflamatória exagerada dos pulmões e até mesmo de outros órgãos (FAN et al., 2000; CHOPRA et al., 2009). A ativação de NF-KB contribui para o acúmulo de neutrófilos e da expressão e da expressão de IL1- β , TNF- α e MIP-2 nos pulmões injuriados de ratos (SHENKAR e ABRAHAM, 1997), e ainda desempenha um papel importante na apoptose (como citado anteriormente), através da regulação da expressão dos genes envolvidos na morte celular (CHOPRA et al., 2009).

Os ativadores de NF-KB, como TNF- α e IL-1, aumentam a produção celular de ERO pela mitocôndria. O acúmulo de neutrófilos nos pulmões leva a uma concentração local aumentada de ERO e citocinas pró-inflamatórias como resultado de apoptose tardia (CHOPRA et al., 2009).

Em relação às várias citocinas inflamatórias, TGF- β 1 e IL-6 são consideradas umas das mais importantes. Estas duas proteínas estão envolvidas de maneira significativa na patogênese da toxicidade pulmonar radioinduzida e podem ser muito úteis em prever os resultados dos pacientes com esta patologia (YU et al., 2008). O valor preditivo de TGF- β 1 na toxicidade pulmonar foi

primeiramente reportado por ANSCHER et al. (1993) em pacientes com câncer de mama avançado tratado com altas doses de quimioterapia e transplante de medula óssea. TGF- β é provavelmente a citocina mais importante responsável pela reação fibrótica no tecido previamente normal, seguido de exposição à radiação (PELTON e MOSES, 1990; RÜBE et al., 2000). TGF- β é auto-indutiva e quimiotática para monócitos e macrófagos e ainda pode aumentar o nível de fator de crescimento no local da injúria. É um potente quimioatrativo para fibroblastos e estimula a produção de colágeno (ROBERTS et al., 1986; RITZENTHALER et al., 1993), além de aumentar o acúmulo de matriz extracelular pela inibição da degradação da matriz e induz uma diferenciação terminal prematura de fibroblastos progenitores dentro dos fibrócitos pós-mitóticos. A indução estimulada desta citocina através deste processo de diferenciação terminal de fibroblastos / fibrócitos leva então a um acúmulo de fibrócitos pós-mitóticos capazes de promover a síntese colágena (RÜBE et al., 2000).

A IL-6 é outra citocina pró-fibrótica e imuno-modulatória que desempenha um dos maiores papéis na reação inflamatória. No parênquima pulmonar, a IL-6 é sintetizada por uma larga variedade de células, incluindo macrófagos alveolares, pneumócitos do tipo II, linfócitos T e fibroblastos. Algumas evidências indicam que a concentração de IL-6 é relativamente elevada em pacientes submetidos à radioterapia torácica (BARTHELEMY-BRICHANT et al., 2004; ARPIN et al., 2005; TSOUTSOU e KOUKOURAKIS, 2006). Além disso, níveis elevados de IL-6 circulante durante a radiação têm sido relacionados ao risco aumentado de toxicidade pulmonar radioinduzida (CHEN et al., 2001).

TNF é uma citocina quimioatrativa muito forte para células inflamatórias, induzindo essas células ao aumento da aderência para o endotélio, através da otimização da sua exposição de moléculas de adesão (SAKAI et al., 2008).

1.5- Atividade física

Exercício físico reduz os efeitos deletérios das desordens cardiovasculares e inflamatórias. Atualmente o estilo de vida saudável tem sido associado com a prática regular de atividade física. Evidências mostram que esta prática faz com que o indivíduo tenha mais longevidade, além de diminuir o grau de morbidade e mortalidade. Exercício físico previne ou reduz os efeitos maléficos de condições patológicas, como a hipertensão arterial, doença arterial coronariana, aterosclerose, *diabete mellitus*, osteoporose, além de doença de *Parkinson* e *Alzheimer*. A atividade física de intensidade moderada também demonstra melhora na função cardiorrespiratória como uma consequência da redução da pressão arterial e da frequência cardíaca, aumento do consumo máximo de oxigênio e otimização da regulação de enzimas oxidativas. Mais recentemente, evidências têm demonstrado que a atividade física regular exerce efeitos protetores contra doenças associadas à inflamação sistêmica (PETERSEN e PEDERSEN, 2004; MUSSI et al., 2008).

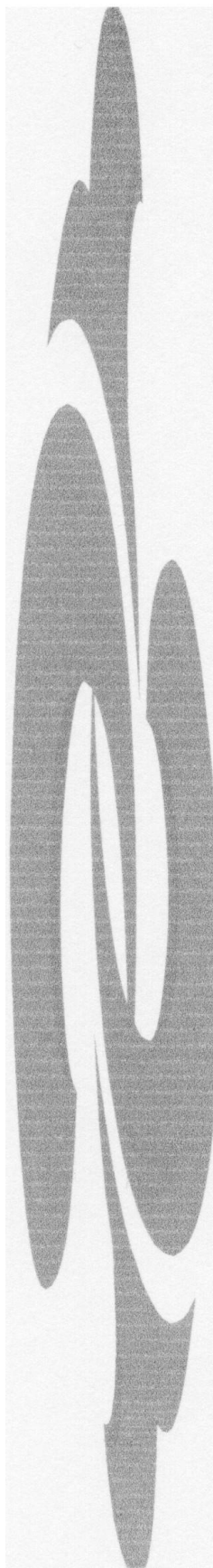
Segundo NIEMAN (2000), há uma relação extensa entre perturbação na contagem de células sanguíneas brancas com exercício de resistência de alta intensidade e prolongado (aumento na contagem de granulócitos e monócitos, declínio no número de linfócitos e aumento na relação neutrófilos/linfócitos). Para tanto, muitos mecanismos estão envolvidos, incluindo o hormônio do estresse no exercício e concentração de citocinas, mudanças na temperatura corporal, aumento do fluxo sanguíneo e apoptose de linfócitos.

Exercícios que induzem a injúria da célula muscular causa uma sequência de liberação de citocinas pró-inflamatórias, como : $\text{TNF-}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$ E IL-6 , seguida muito pouco por citocinas anti-inflamatórias, como IL-10 e IL-1 (GANNON et al., 1997). $\text{TNF-}\alpha$ e $\text{IL-1}\beta$ estimulam a produção de IL-6 , o que induz a fase aguda da resposta inflamatória (BRUUNSGAARD et al., 1997; NIEMAN, 2000).

Alguns estudos já demonstraram que o dano do músculo esquelético devido ao exercício físico leva à produção de citocinas inflamatórias (BRUUNSGAARD et al., 1997; OSTROWSKI et al., 1998; COLBERT et al., 2001).

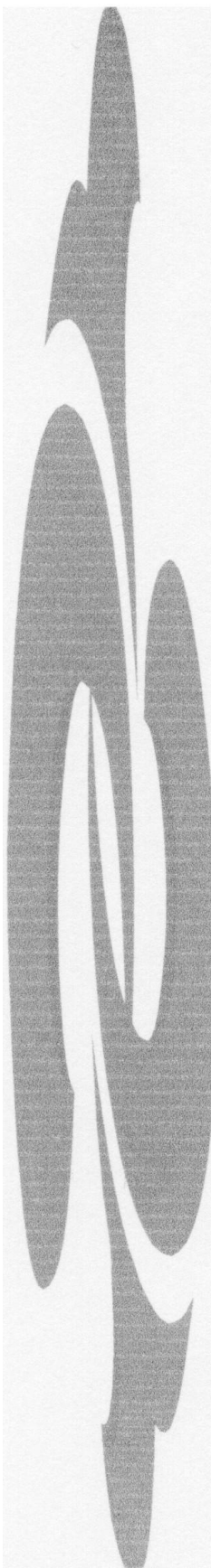
Estudos sobre maratonistas e outros atletas que praticam atividade física de resistência, indicam que o treino prolongado e intensivo causa inúmeras alterações na imunidade e quando combinado com outros fatores de estresse, aumenta o risco de infecção das vias aéreas superiores. Dentre os estresses fisiológicos, pode-se mencionar o aumento de citocinas pró e anti-inflamatórias, como IL-6, IL-1, IL-10 e IL-8, aumento de granulócitos, monócitos e macrófagos inflamatórios (NIEMAN, 2007).

Em vista da escassez de trabalhos sobre a atividade física e seus efeitos radioprotetores, tal estudo justificou-se pela necessidade de esclarecer se a atividade física minimiza as complicações da radioterapia torácica. Portanto, o estudo em questão relacionou a atividade física aeróbia de ratos da raça *Wistar* ao possível incremento do condicionamento cardiopulmonar, a fim de verificar a potencial diminuição da injúria pulmonar pós-irradiação.



2- OBJETIVOS

Este estudo teve como objetivos verificar se a atividade física pré-radioterapia possui elementos radioprotetores, além de mensurar a ativação radioinduzida de citocinas pró-inflamatórias como IL-6, TNF- α , TGF- β e IKK através da técnica de *Western Blotting*.



3- MATERIAIS E MÉTODO

Animais

Após a aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), cujo número de protocolo é 1349-1 (anexo 1), foi realizado um estudo experimental na Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, com 28 ratos da linhagem *Wistar-Hannover*, machos, idade média de 90 dias e peso de aproximadamente 200 gramas (g). Os animais tiveram procedência do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na Área da Ciência em Animais de Laboratório (CEMIB) - UNICAMP e foram mantidos no Biotério das Faculdades Associadas de Ensino (UNIFAE) – São João da Boa Vista / São Paulo, em número de 5 por gaiola, em cama tipo maravalha, com água filtrada e clorada *ad libitum*, recebendo ração industrial *Biobase*[®], 3 vezes ao dia.

Os animais foram randomizados em três grupos, sendo que o primeiro foi o grupo controle (GI) com 4 animais.

O grupo GII foi subdividido em subgrupo GIIa, que foi submetido à irradiação e foi sacrificado no 1º dia pós-radioterapia (6 animais) e subgrupo GIIb, que foi submetido à irradiação e foi sacrificado no 7º dia pós-radioterapia (6 animais).

O grupo GIII foi subdividido em subgrupo GIIIa, que realizou atividade física aeróbia antecedente à irradiação e foi sacrificado no 1º dia pós-radioterapia (6 animais) e subgrupo GIIIb, que realizou atividade física aeróbia antecedente à irradiação e foi sacrificado no 7º dia pós-radioterapia (6 animais).

Atividade Física

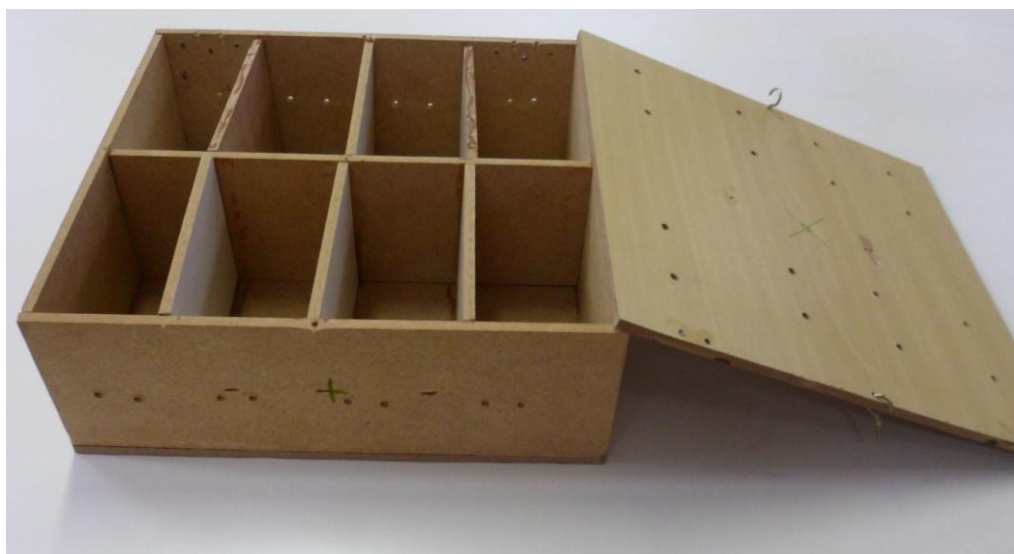
Os animais do GIII foram submetidos à natação durante 8 semanas, divididas em 3 sessões cada, carga zero, com duração de 30 minutos cada sessão na semana inicial, progredindo 2 minutos a cada semana, sendo que a última totalizou 44 minutos. Os animais, em número de 6, permaneceram em tanques de vidro, com 120 x 60 x 120 centímetros (cm) - comprimento, largura e altura, respectivamente - de dimensão, e contendo água da rede de abastecimento do Biotério do Centro Universitário das Faculdades de Ensino (UNIFAE), em temperatura ambiente. A foto dos animais realizando natação pode ser visualizada na figura 1.



Figura 1: Animais do estudo realizando natação.

Irradiação

Após o treinamento físico dos animais do grupo GIII, e, juntamente com os animais do grupo GII, foram submetidos à radiação gama em aparelho de telecobaltoterapia, da marca Alcyon II[®], com energia de 1,25 MeV, contendo fonte de ⁶⁰Co com rendimento de 67,77 cGy/min (centigray por minuto), em campo de 10 x 10 cm, à distância de 80 cm da fonte, utilizada irradiação isocêntrica. Na ocasião da exposição à radiação, os animais foram colocados em caixa de madeira de 10 x 10 x 10 cm (altura, comprimento e profundidade, respectivamente), com tampa também de madeira e divisões internas que possibilitaram a imobilização dos mesmos e, portanto, sem a necessidade de anestesia. A visualização da caixa de madeira pode ser observada na figura 2. Foram irradiados com a dose de 3,5 Gy em corpo inteiro, calculado em todo volume corporal, com a técnica de paralelo oposto, num campo de 10 x 10 cm, com distância fonte-superfície de 75 cm e distância fonte-ponto de cálculo de 80 cm.



Figuras 2: Caixa de madeira para irradiação dos animais.

Western Blotting

Após a irradiação, todos os animais foram sacrificados por overdose de pentobarbital, de acordo com o tempo para a análise das citocinas: no período de 1 dia (GI, n=2; GIIa, n=6 e GIIIa, n=6) ou 7 dias (GI, n=2; GIIb, n=6 e GIIIb, n=6), e os pulmões foram retirados. Foram utilizados como amostra os lobos inferiores pulmonares direitos de todos os animais e estes foram conservados em refrigeração a -80°C para análise imunohistoquímica das respectivas citocinas pró-inflamatórias: IL-6, TGF- β e TNF- α e IKK β .

Extração de Tecido e Análise Protéica por Immunoblotting:

Os fragmentos pulmonares dos ratos com e sem radioterapia foram homogeneizados em tampão de extração, com um polytron PTA 20S (*Brinkmann Instruments* modelo PT 10/35). Este tampão é composto de Triton-X 100 1%, TRIS (PH 7,4) 100mM, pirofosfato de sódio 100mM, fluoreto de sódio 100mM, EDTA 10mM, ortovanadato de sódio 10mM, PMSF 2mM e aprotinina 0,1mg/ml, a 4°C .

As amostras foram submetidas à centrifugação (12.000 rpm a 4°C por 20 minutos) para a remoção do material insolúvel. A concentração protéica das referidas amostras foi determinada através de leitura por espectrofotômetro.

As amostras obtidas, receberam tampão contendo DTT 100mM e aquecidos em água fervente por 5 minutos, foram submetidas a eletroforese gel de poliacrilamida (SDS-PAGE 6,5%), tendo sido o gel balizado por marcador de alto peso molecular da *Bio Rad*[®] (Califórnia, EUA) que contém: miosina (206 kDa), β -galactosidase (116 kDa), albumina de soro bovino (80 kDa) e ovalbumina (49,5 kDa). A eletroforese foi realizada em cuba de minigel da *Bio Rad*[®], com solução tampão para eletroforese previamente diluída. O SDS-PAGE sempre submetido a 20 volts inicialmente até a passagem pela fase de empilhamento (*stacking*) e 100 volts até o final do gel de resolução (*resolving*).

A transferência das proteínas separadas no gel foi feita eletricamente para uma membrana de nitrocelulose, através de um aparelho também da *Bio Rad*[®] por 90 minutos a 120 volts.

As membranas com as proteínas transferidas foram incubadas em solução bloqueadora (leite desnatado Molico[®] (São Paulo, Brasil) 5%, Tris 10mM, NaCl 150mM e Tween 20 0,02%) por duas horas à temperatura ambiente. Após lavadas em solução basal, estas membranas foram então incubadas com anticorpos específicos. Mantidas a 4°C *overnight* sob agitação contínua, as membranas foram, outra vez, lavadas com solução basal. A seguir, as membranas foram incubadas com 60 µl de proteína A marcada com ¹²⁵I durante duas horas à temperatura ambiente e lavadas novamente.

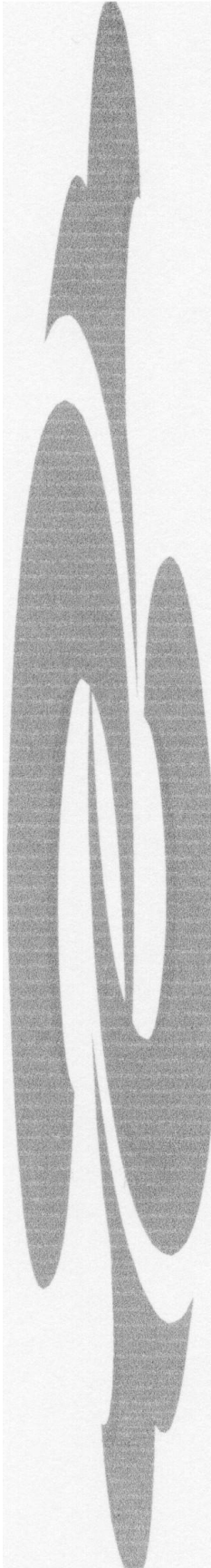
A proteína A marcada com iodo radioativo se liga aos anticorpos e pode ser detectada e visualizada em autoradiografias usando intensificadores, e mantidos a -80°C por 12 a 48 horas. Os anticorpos específicos deste estudo foram obtidos através do Fundo de Apoio ao Ensino, à Pesquisa e à Extensão (FAEPEX)-UNICAMP.

Uma vez identificadas as bandas das autoradiografias procedeu-se à leitura por densitometria óptica. A partir de então foi realizada a análise dos dados, comparando-se o tecido do animal controle com o outro em experimento de maneira que sempre houve controle intra-experimento. Os resultados foram descritos como variação percentual dos diferentes grupos.

Análise estatística

Todos os dados numéricos foram expressos como médias + SEM do número indicado de experimentos. Os resultados dos *blots* foram expressos como comparações diretas das bandas ou *spots* em autorradiografias e quantificados

por densitometria óptica (*Scion Image*). A análise estatística foi realizada através do teste de ANOVA com *Bonferroni post test*. Em todos os procedimentos estatísticos, o nível de significância foi pré-fixado em $p < 0,05$.



4- RESULTADOS

Para todas as citocinas estudadas, não ocorreu diferença significativa entre os grupos GIIa e GIIIa, ou seja, no primeiro dia pós-irradiação, em relação ao grupo GI (controle).

Em relação à IKK β , houve maior expressão de tal proteína no GIIb, seguido do GIIIb. Houve significância estatística ($p < 0,05$) do GIIb em relação ao GI, assim como do GIIIb em relação ao GI e também do GIIIb em relação ao GIIb. Isso significa que a IKK β apresentou uma resposta maior no 7º dia pós-irradiação, independente da atividade física ou não, em relação ao 1º dia. Contudo, a elevação da IKK β no 7º dia pós-irradiação no GIIIb, foi significativamente menor em relação ao grupo GIIb. O registro da expressão tecidual de IKK β estudada pode ser vista na figura 3.

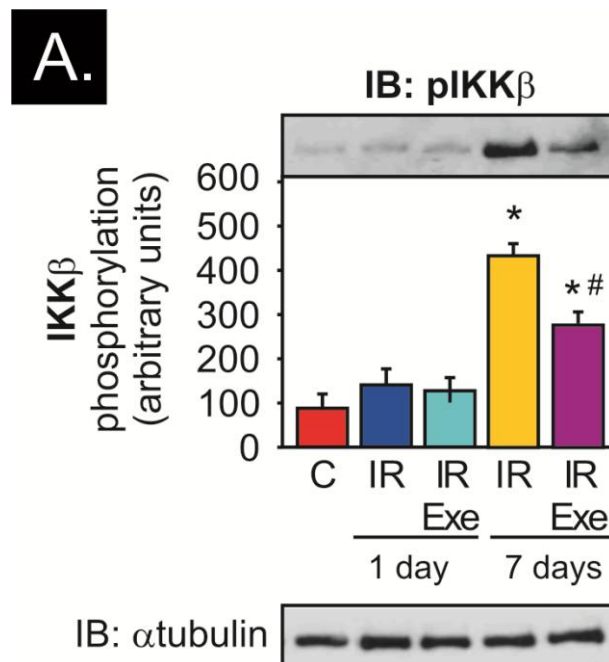


Figura 3: (A) *Imunoblotting* de pIKK β . C: grupo controle (GI). 1º dia: IR: sacrifício do grupo que realizou somente irradiação (GIIa) e IR Exe: sacrifício do grupo que realizou irradiação e atividade física (GIIIa). 7º dia: IR: sacrifício do grupo que

realizou somente irradiação (GIIb) e IR Exe: sacrifício do grupo que realizou irradiação e atividade física (GIIIb). * $p < 0,05$ versus GI. # $p < 0,05$ versus GIIb.

Em relação ao TNF- α , a expressão de tal proteína apresentou o mesmo comportamento da citocina IKK β , ou seja, a expressão de TNF- α no GIIb e GIIIb tiveram significância estatística semelhantes tanto em relação ao GI quanto ao GIIb. O registro da expressão tecidual de TNF- α estudada pode ser vista na figura 4.

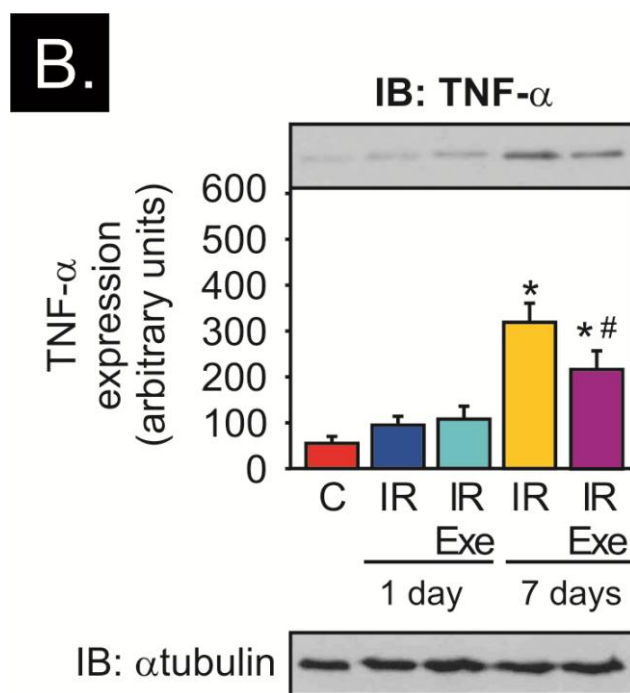


Figura 4: (B) *Imunoblotting* de TNF- α . C: grupo controle (GI). 1º dia: IR: sacrifício do grupo que realizou somente irradiação (GIIa) e IR Exe: sacrifício do grupo que realizou irradiação e atividade física (GIIIa). 7º dia: IR: sacrifício do grupo que realizou somente irradiação (GIIb) e IR Exe: sacrifício do grupo que realizou irradiação e atividade física (GIIIb). * $p < 0,05$ versus GI. # $p < 0,05$ versus GIIb.

Em relação à IL-6, houve significância estatística ($p < 0,05$) do GIIb em relação ao GI, assim como do GIIIb em relação ao GIIb. Isso significa que houve expressão maior estatisticamente significante de IL-6 no 7º dia pós-irradiação, além do grupo que só realizou irradiação em relação ao grupo controle, como do grupo do 7º dia que realizou irradiação+atividade física em relação ao grupo do 7º dia pós-irradiação somente. O registro da expressão tecidual de IL-6 estudada pode ser vista na figura 5.

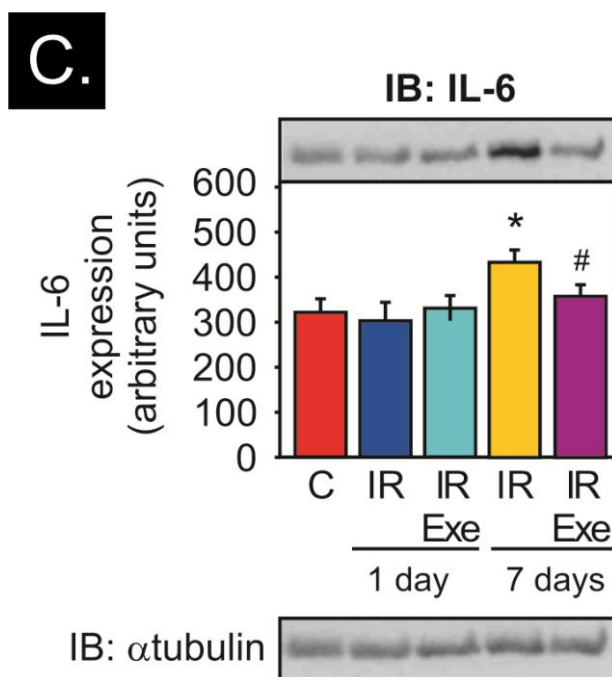


Figura 5: (C) *Imunoblotting* de IL-6. C: grupo controle (GI). 1º dia: IR: sacrifício do grupo que realizou somente irradiação (GIIa) e IR Exe: sacrifício do grupo que realizou irradiação e atividade física (GIIIa). 7º dia: IR: sacrifício do grupo que realizou somente irradiação (GIIb) e IR Exe: sacrifício do grupo que realizou irradiação e atividade física (GIIIb). * $p < 0,05$ versus GI. # $p < 0,05$ versus GIIb.

Em relação ao TGF- β , houve significância estatística do GIIb e GIIIb em relação ao GI, porém não houve significância estatística entre os grupos GIIb e GIIIb ou seja, não houve diferença entre eles como ocorreu com as demais proteínas. O registro da expressão tecidual de TGF- β estudada pode ser vista na figura 6.

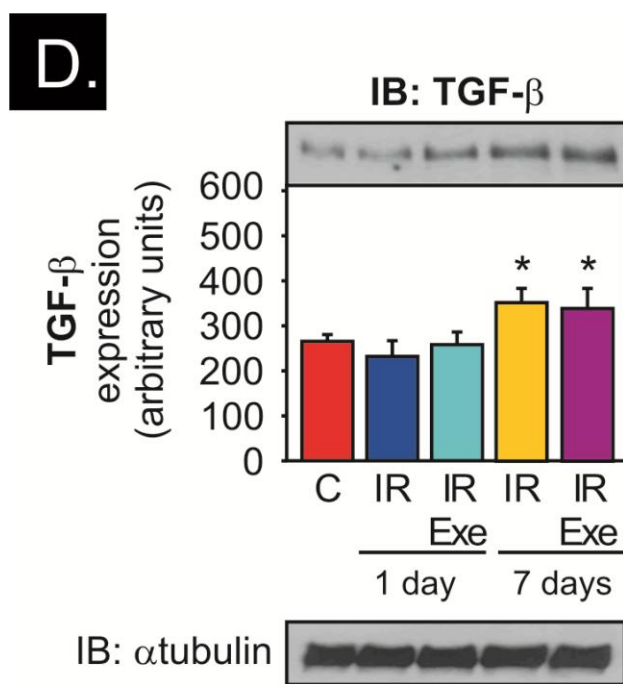
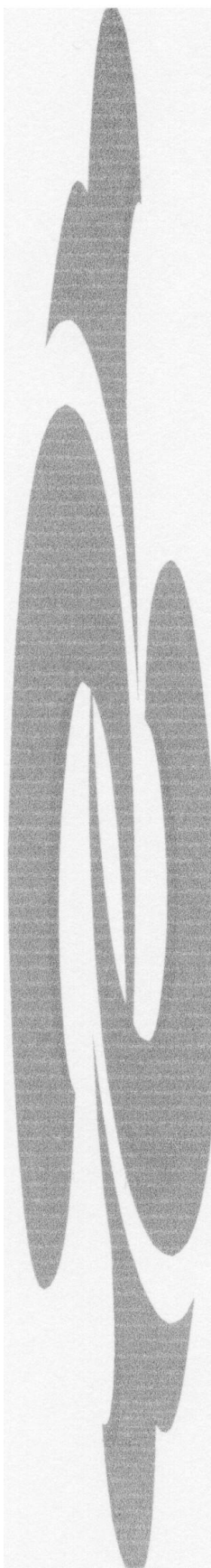


Figura 6: (D) *Imunoblotting* de TGF- β . C: grupo controle (GI). 1º dia: IR: sacrifício do grupo que realizou somente irradiação (GIIa) e IR Exe: sacrifício do grupo que realizou irradiação e atividade física (GIIIa). 7º dia: IR: sacrifício do grupo que realizou somente irradiação (GIIb) e IR Exe: sacrifício do grupo que realizou irradiação e atividade física (GIIIb). * $p < 0,05$ versus GI. # $p < 0,05$ versus GIIb.



5- *DISCUSSÃO*

De acordo com DI FIORE et al. (2006) e TRIBOULET e MARIETTE (2006), pacientes com carcinoma esofágico avançado devem ter a terapia combinada a fim de prolongar o tempo de sobrevida. HERMANN et al. (2006) concluíram que a RQT neoadjuvante pode regredir o estágio clínico do tumor e aumentar a taxa de ressecção. Outros estudos mostraram que a RQT melhora a qualidade de vida pós-operatória e prolonga o tempo de sobrevida, mas também aumenta o risco de complicação e mortalidade em médio prazo (PEDRAZZANI et al., 2005; CAGOL et al., 2006). Esofagite que ocorre em menos de 90 dias após o início do tratamento, é um efeito colateral comum dos pacientes submetidos à radioterapia para tumores torácicos (WERNER-WASIK et al., 2010).

O aumento da expressão das citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IL-6 foi semelhante em relação à irradiação e ao exercício físico, com sacrifício no 7º dia pós-irradiação, bem como IKK β . Tal aumento da expressão foi menor em todas as citocinas, incluindo TGF- β , em relação aos grupos que também realizaram atividade física no 7º dia pós-irradiação. IKK β seguiu o mesmo comportamento. RÜBE et al. (2002), em estudo semelhante, diante da exposição de ratos à 12 Gy de irradiação, constatou aumento significativo radioinduzido de TNF- α no 1º pós-irradiação, diferentemente do nosso estudo. Deve ser levada em consideração a alta dose de irradiação aplicada aos animais, que possuíam cerca de 20 g de peso.

Os resultados de IL-6 sugerem correlação entre o desenvolvimento de pneumonite pós-irradiação e o aumento de IL-6 no pulmão, já que a inflamação torna-se progressivamente acentuada em alguns dias pós-injúria pulmonar e uma vez que a IL-6 é sintetizada por uma variedade de células no parênquima pulmonar, incluindo os macrófagos alveolares, pneumócitos do tipo II, linfócitos T e fibroblastos pulmonares (ARNOLD et al., 1994). Apesar da pneumonite pós-irradiação, CHEN et al. (2001), relataram a exclusão de muitas evidências

contidas em vários estudos sobre tal injúria pulmonar, reportadas entre 45 e 75% dos casos.

O aumento da expressão de TGF- β só teve significância estatística dos grupos de 7º dia pós-irradiação em relação ao grupo controle. Isso talvez possa ser justificado pelo fato do TGF- β participar do processo de fibrose, que ocorre numa fase mais tardia (além de sete dias) da reparação tissular. FU et al. (2001) em estudo, concluíram que elevação dos níveis plasmáticos de TGF- β 1 ao final da radioterapia em humanos é um fator de risco independente para injúria pulmonar.

Acredita-se que expressão anormal de TGF- β 1 desempenha um importante papel na patogênese de várias doenças inflamatórias crônicas e imunológicas pulmonares, incluindo asma, doença pulmonar obstrutiva crônica e fibrose pulmonar. Também é sabido que TGF- β , composta de três isoformas (TGF- β 1, - β 2 e - β 3) é uma citocina multifuncional que participa de inúmeros processos biológicos, incluindo a proliferação celular, diferenciação, modulação imune e produção de matriz extracelular (LEE et al., 2006b). Além disso, expressão de TGF- β 1 pode ser induzida por citocinas pró-inflamatórias como IL-1 e TNF- α . Além do mais, TGF- β , especialmente a isoforma TGF- β 1, é um importante estimulador fibrótico na fibrose pulmonar. Tal fibrose representa uma desordem no pulmão e nenhum tratamento efetivo foi avaliado até então. Apesar de muitos mecanismos moleculares da fibrose pulmonar permanecerem parcialmente esclarecidos, síntese aumentada e deposição de matriz extracelular são categoricamente confirmadas por diversos autores em desempenharem um importante aspecto patológico neste quadro pulmonar (CHEN et al., 2009). Além disso, fibrose por radiação pode causar óbito, porém geralmente em aqueles indivíduos que não têm reserva funcional pulmonar (KONG et al., 2008).

RÜBE et al. (2000) realizaram um estudo com o objetivo de avaliar os efeitos agudos e tardios da radiação na expressão gênica do TGF- β num modelo

de injúria pulmonar por fibrose, em ratos C57BL-6 (com oito semanas de idade e 20 g. Para tanto, esses animais foram irradiados no tórax com seis e 12 Gy, respectivamente. O tecido pulmonar dos diferentes ratos por dosagem e tempo pós-irradiação foi analisado através de uma combinação das técnicas de reação em cadeia pela polimerase, imunohistoquímica e microscopia óptica. Após a radiação torácica de 12 Gy de dose única, a radioindução de TGF- β no tecido pulmonar apareceu nas primeiras horas (uma, três e seis horas pós-irradiação) e alcançou sua maior expressão após 12 horas; subsequentemente (48, 72 horas e uma semana pós-irradiação), a expressão de TGF- β declinou em níveis basais. No começo da fase aguda (pneumonite), a estimulação radioinduzida de TGF- β alcançou os máximos valores de duas a quatro semanas. Neste período, os pneumócitos do tipo II e fibroblastos serviram como importante base para a expressão gênica de TGF- β . Concluiu-se que houve um aumento da expressão de TGF- β no tecido pulmonar de maneira aguda e duradoura, após a radiação torácica com 12 Gy. A localização predominante de TGF- β em áreas de infiltrados pulmonares com fibrose sugere o envolvimento desta citocina na patogênese de fibrose pulmonar radioinduzida. Porém, mais estudos são necessários acerca do papel de outras citocinas no desenvolvimento de injúria por radiação.

MATTOS et al. (2002) também realizaram um estudo a fim de investigar no pulmão, através do teste imunoenzimático, a localização das proteínas TGF- β 1 latente e TGF- β ativa, se ocorre ativação radioinduzida da proteína TGF- β 1 latente e a distribuição das fibras colágenas em diversos períodos de tempo após irradiação. Para tanto, fizeram parte da pesquisa 32 camundongos isogênicos (C57BL), os quais foram divididos em dois grupos. GI (não-irradiado) com 12 animais e GII (irradiado), com 20 animais. GII recebeu radiação gama através da telecobaltoterapia – ^{60}Co , com rendimento de 0,97 Gy/minuto, dose única de 7 Gy em corpo inteiro. Os animais do GI e GII foram sacrificados por estiramento cervical nos períodos de 1, 14, 30 e 90 dias após irradiação. Os pulmões

irradiados apresentaram: congestão vascular e espessamento dos septos alveolares aos 30 dias e mais intensamente aos 90 dias depois da irradiação; aumento significativo da deposição de colágeno em todos os períodos de tempo após irradiação; e ativação da proteína TGF- β 1 latente em um dia e intensa aos 14 dias depois da irradiação em brônquios e alvéolos. Esses resultados sugeriram que células dos brônquios e alvéolos podem participar do complexo mecanismo de fibrose pulmonar radioinduzida atuando com fontes da proteína TGF- β 1 ativa.

Tal estudo acima descrito corrobora o de diversos autores, segundo MATTOS et al. (2002). Em culturas de fibroblastos e pneumócitos, a irradiação induziu a síntese de TGF- β 1 nestas células, segundo SMITH et al. (1967). Estudos *in vivo*, em pulmões de camundongos irradiados, mostraram a imunoexpressão da proteína TGF- β 1 ativa em fibroblastos próximos a regiões que apresentavam lesões fibróticas (FRANKO et al., 1997) e em pneumócitos tipo II (RÜBE et al., 2000). No entanto, esses trabalhos não estudaram especificamente a ativação *in situ* da proteína TGF- β 1 em pulmão. O esclarecimento desses aspectos histopatológicos é crítico, especialmente quando se planeja desenvolver estratégias para evitar ou mesmo tratar a fibrose pulmonar radioinduzida. Uma possível estratégia é o uso de drogas antioxidantes, uma vez que a literatura mostra que a proteína TGF- β 1 ativa induz a liberação do peróxido de hidrogênio de fibroblastos do pulmão humano (THANNICKAL e FANBURG, 1995). Mostra também que o aumento da oxidação intracelular induzida pelo TGF- β 1 é abolido após o uso de drogas antioxidantes (OHBA et al., 1994).

ANSCHER et al. (2006), realizaram um estudo com o objetivo de determinar se a neutralização de TGF- β através de anticorpo anti-TGF- β 1 pode prevenir a lesão pulmonar induzida pela irradiação. Para tanto, 344 ratos da raça *Fischer* fizeram parte da amostra, estratificados em um grupo controle, um grupo com irradiação, um grupo com irradiação + 0,1 mililitro por quilograma (ml/kg) de anti-TGF- β anticorpo 1D11 e outro grupo com irradiação + 1,0 ml/kg de anti-TGF-

β anticorpo 1D11. Os animais receberam doses de 8 Gy por dia durante cinco dias consecutivos no hemitórax direito através do aparelho *Therapax 320*[®] e o anticorpo foi administrado intraperitonealmente após a última fração de irradiação. Após seis semanas da irradiação, através de histopatologia e imunohistoquímica, foi constatado uma significativa redução do acúmulo de macrófagos e espessura da parede alveolar nos animais que receberam uma maior dose de anticorpo. Concluiu-se que a administração de uma dose única de 1 ml/kg do anticorpo resulta em um decréscimo das mudanças morfológicas, resposta inflamatória, e redução da expressão e ativação de TGF- β seis semanas e seis meses após 40 Gy no hemitórax direito. O foco no mecanismo que o TGF- β desencadeia pode ser uma estratégia interessante para prevenir lesão pulmonar radioinduzida.

Não houve diferença estatisticamente significativa na expressão das citocinas mensuradas no trabalho no 1º dia pós-irradiação. Tal fato talvez possa ser justificado devido ao curto período para a mudança da expressão de tais proteínas, as quais tornam-se alteradas quantitativamente num período maior que 24 horas, principalmente o TGF- β , além da dose de irradiação não ter sido significativamente alta. Esses achados são semelhantes aos de MATTOS et al. (2002) e contrariam outros, como o de RÜBE et al. (2002).

A literatura demonstra inúmeros estudos a respeito da atividade física. Entretanto, poucos deles correlacionam os benefícios da prática física aos efeitos deletérios pulmonares e sistêmicos da radioterapia.

SRIWIJITKAMOL et al. (2007), já demonstraram que a atividade física aguda em experimentos com humanos se mostrou eficiente no bloqueio da via IKK/NF κ B. Além disso, este bloqueio impede que NF κ B inicie a transcrição de proteínas pró-inflamatórias, como TNF- α . No nosso estudo houve resultado semelhante em relação à IKK β no 7º dia pós-irradiação, com evidência do aumento menor da sua expressão, quando realizada atividade física, mesmo que de forma crônica.

OLIVEIRA et al. (2011), em estudo, tiveram como um dos objetivos verificar os efeitos dos exercícios agudos e crônicos na sensibilidade à insulina em ratos obesos. O protocolo de exercício crônico incluiu natação por oito semanas, com aumento progressivo da carga acima de cinco por cento do peso corporal. No nosso estudo houve o objetivo, principalmente, de melhorar a condição cardiorrespiratória. Por isso não foram utilizadas cargas progressivas. Além disso, deve ser feita uma analogia do treino dos animais aos pacientes debilitados com tumor torácico, referente ao propósito do estudo em questão. Alguns estudos também mostram que a relação dos efeitos da atividade física com sobrecarga e um período curto de recuperação sobre as citocinas pró-inflamatórias ainda é desconhecida (LIRA et al., 2010).

Especula-se que a atividade física possa ter contribuído, neste estudo, de maneira significativa para que houvesse o aumento das citocinas TNF- α , IKK β e IL-6 no pulmão, como resposta do condicionamento físico aeróbio e adaptação pulmonar à nova condição ventilatória.

Em estudo recente realizado por ROPELLE et al. (2010), foi demonstrado que a atividade física suprime o excesso de apetite e a ativação hipotalâmica de IKK β /Nf-kappaB por um mecanismo dependente da citocina pró-inflamatória IL-6. O excesso de ingesta alimentar induz a ativação hipotalâmica de IKK β e o estresse do retículo endoplasmático, levando à resistência central de insulina e leptina, excesso de apetite e obesidade. A atividade física realizada em modelo experimental com ratos C3H/HeJ, aumentou a resposta central anti-inflamatória, com incremento da expressão de IL-6 e IL-10. Foi postulado que há redução da ativação hipotalâmica de IKK β e do estresse do retículo endoplasmático, restaurando a produção de insulina e leptina e reorganizando o balanço nutricional.

Em relação à resposta imunológica adaptativa, foi realizado um estudo comparativo da resposta de linfócitos em 16 indivíduos do sexo masculino não-

treinados e 15 ciclistas de elite do sexo masculino, durante períodos de baixa e alta intensidade de treinamento. Não houve significância estatística em ambos os grupos durante os exercícios de baixa intensidade. Entretanto, durante o período de alta intensidade de treinamento, a resposta proliferativa de linfócitos aumentou cerca de 35-50% nos atletas de resistência (BAJ et al., 1994). Na comparação de outro estudo, entretanto, não houve diferença na resposta proliferativa de linfócitos entre o grupo controle e ciclistas de elite durante períodos tanto de baixa quanto de alta intensidade (TVEDE et al., 1991).

Segundo COLBERT et al. (2001), muitas pesquisas têm examinado os efeitos do exercício na circulação sanguínea em humanos, quantificando as citocinas inflamatórias. Tipicamente, a concentração de IL-1 β plasmática não tende a aumentar com o exercício. Porém exercício prolongado ou de alta intensidade tem aumentado a concentração plasmática de TNF- α e IL-6, com picos atingidos até 2 horas pós-exercício. Em particular, outros estudos já demonstraram associação entre exercício excêntrico e de exaustão e indução de IL-6. (BRUUNSGAARD et al., 1997; OSTROWSKI et al., 1998). Estudos envolvendo exercícios moderados têm gerado conflito, sugerindo que a resposta inflamatória é dependente de outras variáveis (SMITH et al., 1992; ULLUM et al., 1994).

Apesar de muitas citocinas inflamatórias serem avaliadas através da circulação, a expressão dessas proteínas nos tecidos necessita de mais estudos, sobretudo nos exercícios físicos de baixa intensidade. Além disso, especulam-se outras potenciais vias de produção de citocinas em resposta a esta prática, que não estão diretamente associadas ao dano muscular esquelético (COLBERT et al., 2001).

Segundo NIEMAN (2000), exercícios que induzem a injúria da célula muscular causam uma sequência de liberação de citocinas pró-inflamatórias com TNF- α , IL-1 β e IL-6, seguida de maneira muito próxima de citocinas anti-

inflamatórias, como IL-10. Trabalhos mais recentes, usando biópsias musculares e amostras de urina, têm mostrado claramente a ligação íntima entre essas citocinas, postulando que as citocinas inflamatórias ajudam a regular a migração rápida em neutrófilos e posteriormente de monócitos, em áreas injuriadas das células musculares e outros tecidos metabolicamente ativos, a fim de iniciar a reparação (BELCASTRO, et al. 1996). Exercício de resistência associado à lesão muscular induz a resposta inflamatórias maior (NIEMAN, 2000).

De acordo com FONG et al. (2008), a IKK- α é considerada da família da IKK- β e limita a inflamação durante a infecção e choque séptico, pela regulação da magnitude e duração da ativação de NF-kappaB. Afirmando que apesar disso, ainda é necessário muito a aprender sobre as regras relativas e específicas para IKK- α e IKK- β na inflamação e imunidade.

LI et al. (2009), baseado parcialmente em resultados otimistas de alguns modelos pré-clínicos, tiveram o interesse de estudar a inibição terapêutica do NF-kappaB para limitar a injúria inflamatória durante a sepse. Para tanto, utilizaram um modelo de sepse em ratos. Como o NF-kappaB também regula as respostas protetoras, a sua condição de fator preditivo como inibidor para os efeitos de sobrevivência pode ser difícil. Concluíram que a inibição de tal proteína promete conter as condições inflamatórias como sepse, porém é necessário cuidado, pois os efeitos desta inibição devem ser elucidados antes da descoberta do motivo da sepse.

Baseado nesses fatos, BARTHELEMY-BRICHANT et al. (2004) desenvolveram um estudo com tumor pulmonar, a fim de avaliar os efeitos da radioterapia torácica nas concentrações de TGF- β e IL-6 no fluido de lavado broncoalveolar. Onze pacientes fizeram parte deste estudo e o lavado broncoalveolar foi colhido bilateralmente durante 13 e seis meses após radioterapia (doses maiores que 20 Gy – V20 ou 30 Gy – V30). Observaram aumento da concentração de TGF- β e IL-6 neste lavado (principalmente no 6º

mês) daqueles pacientes cujas áreas pulmonares irradiadas demonstraram que estas citocinas podem contribuir para o processo de resposta à irradiação no tecido pulmonar humano.

A utilização dos métodos de imunohistoquímica e bioquímica para a avaliação das citocinas pró-inflamatórias pulmonares tem sido usada há muito com sucesso (ESCOTTE et al., 2003; RABBANI et al., 2005; LEE et al., 2006b; FENG et al., 2008; KIM et al., 2008; ZHAO et al., 2008; CHEN et al., 2009; KIM et al., 2009; CHEN et al., 2010; MOON et al., 2010). Em alguns outros estudos, a utilização do sangue periférico para a avaliação da expressão de tais citocinas não se mostrou eficaz, como, por exemplo, o estudo realizado por MORITA et al. (2008), onde foi analisado no pós-operatório de esofagectomia por CE, citocinas pró-inflamatórias pulmonares (IL-6, IL-8 e TNF- α) no sangue periférico e derrame pleural (até 3 dias pós-operatório). Tais citocinas não foram significantes no sangue e tiveram expressão maior, cerca de 100 vezes, no derrame pleural. Estes achados são compatíveis com outros estudos, como os resultados mostrados por SAKAMOTO et al. (1994).

No nosso estudo, foi utilizada a cobaltoterapia para a realização da radioterapia. Pelo fato de tratar-se de animais de pequeno porte e a necessidade de irradiar tecidos não muito profundos, o ^{60}Co mostra-se mais indicado que a utilização da máquina de acelerador linear.

Estudos mostram que a simplicidade das unidades de cobalto lhes oferece a vantagem da manutenção simples, reduzida e de baixo custo, quando comparado com os aceleradores lineares (ADAMS e WARRINGTON, 2008).

Com o avanço das técnicas de tratamento em radioterapia, há uma tendência ao desenvolvimento de equipamentos cada vez mais caros e dispendiosos. O uso da radioterapia por cobalto é atualmente rotina na maioria dos centros. O equipamento de acelerador linear é utilizado como

complementação a fim de atender as necessidades de cada indivíduo (ADAMS e WARRINGTON, 2008).

As vantagens da cobaltoterapia, como o seu custo e manutenção baixos, são bem conhecidos na comunidade de radioterapia. Ela é considerada uma das bases de cuidados de saúde, devido ser simples e econômica e, apesar de técnicas complexas estarem sendo exploradas e alguns departamentos estarem abandonando o uso da cobaltoterapia a favor destas técnicas mais sofisticadas, suas vantagens prevalecem e ainda a torna excepcional para a reabilitação (ADAMS e WARRINGTON, 2008).

A graduação da dose de radiação é frequentemente limitada pela tolerância à radiação dos tecidos normais. O parênquima pulmonar por si só é o mais importante em dose limite para radioterapia em tumores na região torácica (STROIAN et al., 2008; JIN et al., 2009). A graduação da dose, entretanto, também leva à exposição excessiva dos órgãos com maior risco, como o pulmão, coração, esôfago e medula espinhal.

Pacientes recebendo radioterapia torácica têm o risco de desenvolverem pneumonite por radiação, a qual é uma inflamação pulmonar intersticial (já comentada anteriormente na introdução da tese) que tipicamente ocorre dentro de seis meses da radioterapia (HART et al., 2008; TUCKER et al., 2010). Os casos moderados são detectados radiograficamente, sem nenhum acompanhamento dos sintomas, ao passo que evidências clínicas deste quadro envolvem tosse, febre e aumento da frequência respiratória. A limitação da incidência e severidade da radioterapia é uma meta importante no planejamento do tratamento com radioterapia torácica (TUCKER et al., 2010).

MA et al. (2010), reportam que a incidência de pneumonite varia amplamente. Dentre estes pacientes que recebem radioterapia torácica por tumores malignos nesta região, aproximadamente cinco a 30% desenvolvem

sintomas de pneumonite, 50 a 100% têm evidências radiológicas de injúria local e 50 a 90% têm perda da função pulmonar. Com isso, um dos maiores desafios é encontrar a melhor relação dose-volume pulmonar de irradiação.

A dose de irradiação em câncer de mama e esôfago (45-50 Gy) é menor do que o usado no tratamento de carcinoma pulmonar de não-pequenas células, o que diminui a incidência de pneumonite. Em tais pacientes, entretanto, os efeitos adversos da quimioterapia são mais evidentes que os efeitos da radioterapia (JIN et al., 2009).

Acredita-se que muitos fatores biológicos determinam as toxicidades intrínsecas de cada indivíduo. A radiosusceptibilidade é, em parte, geneticamente determinada com uma variação ampla mesmo após à exposição da dosimetria identificada. Por exemplo, aproximadamente 50% dos pacientes desenvolverão toxicidade se as doses pulmonares médias forem acima de 20 Gy. Muitos fatores biológicos permitirem a identificação daqueles indivíduos que não desenvolverão toxicidade mesmo se já tiverem sido expostos a altas doses pulmonares e podem ser inclusive tratados com doses mais altas a fim de melhorar os resultados (KONG et al., 2008).

Em estudo realizado por MARTEL et al. (1999), baseado no modelo de cálculo de probabilidade de controle do tumor, foi encontrado que a dose deve ser da ordem de 84 Gy para mais de 30 meses para que haja o controle da progressão local do tumor e sobrevivência. Porém, reforçam que a dose aplicada depende da tolerância do tecido pulmonar.

A toxicidade pulmonar radioinduzida limita a administração da dose máxima de radiação para os tumores torácicos. Em vista disso, ZHANG et al. (2008a) realizaram um estudo para verificar a potencial inibição do TNF- α como estratégia radioprotetora. Concluíram que a produção de TNF- α radioinduzida é

relacionada à apoptose celular precoce e dano funcional pulmonar latente, sugerindo este tipo de desenvolvimento de estratégia radioprotetora.

Em relação à dose-volume de irradiação pulmonar, NOVAKOVA-JIRESOVA et al. (2007) em estudo, concluíram que dose pulmonar baixa associada a volume alto pulmonar causa toxicidade mais precocemente que doses altas aplicadas a baixos volumes. Tal estudo é crucial para o planejamento do tratamento clínico das escalas de doses e escolhas de técnicas modernas de radioterapia. Tais conclusões também foram encontradas nos estudos de SCHALLENKAMP et al. (2007).

TERRY et al. (1988) avaliaram o risco de pneumonite após reirradiação em modelos experimentais com ratos. Após uma dose primária baixa de 6 Gy, os pulmões podiam tolerar reirradiação se eles não tivessem sido expostos à prévia irradiação. Alguma injúria discreta permaneceu até um mês após uma dose primária de 8 Gy e dano residual (na ordem de 25 a 70%) persistiu nos intervalos após uma dose primária de 10 Gy.

Dados clínicos são discutidos, mas os estudos experimentais evidenciam alguma relevância. Por exemplo, JACKSON e BALL (1987), não observaram sinais de pneumonite por irradiação em 22 pacientes com carcinoma pulmonar de não-pequenas células reirradiados com 20 e 30 Gy. NIEDER et al. (2000), em estudo, concluíram que a média de sobrevida após reirradiação pulmonar é somente cinco meses e, conseqüentemente, é um tempo muito curto para avaliar os possíveis danos neste tipo de pulmão.

Para avaliar os efeitos tardios da toxicidade pulmonar após a RQT, MOROTA et al. (2009) utilizaram 74 pacientes com carcinoma esofágico estágio I-IVB. Os pacientes receberam 60 Gy de radioterapia, em 30 frações durante oito semanas, com duas semanas de descanso. Além disso, receberam dois ciclos de quimioterapia concomitantemente. Os campos irradiados inicialmente incluíram

tumores primários, metástases de linfonodos e áreas com nódulos supraclavicular, mediastinal e celíaco. Toxicidades tardias foram avaliadas com a pontuação de morbidade de irradiação tardia da *Radiation Therapy Oncology Group / European Organization for Research and Treatment of Cancer*. A média de idade foi 67 anos. Concluíram que a terapia combinada (químio e radioterapia) usada no estudo com um campo de irradiação extenso foi aceitável para pacientes mais graves, mas não foi tolerado para pacientes acima dos 75 anos.

GHOSH et al. (2009), devido ao fato da exposição pulmonar a doses de 1-10 Gy não ser muito investigada, tiveram o objetivo de avaliar a injúria vascular seguida de irradiação torácica com doses subletais únicas em ratos. Para tanto, irradiaram o tórax de ratos com 5-10 Gy e os avaliaram três dias, duas semanas, 1,2,5 e 12 meses pós-irradiação. Muitos parâmetros pulmonares vasculares foram avaliados, incluindo densidade dos vasos, hemodinâmica, atividade da enzima conversora da angiotensina e hipertrofia ventricular discreta. Em um mês, ratos que receberam 10 Gy tiveram extravasamento vascular pulmonar, hipertrofia de ventrículo direito, aumento da resistência vascular pulmonar e diminuição da atividade da ECA, além de distensibilidade arterial. Por outro lado, ratos que foram irradiados com 5 Gy tiveram somente um aumento discreto do peso do ventrículo direito e redução da atividade da enzima conversora da angiotensina. Concluíram que houve uma deterioração significativa nos parâmetros vasculares mais de um ano após a exposição de 10 Gy, sugerindo o remodelamento da vasculatura pulmonar, porém mais estudos são necessários para determinar se a deterioração vascular pulmonar progride além de um ano após irradiação e se a recuperação dos outros parâmetros é confundida com injúria adicional como infecção.

Faz-se necessário o estabelecimento da relação entre a dose de irradiação utilizada em animais e nos humanos. Ainda existem estudos escassos acerca desta questão. (SZABO et al., 2010), em pesquisa onde ratos receberam doses mais altas (10 a 18 Gy) de radioterapia do que a utilizada no presente

estudo, foi constatado aumento da densidade pulmonar por tomografia computadorizada, além de óbito de animais após dose de 15 Gy. Não foi o intuito no presente estudo provocar debilidade orgânica ou mesmo óbito nos animais em questão, por isso a utilização de doses mais baixas (3,5 Gy). Além disso, em estudo recente realizado por JOINER et al. (2011), foi constatado mutação na expressão gênica em sangue humano em doses de até 10 Gy. Normalmente, a dose da irradiação na região torácica em humanos é cerca de 40 a 65 Gy (MOROTA et al., 2009; DÄHN et al., 2010; TERCOTI JUNIOR et al., 2011).

Em nível molecular, o processo inicial envolve ação direta de ERO no DNA, o qual causa a quebra deste DNA e rapidamente dispara a produção de citocinas, fatores de crescimento e mais ERO, culminando em hipóxia, estresse crônico oxidativo e falta de cicatrização tissular pulmonar (FLECKENSTEIN et al., 2007b; KONG et al., 2008). A progressão do dano radioinduzido é o resultado de uma ativação precoce de uma reação inflamatória, levando à expressão e manutenção de uma elevada cascata de citocinas. As citocinas inflamatórias e fibrogênicas produzidas por macrófagos, células epiteliais, pneumócitos e fibroblastos são componentes críticos para melhorar e modular os efeitos das reações inflamatórias após irradiação pulmonar e suas sequelas. As moléculas envolvidas incluem TGF- β 1, TNF- α , IL-6, entre outras. Em nível celular e tissular, a radiação danifica o epitélio (pneumócitos do tipo I e II), endotélio e fibroblastos. A patogênese do dano pulmonar por irradiação é considerado àqueles de pneumonite intersticial idiopática, a qual é regulada por fatores genéticos e fenótipos inflamatórios (GROSS e HUNNINGHAKE, 2001). Células imaturas da medula óssea têm sido mais recentemente encontradas no envolvimento da fibrose pulmonar radioinduzida (KONG et al., 2008).

De acordo com MOON et al. (2010), o rápido acúmulo de neutrófilos no pulmão induzido por estímulo pró-inflamatório encontra-se em processo central na patogênese de várias doenças pulmonares inflamatórias. Os mecanismos

envolvidos na resolução do infiltrado celular inflamatório e fibrose não são claros. Especula-se que apoptose é o maior mecanismo para a limpeza de neutrófilos dos locais de inflamação. Se isto não ocorrer de forma eficiente, instala-se necrose secundária resultando na indução da cascata pró-inflamatória. A falência de todo este processo de limpeza celular apoptótica contribui para a patogênese da injúria pulmonar, impedindo a resolução da inflamação e o reparo da integridade da reparação alveolar (HENSON et al., 2006; MOON et al., 2010). Além disso, ainda segundo MOON et al. (2010), ERO produzidas por neutrófilos ativos, macrófagos alveolares e estimulação das células epiteliais e endoteliais pulmonares desempenham o maior papel na injúria pulmonar inflamatória.

Segundo YAMASHITA et al. (2007), pneumonite por radiação é normalmente identificada em três semanas após irradiação, e, em contraste, fibrose pulmonar é normalmente um “efeito tardio”, observado três meses após irradiação. Já para MA et al. (2010), existe uma relação entre o tempo de irradiação torácica e mudanças observadas na densidade regional pulmonar. Foi constatado que incremento na densidade pulmonar após irradiação torácica envolve mais que seis meses do período inicial após tal irradiação e alcança um platô aproximadamente de seis a 12 meses pós-irradiação. Após 12 meses, começa a haver um declínio dessa densidade pulmonar. KAHAN et al. (2007), notaram aumentos transitórios na densidade de tomografias computadorizadas três meses após radioterapia que parcialmente aumentou por 12 meses após radioterapia por câncer de mama. THEUWS et al. (2000), em outro estudo, observaram aumento parcial em densidades locais entre três e 18 meses após radioterapia em linfoma e câncer de mama. Porém, segundo SKOCZYLAS et al. (2000); SEPPENWOOLDE e LEBESQUE (2001), a fibrose pulmonar que se instala após a pneumonite por irradiação continua constante um pouco mais de 10 anos.

Em estudo, MA et al. (2010) chegaram à conclusão que existe aumento na densidade pulmonar dose-dependente para pacientes submetidos à radioterapia por tumores dentro e em estruturas adjacentes ao tórax. Além disso, o uso da quimioterapia associada à radioterapia aumenta as mudanças de densidade pulmonar. Ainda segundo MA et al. (2010), em estudos de colegas, foi observado que a incidência de sintomas de pneumonite radioinduzida foram semelhantes em grupos cirúrgicos e não-cirúrgicos.

WENNBERG et al. (2002) e THEUWS et al. (1998), notaram que idade avançada também é um fator preditivo para mudança de densidade pulmonar pós-radioterapia.

Geralmente, o efeito da radiação é mais pronunciado quando quimioterapia é administrada concomitantemente. Quando existe um intervalo de tempo entre ambos, este efeito é minimizado (SEPPENWOOLDE e LEBESQUE, 2001). VON DER MAASE et al. (1986), observaram que não há interação entre essas duas terapias num tempo de intervalo maior que 28 dias. Muitos estudos têm relatado o impacto da idade na injúria pulmonar por irradiação (SEPPENWOOLDE e LEBESQUE, 2001). JENSEN et al. (1990) relataram que pacientes jovens tratados por doença de *Hodgkin* tiveram função pulmonar restrita pronunciada oito anos após o tratamento, tempo maior do que pessoas mais velhas. HARDMAN et al. (1994), entretanto, não encontraram relação entre idade e dano pulmonar. Para pneumonite por irradiação, entretanto, o risco aumenta consideravelmente com a idade (GAGLIARDI et al., 2000).

Há tempos, SHINOHARA e ARIKAWA (1972) já afirmavam que o fluxo sanguíneo diminui em regiões pulmonares irradiadas com 40 Gy, apesar do mecanismo não ser totalmente elucidado. Alterações hemodinâmicas e estruturais na vasculatura pulmonar também causam impacto na função cardíaca (GHOSH et al., 2009). Já foi demonstrado que dano cardíaco estrutural e funcional como hipertensão pulmonar são mais pronunciadas em cachorros que receberam 12 Gy

de irradiação torácica, comparada com irradiação de volumes pulmonares e cardíaco limitados (SEMENENKO et al., 2008). Além disso, também já foi provado que há uma redução significativa no fluxo sanguíneo nos pulmões irradiados quatro semanas após irradiação hemitorácica com 28 Gy (FLECKENSTEIN et al., 2007a).

Em estudo semelhante, ZHANG et al. (2008b) irradiaram o tórax inteiro de ratos (dose única) com 5 a 10 Gy e a irradiação de 10 Gy resultou em aumento da frequência respiratória e diminuição da saturação de oxigênio arterial, além do aumento protéico do lavado broncoalveolar, em quatro a 12 semanas pós-irradiação. Essas alterações não foram notadas nos ratos que receberam 5 Gy. O edema vascular foi reduzido e substituído por fibrose pulmonar 20 semanas após a exposição de irradiação de dose única de 10 Gy. Além disso, houve recuperação da função pulmonar.

Segundo NAKAMURA et al. (2008b), de acordo com estudo realizado com pacientes portadores de carcinoma pulmonar de não-pequenas células em estágio III que receberam radioterapia (associada o não à quimioterapia), nos cinco anos após tal procedimento, houve taxa de sobrevida maior aqueles pacientes com lesão no lobo superior em relação àqueles com lesão em lobo inferior pulmonar. Em pacientes com tumor primário no lobo superior, a irradiação em tecido pulmonar normal é menor, desde que um campo de irradiação menor seja estabelecido, incluindo região hilar mediastinal ou a fossa supraclavicular. Ainda segundo NAKAMURA et al. (2008b), para reduzir o risco de pneumonite por altas doses de irradiação, o volume de pulmão normal irradiado a 20 Gy (V20) ou mais, não deve ser 40% (se possível $\leq 35\%$) de todo volume pulmonar normal e não deve exceder 25% quando a radioterapia é combinada com quimioterapia.

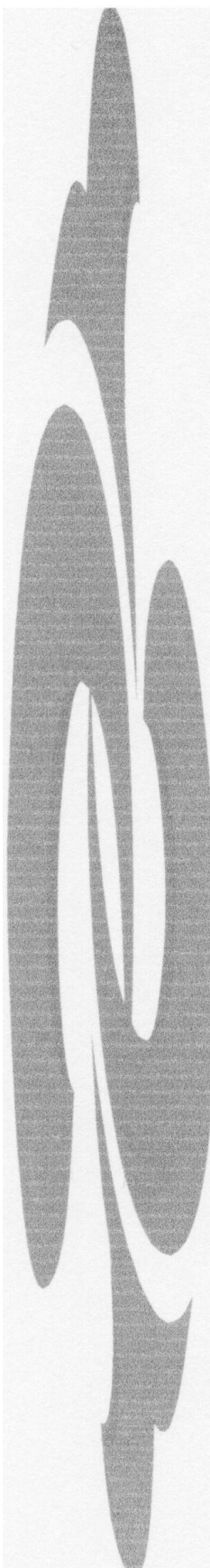
Alguns estudos selecionam a região pulmonar a ser utilizada no estudo como amostra, como por exemplo, RABBANI et al. (2005). Estes ainda afirmam que o pulmão é um dos órgãos mais radiosensíveis à radioterapia.

Conforme KOCAK et al.(2007), a região pulmonar irradiada deve ser levada em consideração como fator preditivo. Um número significativo de estudos clínicos têm demonstrado que a dose de irradiação nas regiões pulmonares inferiores está mais associada à injúria pulmonar que a dose de irradiação aplicada às regiões superiores pulmonares (SEPPENWOOLDE et al., 2004; YORKE et al., 2005). Outros estudos como o de HOPE et al. de *Washington University* e YAMADA et al. do Japão encontraram que a incidência de pneumonite é maior em pacientes com tumores de lobos inferiores (YAMADA et al., 1998; HOPE et al., 2006). Porém, KOCAK et al.(2007), em estudo, concluem que esta variável regional pulmonar merece mais investigações. Modelos preditivos alternativos que considerem tal informação podem e devem certamente ser desenvolvidos e testados. Um número de pesquisas realizadas por outros grupos não encontraram taxas diferentes de pneumonite baseadas na localização tumoral (ROBNETT et al., 2000; TSUJINO et al., 2003; FAY et al., 2005).

O diagnóstico incerto de pneumonite por irradiação pode ainda ser um fator que torna difícil a predição da injúria pulmonar radioinduzida. Em um estudo de 251 pacientes com câncer pulmonar tratado com radioterapia em Duke entre 1991 e 2003, 47-251 (19%) especulou-se ter pneumonite por irradiação e 13-47 (28%) teve o mesmo diagnóstico médico (por exemplo, possível infecção, exacerbação de doença pulmonar pré-existente, regressão/progressão tumoral, e/ou doença cardíaca) que confundiu o real diagnóstico (KOCAK et al., 2005).

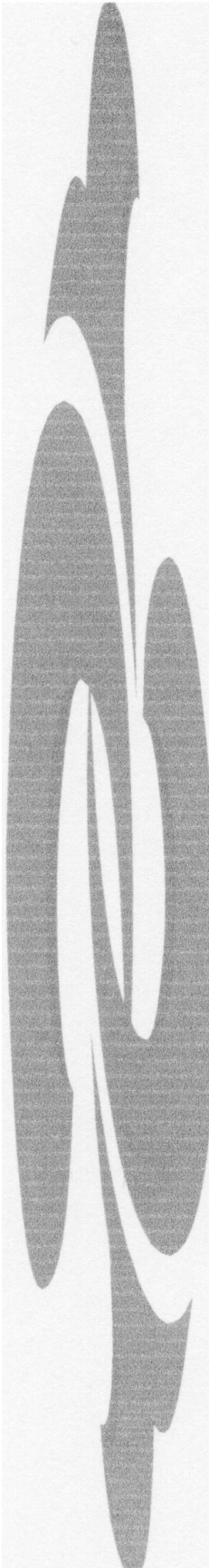
YSAYAMA et al. (2008), realizaram estudo com o objetivo de avaliar os benefícios do treinamento muscular respiratório pré-operatório em pacientes submetidos à cirurgia esofágica. Os resultados obtidos levam a crer que o condicionamento muscular respiratório pré-operatório é de suma importância na obtenção de uma melhora pulmonar, aumentando a força e resistência muscular respiratória e, conseqüentemente, uma menor permanência hospitalar deste paciente.

A fisioterapia respiratória tem sido citada como conduta que reduz a incidência de complicações pulmonares pós-operatórias de cirurgias abertas (NAKAMURA et al., 2008a). Em estudo, tais autores tiveram o objetivo de avaliar os efeitos da fisioterapia respiratória, entre outros efeitos, em pacientes que foram submetidos à esofagectomia subtotal transtorácica direita por carcinoma esofágico de células escamosas e concluíram que a fisioterapia respiratória pós-operatória desempenha um importante papel na redução de tais complicações. Ainda concluíram que, além da fisioterapia, exercícios sistêmicos também contribuíram para os resultados satisfatórios. É importante enfatizar a escassez de estudos que mencionam a importância da fisioterapia respiratória associada à esofagectomia e até mesmo a escassez de estudos em relação à injúria pulmonar causada por radioterapia (seja por CE ou pulmonar).



6- CONCLUSÃO

O presente estudo demonstrou que o aumento das respectivas citocinas inflamatórias: $\text{IKK}\beta$, $\text{TNF-}\alpha$ e IL-6 foi menor nos grupos pós-atividade física. Este fato sugere uma contribuição para menor inflamação e lesão tecidual pós-radioterapia, evidenciando que o exercício pode proteger os tecidos.



7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, E.J.; WARRINGTON, A.P. A comparison between cobalt and linear accelerator-based treatment plans for conformal and intensity-modulated radiotherapy. **Br J Radiol**, 81: 304-10, 2008.

ADELSTEIN, D.; RICE, T.; RYBICKI, L.A.; LARTO, M.A.; CIEZKI, J.; SAXTON, J.; et al. Does paclitaxel improve the chemoradiotherapy of locoregionally advanced esophageal cancer? A nonrandomized comparison with fluorouracil-based therapy. **J Clin Oncol**, 18(10): 2032-39, 2000.

ANDO, N.; IIZUKA, T.; KAKEGAWA, T.; ISONO, K.; WATANABE, H.; IDE, H.; et al. A randomized trial of surgery with and without chemotherapy for localized squamous cell carcinoma of the thoracic esophagus: the Japan Clinical Oncology Group Study. **J Thorac Cardiovasc Surg**, 114: 205-09, 1997.

ANSCHER, M.S.; PETERS, W.P.; REISENBICHLER, H.; PETROS, W.P.; JIRTLE, R.L. Transforming growth factor beta as predictor of liver and lung fibrosis after autologous bone marrow transplantation for advanced breast cancer. **N Engl J Med**, 328: 1592-98, 1993.

ANSCHER, M.S.; THRASHER, B.; RABBANI, Z.; TEICHER, B.; VUJASKOVIC, Z. Antitransforming growth factor- β antibody 1D11 ameliorates normal tissue damage caused by high-dose radiation. **Int J Radiat Oncol Biol Phys**, 65(3): 876-81, 2006.

ARNOLD, R.; HUMBERT, B.; WERCHAU, H. GALLATI, H. KÖNIG, W. Interleukin-8, interleukin-6, and soluble tumor necrosis factor receptor type I release from a human pulmonary epithelial cell line (A549) exposed to respiratory syncytial virus. **Immunology**, 82: 126-33, 1994.

ARNOTT, S.J.; DUNCAN, W.; KERR, G.R.; WALBAUM, P.R.; CAMERON, E.; JACK, W.J.; et al. Low-dose preoperative radiotherapy for carcinoma of the

oesophagus: results of a randomized clinical trial. **Radiother Oncol**, 24: 108-13, 1992.

ARPIN, D.; PEROL, D.; BLAY, J.Y.; FALCHERO, L.; CLAUDE, L.; VUILLERMOZ-BLAZ, S.; et al. Early variations of circulating interleukin-6 and interleukin-10 levels during thoracic radiotherapy are predictive for radiation pneumonitis. **J Clin Oncol**, 23: 8748-56, 2005.

ARPIN, D.; MAHÉ, M.A.; SERVOIS, V.; CLAUDE, L. Predictive factors for acute radiation pneumonitis. **Rev Pneumolog Clin**, 65(3): 177-86, 2009.

BAJ, Z.; KANTORSKI, J.; MAJEWSKA, E.; ZEMAN, K.; POKOCA, L.; FORNALCZYK, E.; et al. Immunological status of competitive cyclists before and after the training season. **Int J Sports Med**, 15: 319-24, 1994.

BAO, P.; GAO, W.; LI, S.; ZHANG, L.; QU, S.; WU, C.; et al. Effect of pretreatment with high-dose ulinastatin in preventing radiation-induced pulmonary injury in rats. **Eur J Pharmacol**, 603: 114-19, 2009.

BARTHELEMY-BRICHANT, N.; BOSQUÉE, L.; CATALDO, D.; CORHAY, J.L.; GUSTIN, M.; SEIDEL, L.; et al. Increased IL-6 and TGF-beta 1 concentrations in bronchoalveolar lavage fluid associated with thoracic radiotherapy. **Int J Radiat Oncol Biol Phys**, 58(3): 758-67, 2004.

BELCASTRO, A.N.; ARTHUR, G.D.; ALBISSER, T.A.; RAJ, D.A. Heart, liver, and skeletal muscle myeloperoxidase activity during exercise. **J Appl Physiol**, 80: 1331-5, 1996.

BENTZEN, S.M.; SKOCZYLAS, J.Z.; BERNIER, J. Quantitative clinical radiobiology of early and late lung reactions. **Int J Radiat Biol**, 76: 453-62, 2000.

BERNARD, E.L.; INCULET, R.I.; MALTHANER, R.A.; BRECEVIC, E.; VINCENT, M.; DAR, R. The role of surgery and postoperative chemoradiation therapy in

patients with lymph node positive esophageal carcinoma. **Cancer**, 91: 2423-30, 2001.

BRUUNSGAARD, H.; GALBO, H.; HALKJAER-KRISTENSEN, J. JOHANSEN, T.L.; MACLEAN, D.A.; PEDERSEN, B.K. Exercise-induced increase in serum interleukin-6 in humans is related to muscle damage. **J Physiol**, 499: 833-41, 1997.

CAGOL, M.; RUOL, A.; SILENI, V.C.; DE SALVO, G.L.; CORTI, L.; ALFIERI, R.; et al. Multimodal treatment in locally advanced esophageal cancer: a multicenter phase II study with neoadjuvant oxaliplatin, 5-fluorouracil, leucovorin and neoadjuvant radiotherapy: preliminary results. **Chir Ital**, 4: 433-9, 2006.

CALVELEY, V.L.; KHAN, M.A.; YEUNG, I.W.; VANDYK, J.; HILL, R.P. Partial volume rat lung irradiation: temporal fluctuations of in-field and out-of-field DNA damage and inflammatory cytokines following irradiation. **Int J Radiat Biol**, 81(12): 887-99, 2005.

CAO, X.F.; HE, X.T.; JI, L.; XIAO, J.; LV, J. Effects of neoadjuvant radiochemotherapy on pathological staging and prognosis for locally advanced esophageal squamous cell carcinoma. **Dis Esophagus**, 22: 477-81, 2009.

CHEN, Y.; RUBIN, P.; WILLIAMS, J.; HERNADY, E.; SMUDZIN, T.; OKUNIEFF, P. Circulating IL-6 as a predictor of radiation pneumonitis. **Int J Radiat Oncol Biol Phys**, 49(3): 641-48, 2001.

CHEN, L.; WANG, T.; WANG, X.; SUN, B.B.; LI, J.Q.; LIU, D.S.; et al. Blockade of advanced glycation end product formation attenuates bleomycin-induced pulmonary fibrosis in rats. **Respir Res**, 10: 55, 2009.

CHEN, Y.J.; WANG, T.; LIU, D.S.; XU, D.; CHEN, L.; AN, J.; et al. Effect of budesonide on TGF- β 1-enhanced VEGF production by lung fibroblasts. **Cell Biol Int**, 34: 777-82, 2010.

CHOI, N.; PARK, S.; LYNCH, T.; WRIGHT, C.; ANCUKIEWICZ, M.; WAIN, J.; et al. Twice-daily radiotherapy as concurrent boost technique during two chemotherapy cycles in neoadjuvant chemoradiotherapy for resectable esophageal carcinoma: mature results of phase II study. **Int J Radiat Oncol Biol Phys**, 60: 111-22, 2004.

CHOPRA, M.; REUBEN, J.S.; SHARMA, A.C. Acute lung injury: apoptosis and signaling mechanisms. **Exp Biol Med**, 234(4): 361-71, 2009.

COGGLE, J.E.; LAMBERT, B.E.; MOORES, S.R. Radiation effects in the lung. *Environ. Health Perspect*, 70: 261-91, 1986.

COLBERT, L.H.; DAVIS, J.M.; ESSIG, D.A.; GHAFFAR, A.; MAYER, E.P. Tissue expression and plasma concentrations of TNF- α , IL-1 β , and IL-6 following treadmill exercise in mice. **Int J Sports Med**, 22: 261-67, 2001.

D'AMICO, T.A. Outcomes after surgery for esophageal cancer. **Gastrointest Cancer Res**, 1(5): 188-196, 2007.

DÄHN, D.; MARTELL, J.; VORWERK, H.; HESS, C.F.; BECKER, H.; JUNG, K.; et al. Influence of irradiated lung volumes on perioperative morbidity and mortality in patients after neoadjuvant radiochemotherapy for esophageal cancer. **Int J Radiat Oncol Biol Phys**, 77(1): 44-52, 2010.

DI FIORE, F.; LECLEIRE, S.; RIGAL, O.; GALAIS, M.P. Predictive factors of survival in patients treated with definitive radiochemotherapy for squamous cell esophageal carcinoma. **World J Gastroenterol**, 12: 4185-90, 2006.

DOWN, J.D.; STEEL, G.G. The expression of early and late damage after thoracic irradiation: a comparison between CBA and C57Bl mice. **Radiat Res**, 96: 603-10, 1983.

EARLAM, R.; CUNHA-MELO, J.R. Oesophageal squamous cell carcinoma: a critical review of surgery. **Br J Surg**, 67: 381-90, 1980.

ESCOTTE, S.; TABARY, O.; DUSSER, D.; MAJER-TEBOUL, C.; PUCHELLE, E.; JACQUOT, J. Fluticasone IL-6 and IL-8 production of cystic fibrosis bronchial epithelial cells via IKK- β kinase pathway. **Eur Respir J**, 21: 574-81, 2003.

FACURE, A.; CARDOSO, S.C.; ROSA, L.A.R.da; SILVA da, A.X. Photon doses at the entrance of ^{60}Co and low-energy medical accelerator rooms under unusual irradiation conditions. **Radiation Protection Dosimetry**, 138(3): 251-56, 2010.

FAN, J.; KAPUS, A.; LI, Y.H.; RIZOLI, S.; MARSHALL, J.C.; ROTSTEIN, O.D. Priming for enhanced alveolar fibrin deposition after hemorrhagic shock: role of tumor necrosis factor. **Am J Respir Cell Mol Biol**, 22: 412-21, 2000.

FANG, W.; KATO, H.; TACHIMORI, Y.; IGAKI, H.; SATO, H.; DAIKO, H. Analysis of pulmonary complications after three-field lymph node dissection for esophageal cancer. **Ann Thorac Surg**, 76: 903-08, 2003.

FAY, M.; TAN, A.; FISHER, R.; MAC MANUS, M.; WIRTH, A.; BALL, D. Dose-volume histogram analysis as predictor of radiation pneumonitis in primary lung cancer patients treated with radiotherapy. **Int J Radiat Oncol Biol Phys**, 61(5): 1355-63, 2005.

FENG, G.; LIU, S.; WANG, G.L.; LIU, G.J. Lidocaine attenuates lipopolysaccharide-induced acute lung injury through inhibiting NF-kappaB activation. **Pharmacology**, 81(1): 32-40, 2008.

FLECKENSTEIN, K.; GAUTER-FLECKENSTEIN, B.; JACKSON, I.L.; RABBANI, Z.; ANSCHER, M.; VUJASKOVIC, Z. Using biological makers to predict risk of radiation injury. **Semin Radiat Oncol**, 17: 89-98, 2007a.

FLECKENSTEIN, K.; ZGONJANIN, L.; CHEN, L.; RABBANI, Z.; JACKSON, I.L.; THRASHER, B.; et al. Temporal onset of hypoxia and oxidative stress after pulmonary irradiation. **Int J Radiat Oncol Biol Phys**, 68: 196-204, 2007b.

FONG, C.H.Y.; BEBIEN, M.; DIDIERLAURENT, A.; NEBAUER, R.; HUSSELL, T.; BROIDE, D.; et al. An antiinflammatory role for IKK β through the inhibition of “classical” macrophage activation. **J Exp Med**, 205(6): 1269-76, 2008.

FRANKO, A.J.; SHARPLIN, J.; GHAHARY, A.; BARCELLOS-HOFF, M.H. Immunohistochemical localization of transforming growth factor β and tumor necrosis factor α in the lung of fibrotic-prone and “non-fibrosing” mice during the latent period and early phase after irradiation. **Radiat Res**, 147: 245-56, 1997.

FU, X.L.; HUANG, H.; BENTEL, G.; CLOUGH, R.; JIRTLE, R.L.; KONG, F.M.; et al. Predicting the risk of symptomatic radiation-induced lung injury using both the physical and biologic parameters V_{30} and transforming growth factor β . **Int J Radiat Oncol Biol Phys**, 50(4): 899-908, 2001.

GAGLIARDI, G.; BJOHLE, J.; LAX, I.; OTTOLENGHI, A.; ERIKSSON, F.; LIEBERG, A.; et al. Radiation pneumonitis after breast cancer irradiation: Analysis of the complication probability using the relative seriality model. **Int J Radiat Oncol Biol Phys**, 46: 373-81, 2000.

GANNON, G.A.; RHIND, S.G.; SUZUI, M.; SHEK, P.N.; SHEPHARD, R.J. Circulating levels of peripheral blood leucocytes and cytokines following competitive cycling. **Can J Appl Physiol**, 22: 133-47, 1997.

GEARA, F.B.; KOMAKI, R.; TUCKER, S.L.; TRAVIS, E.L.; COX, J.D. Factors influencing the development of lung fibrosis after chemoradiation for small cell carcinoma of the lung: evidence for inherent interindividual variation. **Int J Radiat Oncol Biol Phys**, 41: 279-86, 1998.

GHOSH, S.N.; WU, Q.; MÄDER, M.; FISH, B.L.; MOULDER, J.E.; JACOBS, E.R.; et al. Vascular injury following whole thoracic x-ray irradiation in the rat. **Int J Radiat Oncol Biol Phys**, 74(1): 192-99, 2009.

GROSS, T.J.; HUNNINGHAKE, G.W. Idiopathic pulmonary fibrosis. **N Engl J Med**, 345: 517-25, 2001.

GYARMATHY, L.; VARJAS, G.; MAJOR, T.; FODOR, J.; KÁSLER, M. Fifty-year-old history of cobalt radiotherapy in Hungary. **Magy Onkol**, 52(3): 299-304, 2008.

HACKER, H.; KARIN, M. Regulation and function of IKK and IKK-related kinases. **Sci STKE**, 357: re 13, 2006.

HARDMAN, P.D.; TWEEDDALE, P.M.; KERR, G.R.; ANDERSON, E.D.; ROGDER, A. The effect of pulmonary function of local and loco-regional irradiation for breast cancer. **Radiother Oncol**, 30: 33-42, 1994.

HART, J.P.; McCURDY, M.R.; EZHIL, M.; WEI, W.; KHAN, M.; LUO, D.; et al. Radiation pneumonitis: correlation of toxicity with pulmonary metabolic radiation response. **Int J Radiation Oncology Biol Phys**, 71(4): 967-71, 2008.

HAYDEN, M.S.; GHOSH, S. Signaling to NF-(kappa)B. **Genes Develop**, 18: 2195-224, 2004.

HENSON, P.M.; VANDIVIER, R.W.; DOUGLAS, I.S. Cell death, remodeling, and repair in chronic obstructive pulmonary disease. **Proc Am Thorac Soc**, 3: 713-17, 2006.

HERMANN, R.M.; HORSTMANN, O.; HALLER, F.; PERSKE, C.; CHRISTIANSEN, H.; HILLE, A.; et al. Histomorphological tumor regression grading esophageal carcinoma after neoadjuvant radiochemotherapy: with score to use? **Dis Esophagus**, 5: 329-34, 2006.

HOPE, A.J.; LINDSAY, P.E.; EL NAGA, I.; ALALY, J.R.; VICIC, M.; BRADLEY, J.D.; et al. Modeling radiation pneumonitis risk with clinical, dosimetric, and spatial parameters. **Int J Radiat Oncol Biol Phys**, 65(1): 112-24, 2006.

JACKSON, M.A.; BALL, D.L. Palliative retreatment of locally recurrent lung cancer after radical radiotherapy. **Med J Aust**, 147: 391-94, 1987.

JENSEN, B.V.; CARLSEN, N.L.; NISSEN, N.I. Influence of age and duration of follow-up on lung function after combined chemotherapy for Hodgkin's disease. **Eur Respir J**, 3: 1140-45, 1990.

JIN, H.; TUCKER, S.L.; LIU, H.H.; WEI, X.; YOM, S.S.; WANG, S.; et al. Dose-volume thresholds and smoking status for the risk of treatment-related pneumonitis in inoperable non-small cell lung cancer treated with definitive radiotherapy. **Radiother Oncol**, 91: 427-32, 2009.

JOHNSTON, C.J.; WILLIAMS, J.P.; OKUNIEFF, P.; FINKELSTEIN, J.N. Radiation-induced pulmonary fibrosis: examination of chemokine and chemokine receptor families. **Radiat Res**, 157: 256-65, 2002.

JOINER, M.C.; THOMAS, R.A.; GREVER, W.E.; SMOLINSKI, J.M.; DIVINE, G.W.; KONSKI, A.A.; et al. Developing point of care and high-throughput biological assays for determining absorbed radiation dose. **Radiother Oncol**, 101(1): 233-36, 2011.

KAHAN, Z.; CSENKI, M.; VARGA, Z.; SZIL, E.; CSERHÁTI, A.; BALOGH, A.; et al. The risk of early and late lung sequelae after conformal radiotherapy in breast cancer patients. **Int J Radiat Oncol Biol Phys**, 68: 673-81, 2007.

KELSEN, D.P.; GINSBERG, R.; PAJAK, T.F.; SHEAHAN, D.G.; GUNDERSON, L.; MORTIMER, J.; et al. Chemotherapy followed by surgery compared with surgery alone for localized esophageal cancer. **N Engl J Med**, 339: 1979-84, 1998.

KIM, J.Y.; KIM, Y.S.; KIM, Y.K.; PARK, H.J.; KIM, S.J.; KANG, J.H.; et al. TGF- β 1 dynamics during radiation therapy and its correlation to symptomatic radiation pneumonitis in lung cancer patients. **Radiat Oncol**, 4: 59, 2009.

KIM, K.H.; SHIM, J.H.; SEO, E.H.; CHO, M.C.; KANG, J.W.; KIM, S.H.; et al. Interleukin-32 monoclonal antibodies for Immunohistochemistry, Western blotting, and ELISA. **J Immunol Methods**, 333: 38-50, 2008.

KOCAK, Z.; BORST, G.R.; ZENG, J.; ZHOU, S.; HOLLIS, R.; ZHANG, J.; et al. Prospective assessment of dosimetric/physiologic-based models for predicting radiation pneumonitis. **Int J Radiat Oncol Biol Phys**, 67(1): 178-86, 2007.

KOCAK, Z.; EVANS, E.S.; ZHOU, S.M.; MILLER, K.L.; FOLZ, R.J.; SHAFMAN, T.D.; et al. Challenges in defining radiation pneumonitis in patients with lung cancer. **Int J Radiat Oncol Biol Phys**, 62(3): 635-38, 2005.

KONG, F.M.; A.O.; X.; WANG, L.; LAWRENCE, T.S. The use of blood biomarkers to predict radiation lung toxicity: a potential strategy to individualize thoracic radiation therapy. **Cancer Control**, 15(2): 140-50, 2008.

KYAS, L.; HOF, H.; DEBUS, J.; SCHLEGEL, W.; KARGER, C.P. Prediction of radiation-induced changes in the lung after stereotactic body radiation therapy of no-small-cell lung cancer. **Int J Radiat Oncol Biol Phys**, 67: 768-74, 2007.

LAW, S.; WONG, K.; KWOK, K.F.; CHU, K.M.; WONG, J. Predictive factors for postoperative pulmonary complications and mortality after esophagectomy for cancer. **Ann Surg**, 240: 791-800, 2004.

LEE, C.B.; STINCHCOMBE, T.E.; ROSENMAN, J.G.; SOCINSKI, M.A. Therapeutic advances in local-regional therapy for stage III non-small-cell lung cancer: evolving role of dose-escalated conformal (3-dimensional) radiation therapy. **Clin Lung Cancer**, 8(3): 195-202, 2006a.

LEE, K.Y.; ITO, K.; HAYASHI, R.; JAZRAWI, E.P.I.; BARNES, P.J.; ADCOCK, I.M. NF- κ B and activator protein 1 response elements and the role of histone modifications in IL-1 β -induced TGF- β 1 gene transcription. **J Immunol**, 176: 603-15, 2006b.

LI, X.; SU, J.; CUI, X.; LI, Y.; BAROCHIA, A.; EICHACKER, P.Q. Can we predict the effects of NF-kappaB inhibition in sepsis? Studies with parthenolide and ethyl pyruvate. **Exp Opin Investig Drugs**, 18(8): 1047-60, 2009.

LIAO, Z.; COX, J.D.; KOMAKI, R. Radiochemotherapy of esophageal cancer. **J Thorac Oncol**, 2(6): 553-68, 2007.

LIRA, F.S.; ROSA, J.C.; PIMENTEL, G.D.; TARINI, V.A.F.; ARIDA, R.M.; FALOPPA, F.; et al. Inflammation and adipose tissue: effects of progressive load training in rats. **Lipids Health Dis**, 9:109, 2010.

LIU, J.; WANG, X.; WANG, F.; TENG, L.; CAO, J. Attenuation effects of heparin-superoxide dismutase conjugate on bleomycin-induced lung fibrosis *in vivo* and radiation-induced inflammatory cytokine expression *in vitro*. **Biomed Pharmacother**, 63: 484-91, 2009.

LIXUAN, Z.; JINGCHENG, D.; WENQIN, Y.; JIANHUA, H.; BAOJUN, L.; XIAOTAO, F. Baicalin attenuates inflammation by inhibiting NF-kappaB activation in cigarette smoke induced inflammatory models. **Pulm Pharmacol Ther**, 23(5): 411-19, 2010.

MA, J.; ZHANG, J.; ZHOU, S.; HUBBS, J.L.; FOLTZ, R.J.; HOLLIS, D.R.; et al. Regional lung density changes after radiation therapy for tumors in and around thorax. **Int J Radiation Oncology Biol Phys**, 76(1): 116-22, 2010.

MARTEL, M.K.; TEN HAKEN, R.K.; HAZUKA, M.B.; KESSLER, M.L.; STRAWDERMAN, M.; TURRISI, A.T.; et al. Estimation of tumor control probability

model parameters from 3-D dose distributions of non-small cell lung cancer patients. **Lung Cancer**, 24:31-37, 1999.

MATTOS, M.D.; KIMURA, E.T.; SILVA, M.R.R.; EGAMI, M.I.; SEGRETO, R.A.; SEGRETO, H.R.C. Ativação da proteína TGF β 1 latente em pulmão irradiado *in vivo*. **Rev Assoc Med Bras**, 48(4): 329-34, 2002.

MIYATA, H.; YAMASAKI, M.; TAKIGUCHI, S.; NAKAJIMA, K.; FUJIWARA, Y.; NISHIDA, T.; et al. Salvage esophagectomy after definitive chemoradiotherapy for thoracic esophageal cancer. **J Surg Oncol**, 100: 442-46, 2009.

MOLLIS, M.; VAN BEUNINGEN, D. Radiation injury of the lung: Experimental studies, observations after radiotherapy and total body irradiation prior to bone marrow transplantation. In: Schere, E.; Streffer, c.; Trott, k. Radiopathology of Organs and Tissues. **Berlin: Springer-Verlag.**: 369-404, 1991.

MOON, C.; LEE, Y.J.; PARK, H.J.; CHONG, Y.H.; KANG, J.L. N-acetylcysteine inhibits RhoA and promotes apoptotic cell clearance during intense lung inflammation. **Am J Respir Crit Care Med**, 181: 374-87, 2010.

MORGAN, G.W.; PHARM, B.; BREIT, S.N. Radiation and the lung: a reevaluation of the mechanisms mediating pulmonary injury. **Int Radiation Oncology Biol Phys**, 31(2): 361-69, 1995.

MORITA, M.; YOSHIDA, R.; IKEDA, K.; EGASHIRA, A.; OKI, E.; SADANAGA, N.; et al. Acute lung injury following an esophagectomy for esophageal cancer, with special reference to the clinical factors and cytokine levels of peripheral blood and pleural drainage fluid. **Dis Esophagus**, 21(1): 30-36, 2008.

MOROTA, M.; GOMI, K.; KOZUKA, T.; CHIN, K.; MATSUURA, M.; OGUCHI, M.; et al. Late toxicity after definitive concurrent chemoradiotherapy for thoracic esophageal carcinoma. **Int J Radiat Oncol Biol Phys**, 75(1): 122-28, 2009.

MOVSAS, B.; RAFFIN, T.A.; EPSTEIN, A.H.; LINK JUNIOR, C.J. Pulmonary radiation injury. **Chest**, 111(4): 1061-76, 1997.

MULLER, J.M.; ERASMI, H.; STELZNER, M.; ZIEREN, U.; PICHLMAIER, H. Surgical therapy of oesophageal carcinoma. **Br J Surg**, 77: 845-57, 1990.

MUSSI, R.K.; CAMARGO, E.A.; FERREIRA, T.; DE MORAES, C.; DELBIN, M.A.; TORO, I.F.; et al. Exercise training reduces pulmonary ischaemia-reperfusion-induced inflammatory responses. **Eur Respir J**, 31(3): 645-49, 2008.

NAKAMURA, M.; IWAHASHI, M.; NAKAMORI, M.; ISHIDA, K.; NAKA, T.; IIDA, T.; et al. An analysis of the factors contributing to a reduction in the incidence of pulmonary complications following an esophagectomy for esophageal cancer. **Langenbecks Arch Surg**, 393:127-33, 2008a.

NAKAMURA, T.; FUWA, N.; KODAIRA, T.; TACHIBANA, H.; TOMODA, T.; NAKAHARA, R.; et al. Clinical outcome of stage III non-small-cell- lung cancer patients after definitive radiotherapy. **Lung**, 186: 91-96, 2008b.

NIEDER, C.; MILAS, L.; ANG, K.K. Tissue tolerance to reirradiation. **Semin Radiat Oncol**, 10(3): 200-09, 2000.

NIEMAN,, D.C. Marathon training and immune function. **Sports Med**, 37(4-5): 412-15, 2007.

NIEMAN, D.C. Exercise effects on systemic immunity. **Immunol Cell Biol**, 78: 496-501, 2000.

NOVAKOVA-JIRESOVA, A.; LUIJK, P.V.; GOOR, H.V.; KAMPINGA, H.H.; COPPES, R.P. Changes in expression of injury after irradiation of increasing volumes in rat lung. **Int J Radiat Oncol Biol Phys**, 67(5): 1510-8, 2007.

NOVAKOVA-JIRESOVA, A.; LUIJK, P.V.; GOOR, H.V.; KAMPINGA, H.H.; COPPES, R.P. Pulmonary radiation injury: identification of risk factors associated with regional hypersensitivity. **Cancer Res**, 65: 3568-76, 2005.

OHBA, M.; SHIBANUMA, M.; KUROKI, T. Production of hydrogen peroxide by transforming growth factor β 1 and its involvement in induction of egr-1 in mouse osteoblastic cells. **J Cell Biol**, 126: 1079-88, 1994.

OLIVEIRA, A.G.; CARVALHO, B.M.; TOBAR, N.; ROPELLE, E.R.; PAULI, J.R.; BAGAROLLI R.A.; et al. Physical exercise reduces circulating lipopolysaccharide and TLR4 activation and improves insulin signaling in tissues of DIO rats. **Diabetes**, 60:784-96, 2011.

OSTROWSKI, K.; ROHDE, T.; ZACHO, M.; ASP, S.; PEDERSEN, B.K. Evidence that interleukin-6 is produced in human skeletal muscle during prolonged running. **J Physiol**, 508: 949-53, 1998.

PEDRAZZANI, C.; LATERZA, E.; PASINI, F.; GRANDINETTI, A.; BERNINI, M.; GIACOPUZZI, S.; et al. Long-term results of neoadjuvant radiochemotherapy in squamous carcinoma of the thoracic esophagus. **Minerva Chir**, 1: 11-16, 2005.

PELTON, R.W.; MOSES, H.L. The beta-type transforming growth factor. **Am Rev Respire Dis**, 142: S31-S35, 1990.

PERKINS, N.D. Integrating cell-signalling pathways with NF-kappaB and IKK function. **Nat Rev Mol Cell Biol**, 8: 49-62, 2007.

PERKINS, N.D.; GILMORE, T.D. Good cop, bad cop: the different faces of NF-kappaB. **Cell Death Differ**, 13: 759-72, 2006.

PETERSEN, A.M.; PEDERSEN, B.K. The anti-inflammatory effect of exercise. **J Appl Physiol**, 98: 1154-62, 2004.

RABBANI, Z.N.; ANSCHER, M.S.; FOLZ, R.J.; ARCHER, E.; HUANG, H.; CHEN, L.; et al. Overexpression of extracellular superoxide dismutase reduces acute radiation induced lung toxicity. **BMC Cancer**, 5: 59, 2005.

RITZENTHALER, J.D.; GOLDSTEIN, R.H.; FINE, A. Regulation of the alpha 1(I) collagen promoter via a transforming growth factor-beta activation element. **J Biol Chem**, 268: 13625-31, 1993.

ROBNETT, T.J.; MACHTAY, M.; VINES, E.F.; McKENNA, M.G.; ALGAZY, K.M.; McKENNA, W.G. Factors predicting severe radiation pneumonitis in patients receiving definitive chemoradiation for lung cancer. **Int J Radiat Oncol Biol Phys**, 48(1): 89-94, 2000.

ROBERTS, A.B.; SPORN, M.B.; ASSOIAN, R.K.; SMITH, J.M.; ROCHE, N.S.; WAKEFIELD, L.M.; et al. Transforming growth factor type β : rapid induction of fibrosis and angiogenesis in vivo and stimulation of collagen formation in vitro. **Proc Natl Acad Sci USA**, 83: 4167-71, 1986.

ROPELLE, E.R.; FLORES, M.B.; CINTRA, D.E.; ROCHA, G.Z.; PAULI, J.R.; MORARI, J.; et al. IL-6 and IL-10 anti-inflammatory activity links exercise to hypothalamic insulin and leptin sensitivity through IKK β and ER stress inhibition. **Plos Biology**, 8(8): 1-20, 2010.

RÜBE, C.E.; UTHE, D.; SCHMID, K.W.; RICHTER, K.D.; WESSEL, J.; SHUCK, A., et al. Dose-dependent induction of transforming growth factor β (TGF- β) in the lung tissue of fibrosis-prone mice after thoracic irradiation. **Int J Radiat Oncol Biol Phys**, 47(4): 1033-42, 2000.

RÜBE, C.E.; PALM, J.; ERREN, M.; FLECKENSTEIN, J.; KÖNIG, J.; REMBERGER, K.; et al. Cytokine plasma levels: reliable predictors for radiation pneumonitis? **Plos One**, 3(8): e2898, 2008.

RÜBE, C.E.; WILFERT, F.; UTHE, D.; SCHMID, K.W.; KNOOP, R.; WILLICH, N.; et al. Modulation of radiation-induced tumour necrosis factor α (TNF- α) expression in the lung tissue by pentoxifyline. **Radiother Oncol**, 64: 177-87, 2002.

RUBIN, P.; CASSERATT, G.W. Respiratory system. In: Clinical Radiation Pathology. Vol 1. Philadelphia: W.B. Saunders, 423-470, 1968.

SAKAI, M.; IWAKAWA, M.; IWAKURA, Y.; OHTA, T.; TSUJII, H.; IMAI, T. CD44 and bak expression in IL-6 or TNF-alpha gene knockout mice after whole lung irradiation. **J Radiat Res**, 49: 409-16, 2008.

SAKAMOTO, K.; ARAKAWA, H.; ISHIKO, T.; IKEI, S.; EGAMI, H.; HISANO, S.; et al. Elevation of circulating interleukin-6 after surgery: factors influencing serum level. **Cytokine**, 6: 181-86, 1994.

SCHALLENKAMP, J.M.; MILLER, R.C.; BRIIVKMANN, D.H.; FOOTE, T.,; GARCES, Y.I. Incidence of radiation pneumonitis after thoracic irradiation: Dose volume correlates. **Int J Radiat Oncol Biol Phys**, 67: 410-16, 2007.

SCHEIDEREIT, C. Ikappa β kinase complexes: gateways to NF-kappaB activation and transcription. **Oncogene**, 25: 6685-705, 2006.

SCHMID, J.A.; BIRBACH, A. I κ B kinase β (I κ k β /I κ k2/I κ Bk β)- a key molecule in signaling to the transcription factor NF-kB. **Cytokine Growth Factor Rev**, 19: 157-65, 2008.

SEMENENKO, V.A.; MOLTHEN, R.C.; LI, C.; MORROW, N.V.; LI, R.; GHOSH, S.N.; et al. Irradiation of varied volumes of rat lung to the same mean lung dose: a little to a lot or a lot to a little? **Int J Radiat Biol Oncol Phys**, 71(3): 838-47, 2008.

SEPPENWOOLDE, Y.; LEBESQUE, J.V. Partial irradiation of the lung. **Semin Radiat Oncol**, 11(3): 247-58, 2001.

SEPPENWOOLDE, Y., DE JAEGER, K.; BOERSMA, L.J.; BELDERBOS, J.S.; LEBESQUE, J.V. Regional differences in lung radiosensitivity after radiotherapy for non-small-cell lung cancer. **Int J Radiat Oncol Biol Phys**, 60(3): 748-58, 2004.

SHENKAR, R.; ABRAHAM, E. Hemorrhage inducer rapid in vivo activation of CREB and NF-kappaB in murine intraparenchymal lung mononuclear cells. **Am J Respir Cell Mol Biol**, 16: 145-52, 1997.

SHINOHARA, S.; ARIKAWA, K. Radioisotopic assessment on development of radiation pneumonitis and fibrosis. **Australas Radiol**, 6: 363-66, 1972.

SKOCZYLAS, J.Z.; BENTZEN, S.M.; OVERGAARD, M.; OVERGAARD, J. Time course of radiological lung density changes after postmastectomy radiotherapy. **Acta Oncol**, 39: 181-87, 2000.

SMITH, E.B.; WHITE, D.C.; HARTSOCK, R.J.; DIXON, A.C. Acute ultrastructural effects of 500 roentgens on the mouse. **Am J Pathol**, 50: 159-75, 1967.

SMITH, J.A.; TELFORD, R.D.; BAKER, M.S.; HAPPEL, A.J.; WEIDEMANN, M.J. Cytokine immunoreactivity in plasma does not change after moderate endurance exercise. **J Appl Physiol**, 73: 1396-401, 1992.

SRIWIJITKAMOL, A.; COLETTA, D.K.; WAJCBURG, E.; BALBONTIN, G.B.; REYNA, S.M.; BARRIENTES, J.; et al. Effect of acute exercise on AMPK signaling in skeletal muscle of subjects with type 2 diabetes: a time-course and dose-response study. **Diabetes**, 56(3):836-48, 2007.

STROIAN, G.; MARTENS, C.; SOUHAMI, L.; COLLINS, D.L.; SEUNTJENS, J. Local correlation between monte-carlo dose and radiation-induced fibrosis in lung cancer patients. **Int J Radiat Oncol Biol Phys**, 70(3): 921-30, 2008.

SZABO, S.; GHOSH, S.N.; FISH, B.L.; BODIGA, S.; TOMIC, R.; KUMAR, G.; et al. Cellular inflammatory infiltrate in pneumonitis induced by a single moderate dose of thoracic versus radiation in rats. **Radiat Res**, 173(4):545-56, 2010.

TAKEUCHI, H.; SAIKAWA, Y.; OYAMA, T.; OZAWA, S.; SUDA, K.; WADA, N.; et al. Factors influencing the long-term survival in patients with esophageal cancer who underwent esophagectomy after chemoradiotherapy. **World J Surg**, 34: 277-84, 2010.

TERCIOTI JUNIOR, V.; LOPES, L.R.; COELHO NETO, J.D.; CARVALHEIRA, J.B.C.; ANDREOLLO, N.A. Local effectiveness and complications of neoadjuvant therapy in esophageal squamous cell carcinoma: radiotherapy versus chemoradiotherapy. **Rev Col Bras Cir**, 38(4):227-31, 2011.

TERRY, N.H.A.; TUCKER, S.L.; TRAVIS, E.L. Residual radiation damage in murine lung assessed by pneumonitis. **Int J Radiat Oncol Biol Phys**, 14: 929-38, 1988.

THANNICKAL, V.J.; FANBURG, B.L. Activation of an H₂O₂-generating NADH oxidase in human lung fibroblasts by transforming growth factor β 1. **J Biol Chem**, 270: 30334-38, 1995.

THEUWS, J.C.; KWA, S.L.; WAGENAAR, A.C.; SEPPENWOOLDE, Y.; BOERSMA, L.J.; DAMEN, E.M.; et al. Dose-effect relations for early local pulmonary injury after irradiation for malignant lymphoma and breast cancer. **Radiother Oncol**, 48: 33-43, 1998.

THEUWS, J.C.; SEPPENWOOLDE, Y.; KWA, S.L.; BOERSMA, L.J.; DAMEN, E.M.; BAAS, P.; et al. Changes in local pulmonary injury up to 48 months after irradiation for lymphoma and breast cancer. **Int J Radiat Oncol Biol Phys**, 47: 1201-08, 2000.

THOMAS, M.; RÜBE, C.; HOFLKNCCHT, P.; MACHA, H.N.; FREITAG, L.; LINDER, A.; et al. Effect of preoperative chemoradiation in addition to preoperative chemotherapy: a randomized trial in stage III non-small-cell lung cancer. **Lancet Oncol**, 9: 636-48, 2008.

TRIBOULET, J.P.; MARIETTE, C. Esophageal squamous cell carcinoma stage III: state of surgery after radiochemotherapy. **Cancer Radiother**, 10: 456-61, 2006.

TSOUTSOU, P.G.; KOUKOURAKIS, M.I. Radiation pneumonitis and fibrosis: mechanisms underlying its pathogenesis and implications for future research. **Int J Radiat Oncol Biol Phys**, 66: 1281-93, 2006.

TSUJINO, K.; HIROTA, S.; ENDO, M.; OBAYASHI, K.; KOTANI, Y.; SATOUCHI, M.; et al. Predictive value of dose-volume histogram parameters for predicting radiation pneumonitis after concurrent chemoradiation for lung cancer. **Int J Radiat Oncol Biol Phys**, 55(1): 110-5, 2003.

TUCKER, S.L.; JIN, H.; WEI, X.; WANG, S.; MARTEL, M.K.; KOMAKI, R.; et al. Impact of toxicity grade and scoring system on the relationship between mean lung dose and risk of radiation pneumonitis in a large cohort of patients with non-small cell lung cancer. **Int J Radiation Oncology Biol Phys**, 77(3): 691-98, 2010.

TVEDE, N.; STEENSBERG, J.; BASLUND, B.; KRISTENSEN, J.H.; PERDENSEN, B.K. Cellular immunity in highly-trained elite racing cyclists and controls during periods of training with high and low intensity. **Scand J Sports Med**, 1: 163-66, 1991.

ULECKIENE, S.; DIDZIAPETRIENE, J.; GRICUTE, L.L.; URBELIENE, J.; KASIULEVICIUS, V.; SAPOKA, V. Risk factors of main cancer sites. **Medicina (Kaunas)**, 44(12): 989-95, 2008.

ULLUM, H.; HAAHR, P.M.; DIAMANT, M.; PALMO, J.; HALKJAER-KRISTENSEN, J.; PEDERSEN, B.K. Bicycle exercise enhances plasma IL-6 but does not change IL-1 α , IL-1 β , IL-6 or TNF α pre-mRNA in BMNC. **J Appl Physiol**, 77: 93-97, 1994.

VON DER MAASE, H.; OVERGAARD, J.; VAETH, M. Effect of cancer chemotherapeutic drugs on radiation-induced lung damage in mice. **Radiother Oncol**, 5: 245-57, 1986.

YAMADA, M.; KUDOH, S.; HIRATA, K.; NAKAJIMA, T.; YOSHIKAWA, J. Risk factors of pneumonitis following chemoradiotherapy for lung cancer. **Eur J Cancer**, 34(1): 71-75, 1998.

YAMASHITA, H.; NAKAGAWA, K.; NAKAMURA, N.; KOYANAGI, M.T.; IGAKI, H.; SHIRAISHI, K.; et al. Exceptionally high incidence of symptomatic grade 2-5 radiation pneumonitis after stereotactic radiation therapy for lung tumors. **Radiat Oncol**, 2(21): 1-11, 2007.

YORKE, E.D.; JACKSON, A.; ROSENZWEIG, K.E.; BRABAN, L.; LEIBEL, S.A.; LING, C.C. Correlation of dosimetric factors and radiation pneumonitis for non-small-cell lung cancer patients in a recently completed dose escalation study. **Int J Radiat Oncol Biol Phys**, 63(3): 672-82, 2005.

YSAYAMA, L.; LOPES, L.R.; SILVA, A.M.O.; ANDREOLLO, N.A. The influence of the respiratory muscular training in the recovery of esophagectomies. **ABCD Arq Bras Cir Dig**, 21(2):61-4, 2008.

YU, H.M.; LIU, Y.F.; CHENG, Y.F.; HU, L.K.; HOU, M. Effects of rhubarb extract on radiation induced lung toxicity via decreasing transforming growth factor-beta-1 and interleukin-6 in lung cancer patients treated with radiotherapy. **Lung Cancer**, 59: 219-26, 2008.

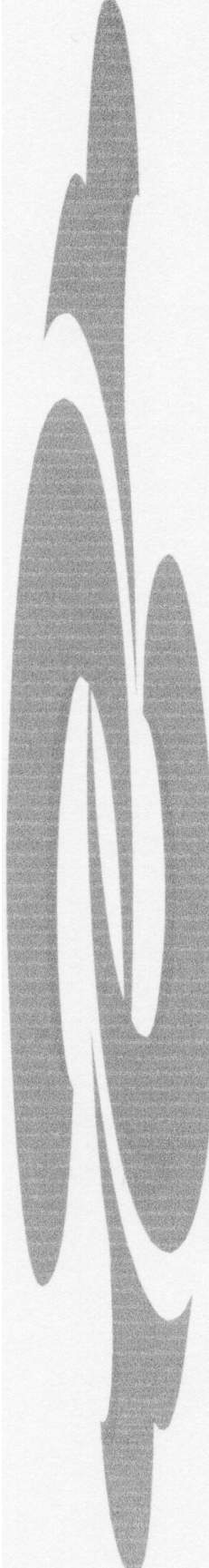
WENNBERG, B.; GAGLIARDI, G.; SUNDBOM, L.; SVANE, G.; LIND, P. Early response of lung in breast cancer irradiation: Radiologic density changes measured by CT and symptomatic radiation pneumonitis. **Int J Radiat Oncol Biol Phys**, 52: 1196-206, 2002.

WERNER-WASIK, M.; YORKE, E.; DEASY, J.; NAM, J.; MARKS, L.B. Radiation dose-volume effects in the esophagus. **Int J Radiat Oncol Biol Phys**, 76(3): S86-S93, 2010.

ZHANG, M.; QIAN, J.; XING, X.; KONG, F.M.; ZHAO, L.; CHEN, M.; et al. Inhibition of the tumor necrosis factor-alpha pathway is radioprotective for the lung. **Clin Cancer Res**, 14(6): 1868-76, 2008a.

ZHANG, R.; GHOSH, S.N.; ZHU, D.; NORTH, P.E.; FISH, B.L.; MORROW, N.V.; et al. Structural and functional alterations in the rat lung following whole thoracic irradiation with moderate doses: injury and recovery. **Int J Radiat Biol**, 84(6): 487-497, 2008b.

ZHAO, Y.H.; LI, Z.P.; CHEN, X.M.; LIU, X.J.; WU, W.C.; XU, Y.; et al. Correlation study of physical and biologic parameters to acute radiation pneumonitis. **Sichuan Da Xue Bao Yi Xue Ban**, 39(5): 796-800, 2008.



8- ANEXOS

ANEXO 1



CEE/Unicamp

Comissão de Ética na Experimentação Animal CEE/Unicamp

CERTIFICADO

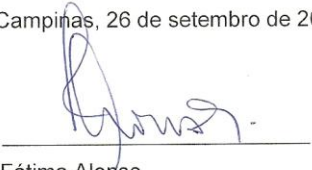
Certificamos que o Protocolo nº 1349-1, sobre "Análise dos benefícios da atividade física e mensuração de citocinas pró-inflamatórias em pulmão imunorradiado", sob a responsabilidade de Prof. Dr. Luiz Roberto Lopes / Renata Cristiane Gennari Bianchi, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal – CEE/Unicamp em 26 de setembro de 2007.

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº 1349-1, entitled "Benefits analysis of physical activity and proinflammatory cytokines measurements in immunoradiated lung", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - Unicamp) on September 26, 2007.

Campinas, 26 de setembro de 2007.


Profa. Dra. Ana Maria A. Guarnaldo
Presidente


Fátima Alonso
Secretária Executiva

CEE/IB – Unicamp
Caixa Postal 6109
13083-970 Campinas, SP – Brasil

Telefone: (19) 3521-6359
Telefax: (19) 3521-6356
E-mail: comisib@unicamp.br
<http://www.ib.unicamp.br/institucional/cee/index.htm>