

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA RADIAÇÃO GAMA SOBRE O  
DESENVOLVIMENTO DE CÂNCER DE MAMA EM RATAS WISTAR**

**CLEIDE DOS SANTOS COELHO**

Dissertação de Mestrado em Ciências Fisiológicas

Mestrado em Ciências Fisiológicas

Universidade Federal do Espírito Santo  
Vitória, Agosto de 2022

## **AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA RADIAÇÃO GAMA SOBRE ODESENVOLVIMENTO DE CÂNCER DE MAMA EM RATAS WISTAR**

Cleide dos Santos Coelho

Dissertação submetida ao programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal do Espírito Santo como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Fisiológicas.

---

Prof. Dra. Sônia Alves Gouvea- Orientadora.

---

Marcos Tadeu D'Azevedo Orlando – Coorientador

---

Elson Silva Galvão– Banca interna

---

Jacira Soares – Banca externa

---

Prof. Dra. Silvana dos Santos Meyrelles – Coordenadora

## Universidade Federal do Espírito Santo

Vitória, Agosto de 2022

### Registro de Julgamento de Dissertação de Mestrado

A Comissão Julgadora que examinou a Dissertação de Mestrado do(a) candidato (a) **CLEIDE DOS SANTOS COELHO**, intitulada "**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA RADIAÇÃO GAMA SOBRE O DESENVOLVIMENTO DE CÂNCER DE MAMA EM RATAS WISTAR**", decidiu, por unanimidade, **APROVAR** a referida Dissertação de Mestrado. Dessa forma, o(a) candidato(a) cumpriu todos os **requisitos** descritos no Regimento Interno do Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas e, portanto, a Comissão Julgadora declara que o(a) aluno(a) faz jus à obtenção do Grau de Mestre em Ciências Fisiológicas.

Vitória, 29 de agosto de 2022.

---

Prof. Dr<sup>a</sup>. Sonia Alves Gouvea

Universidade Federal do Espírito Santo (UFES) – Orientador

---

Prof. Dr. Elson Silva Galvão

Universidade Federal do Espírito Santo (UFES) – Titular interno

---

Prof. Dr<sup>a</sup>. Jacyra Soares

Universidade de São Paulo (USP) – Titular Externo

## DEDICATORIA

A minha mãe Hilda, por sempre acreditar em mim e por ter abdicado de sua vida em prol das realizações e da felicidade de seus filhos.

Aos meus irmãos, por toda preocupação, carinho e incentivo.

A meu esposo e a meus filhos, por todo amor, incentivo, apoio e compreensão. Nada disso teria sentido se vocês não existissem na  
minha vida.

É justo que muito custe, o que muito vale. (Santa Teresa D'Avila)

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente, a Deus, pois eu não seria capaz de atingir nenhum objetivo em minha vida se não fosse da sua vontade, por renovar a fé e a minha perseverança mesmo diante dos obstáculos encontrados na minha caminhada. Deus planejou tudo no qual eu conquistei até hoje, e certamente esta etapa se concretiza pela permissão dele. Meu Deus, teu amor, tua sabedoria, teu sustento me fez forte e capaz.

A minha família, em especial, a minha mãe, exemplo de força e de fé, que sempre lutou para que eu tivesse a oportunidade e o tempo para estudar. Mesmo com muitas dificuldades sempre mostrou o valor do estudo na nossa vida. Não tenho dúvidas, que sem a senhora, Mãe, eu não teria chegado até aqui. Aos meus irmãos que sempre acreditaram em mim e sempre me ajudaram nos momentos mais difíceis, como eu amo vocês. A minha irmã Claudia que durante dois anos se doou inteiramente e esteve como uma mãe pros meus filhos para que eu conseguisse caminhar. Kal você foi fundamental nessa conquista.

Ao meu esposo Marco Antônio, por caminhar comigo nessa jornada por me incentivar, compreender minhas ausências e cuidar dos nossos filhos tão bem. Obrigada por não ter deixado que eu desistisse. Minha eterna gratidão, primeiramente pela amizade e companheirismo durante todo o decorrer do mestrado, sofremos muito juntos. E de forma mais especial, gostaria de agradecer por todo amor, carinho, cuidado e compreensão. Obrigada pelo seu abraço e por se fazer tão presente na minha vida!

Aos meus filhos, razão da minha vida, obrigada pelo amor mais puro e sincero. Obrigada por cada beijo, por cada manifestação de carinho.

A minha Orientadora, professora Sônia, por ser uma pessoa de um coração incrível, por ter me acolhido em seu laboratório e ter compreendido todas as minhas incertezas e dificuldades. Meu eterno obrigada.

Ao meu Coorientador, professor Marcos Tadeu, pela disponibilidade e pelo conhecimento transmitido com muito zelo e responsabilidade.

Ao veterinário Leonardo da UFMG, que mesmo sem me conhecer pessoalmente, colaborou de forma impar na conclusão deste trabalho.

Aos amigos do Laboratório de Oncologia Clínica e Experimental (LOCE) por me acolherem e por dividirem um pouco do seu dia a dia comigo. Aos IC's, Taylor e Maira obrigada pelo apoio, pela ajuda nos experimentos e pela nossa boa convivência.

Aos colegas de outros laboratórios em especial Lais, Rayner, Leonardo e Felipe. Ao Charles por ter sido fundamental na conclusão deste estudo. Obrigado por todo apoio profissional e pelos grandes momentos de descontração. Isso fez com que os dias de trabalho ficassem muito mais prazerosos.

A todos os professores do programa de Ciências Fisiológicas, obrigada por dividirem um pouco do seu conhecimento e experiência de vida. Todos contribuíram muito para minha formação.

Aos Laboratórios Multiusuários de Histologia Molecular e Imuno-histoquímica, e ao Laboratório Multiusuário de Histotécnicas os técnicos envolvidos, em especial, a Viviane. Ao Biotério Central da UFES, a todos os seus funcionários, em especial ao Rodolpho. As Ratas que deram suas vidas para que esse trabalho fosse executado.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Espírito Santo (FAPES): Edital Universal FAPES nº 21/2018 pelo apoio financeiro.

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO .....	18
1.1 Epidemiologia .....	20
1.2 Radioatividade de fundo natural .....	21
1.3 Carcinogênese química mamaria em roedores .....	25
2.JUSTIFICATIVA .....	30
3 OBJETIVOS .....	32
3.1 Objetivo Geral .....	32
3.2. Objetivos Específicos.....	32
4 METODOLOGIA.....	33
4.1 Animais Experimentais.....	33
4.2 Protocolo Experimental.....	34
4.3 Protocolo de exposição à radiação monazítica.....	34
4.4 Avaliação do ciclo estral das ratas .....	36
4.2.3 Análise da medida indireta da pressão arterial sistólica (PAS) .....	38
4.5 Protocolo de extração de sangue .....	39
4.6 Protocolo de extração de material biológico .....	39
4.7 Avaliação Histológica .....	39
4.7.1 Preparação e análise de whole mount .....	39
4.7.2 Histomorfometria da Glândula e do tecido adiposo mamário .....	40
4.7.3 Histopatologia da glândula mamaria .....	40
4.7.4 Contagem de mastócitos.....	41
4.7.5 Depósito de colágeno.....	41
4.8 Detecção da Produção de Ânion Superóxido IN SITU por DHE .....	41
4.9 Analise dos Niveis de Estrogênio.....	42
5. ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	43
6. RESULTADOS .....	44
7.DISCUSSÃO .....	60

8. CONCLUSÃO .....	70
9. REFERÊNCIAS .....	71

## RESUMO

A cidade de Guarapari é bem conhecida pela presença de areia monazítica em suas praias. As areias monazíticas presentes nas areias da praia de Meaípe é uma fonte de radiação natural associada a diversos efeitos na saúde dos habitantes. Contudo, este é o primeiro estudo científico que avalia os efeitos biológicos da radiação da praia de Meaípe, bem como os efeitos cancerígenos dessa areia. Nesta investigação avaliamos os possíveis efeitos da radiação natural ( $3,61 \mu\text{Sv/h}$ ) emitida pelas areias monazíticas de Guarapari, sobre o desenvolvimento do câncer de mama em ratas Wistar por meio de um simulador físico de radiação gama construído com areias retiradas da praia de Meaípe. Induzimos o câncer com 7,12-dimetilbenzantraceno (DMBA), administrado por gavagem em ratas virgens e avaliamos o peso corporal, ciclo estral e pressão arterial durante o experimento. Após 26 semanas de indução ao câncer analisamos a morfologia, inflamação, níveis de estrogênio e estresse oxidativo. Além disso, identificamos e classificamos as lesões no 4º par da glândula mamária. A exposição à radiação liberada pelas areias monazíticas apresentou alterações antropométricas nos dois primeiros meses de experimentos dos grupos expostos a radiação e/ou induzidos ao câncer. A radiação não causou alterações na pressão arterial sistólica e diastólica. Todas as ratas do estudo apresentaram todas as fases do ciclo estral e as ratas expostas a radiação, apresentaram pequenas alterações na avaliação do ciclo tanto no início quanto no final. Os dois grupos expostos a radiação apresentaram níveis de estrogênio circulante maiores e menor deposição de colágeno no tecido adiposo. Não percebemos alterações na avaliação da inflamação por meio do número de mastócitos e nem alterações no estresse oxidativo avaliado pelo Dihidroetídio (DHE). Observamos o desenvolvimento morfológico anormal da mama, com reduzido número de botões terminais (terminal end buds-TEBs), terminais alveolares (AB) e lóbulos nas mamas das ratas induzidas ao câncer sem exposição à radiação ionizante. Além disso, as ratas induzidas ao câncer e expostas a radiação ionizante, apresentaram menor número de lesões cancerígenas quando comparadas ao grupo que foi induzido ao câncer sem exposição à radiação. Nossos dados mostram que a exposição contínua de ratas wistar a radiação gama natural foi capaz de aumentar o número de glândula mamária sem alterações cancerígenas, além de **impedir** o desenvolvimento de lesões classificadas como cribiforme. Dessa

forma, novos experimentos são necessários para determinar com mais precisão quais os efeitos benéficos da radiação das areias da praia de Meaipe na prevenção do câncer de mama.

Palavras-chaves: câncer de mama, radiação gama, DMBA, simulador físico de radiação gama, Guarapari.

## ABSTRACT

The city of Guarapari is well known for the presence of monazitic sand on its beaches. The monazitic sands present in the sands of Meaípe beach are a source of natural radiation associated with several effects on the health of the inhabitants. However, this is the first scientific study that evaluates the biological effects of radiation from Meaípe beach, as well as the carcinogenic effects of this sand. In this investigation, we evaluated the possible effects of natural radiation ( $3.61 \mu\text{Sv/h}$ ) emitted by the monazite sands of Guarapari, on the development of breast cancer in female Wistar rats, using a gamma radiation physical simulator built with sand taken from the beach of Meaípe. We induced cancer with 7,12-dimethylbenzanthracene (DMBA), administered by gavage in virgin rats and evaluated body weight, estrous cycle and blood pressure during the experiment. After 26 weeks of cancer induction, we analyzed morphology, inflammation, estrogen levels and oxidative stress. In addition, we identified and classified the lesions in the 4th pair of the mammary gland. Exposure to radiation released by monazite sands showed anthropometric changes in the first two months of experiments in groups exposed to radiation and/or induced to cancer. Radiation did not cause changes in systolic and diastolic blood pressure. All the rats in the study showed all phases of the estrous cycle and the rats exposed to radiation showed small changes in the evaluation of the cycle both at the beginning and at the end. The two groups exposed to radiation had higher circulating estrogen levels and lower collagen deposition in adipose tissue. We did not notice changes in the assessment of inflammation through the number of mast cells, nor changes in oxidative stress assessed by Dihydroethidium (DHE). We observed the abnormal morphological development of the breast, with reduced number of terminal buds (terminal end buds-TEBs), alveolar terminals (AB) and lobules in the breasts of rats induced to cancer without exposure to ionizing radiation. Furthermore, the rats induced to cancer and exposed to ionizing radiation had a lower number of cancerous lesions when compared to the group that was induced to cancer without exposure to radiation. Our data show that the continuous exposure of Wistar rats to natural gamma radiation was able to increase the number of mammary glands without cancerous changes, in addition to preventing the development of lesions classified as cribriform. Thus, new experiments are needed to determine more precisely the

beneficial effects of radiation from the sands of Meaipe beach in the prevention of breast cancer.

Keywords: breast cancer, gamma radiation, DMBA, gamma radiation physical simulator, Guarapari.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> classificação histológica dos tumores mamários malignos.....	18
<b>Figura 2:</b> Glandula mamária de uma rata wistar .....	26
<b>Figura 3:</b> Desenvolvimento de tumores mamarios em roedores induzidos quimicamente. ....	27
<b>Figura 4:</b> Configuração esquemática do simulador fisico de radiação gama .....	35
<b>Figura 5:</b> Valores médios da radiação equivalente mensal . ....	36
<b>Figura 6 :</b> Avaliação do ganho de peso em gramas (g) inicial e final das ratas em seis meses de estudo. ....	44
<b>Figura 7:</b> Avaliação individual das fases do ciclo estral inicial .....	45
<b>Figura 8:</b> Avaliação individual das fases do ciclo estral final. ....	46
<b>Figura 9:</b> Determinação dos niveis de estrogênio circulante. ....	47
<b>Figura 10:</b> Avaliação da pressão arterial sistólica.....	48
<b>Figura 11::</b> Avaliação da pressão arterial diastólica.....	49
<b>Figura 12:</b> Análise morfométrica da glândula mamária pela técnica whole mount. ....	51
<b>Figura 13:</b> Quantificação de ductos por àrea (A) e dipócitos (B). ....	52
<b>Figura 14:</b> Quantificação da deposição de colágeno nos ductos.....	53
<b>Figura 15:</b> Quantificação de mastócitos das glândulas mamarias. ....	54
<b>Figura 16:</b> Análise do estresse oxidativo das GMs.....	53
<b>Figura 17:</b> Alterações histopatológicas do tecido mamário de ratas .....	58
<b>Figura 18:</b> Evolução do carcinoma cribforme.....	59

## LISTA DE TABELA

<b>Tabela 1:</b> Resumo dos achados histopatológicos em mamas de ratas. ....	56
--	----

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIações

<b>AB1</b>	Terminal alveolar 1
<b>AB2</b>	Terminal alveolar 2
<b>ABs</b>	Terminais alveolares
<b>AhR</b>	Receptor Citosólico Aril-hidrocarboneto
<b>ARNT</b>	Proteína do Translocador Nuclear
<b>BEIR</b>	Riscos à saúde decorrentes da exposição a baixos níveis de radiação
<b>BSBS</b>	Rupturas de Fita Dupla
<b>Ca</b>	Cálcio
<b>Ce</b>	Cério
<b>D</b>	Diestro
<b>DHE</b>	Dihidroetídio
<b>DMBA</b>	7,12-dimetilbenzantraceno
<b>DNA</b>	Ácido Desoxirribonucleico
<b>DP</b>	Diestro-Proestro
<b>DRE</b>	Dioxin Regulatory Elements
<b>E</b>	Estro
<b>EPM</b>	Erro Padrão da Média
<b>ER</b>	Receptor de Estrogênio
<b>EROs</b>	Espécies Reativas de Oxigênio
<b>FSH</b>	Hormônio folículo estimulante

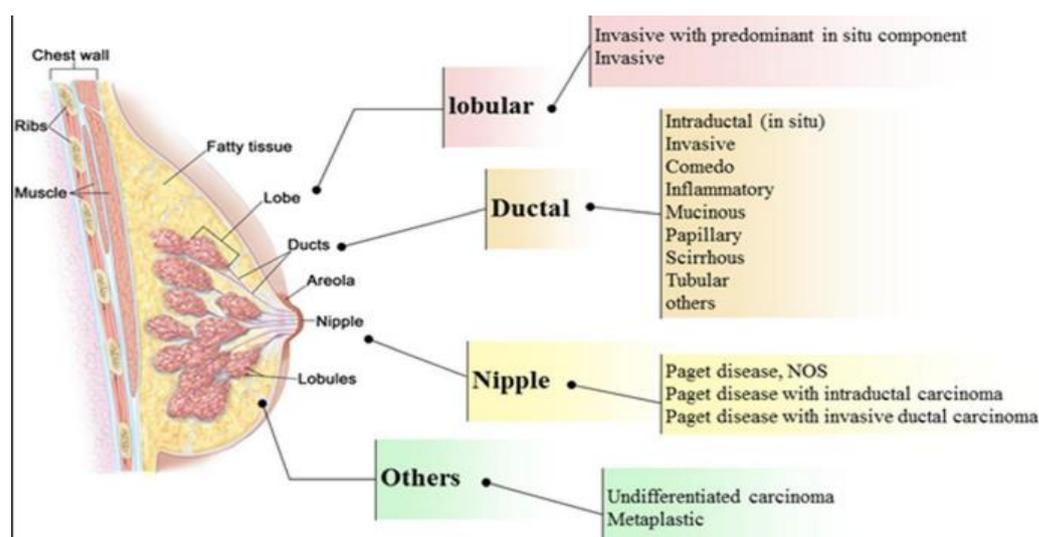
<b>GM</b>	Glândula mamaria
<b>HAP</b>	Hydrocarbonetos Aromáticos Policíclicos
<b>H&amp;E</b>	Hematoxilina e Eosina
<b>HER2</b>	Fator de Crescimento Epidérmico Humano
<b>IDCas</b>	Carcinomas Intraductais
<b>IDPS</b>	Proliferações Intraductais
<b>INCA</b>	Instituto Nacional do Câncer
<b>LET</b>	Transferência de Energia Linear
<b>LH</b>	Hormônio Luteinizante
<b>M1</b>	Metaestro 1
<b>M2</b>	Metaestro 2
<b>MMHG</b>	Milímetro de mercúrio
<b>MNU</b>	N-metil-N-nitrosourea
<b>MSv</b>	MicroSivert
<b>Nd</b>	Neodímio
<b>P</b>	Proestro
<b>P</b>	Fósforo
<b>PAD</b>	Pressão Arterial Diastólica
<b>PAS</b>	Pressão Arterial Sistólica
<b>PE</b>	Proestro-Estro
<b>PR</b>	Receptor de Progesterona

<b>OS</b>	Simulador Físico de Radiação Gama
<b>PVC</b>	Policloreto de Vinila
<b>Sv/h</b>	Sivert por hora
<b>TEBs</b>	Terminal end Buds
<b>TH</b>	Tório
<b>XRE</b>	Xenobiotics Regulatory Elements
<b>Y</b>	Ítrio

# 1 INTRODUÇÃO

O câncer de mama é uma das principais causas de morbidade e mortalidade feminina (GLOBOCAN 2020), sendo o segundo tipo de câncer mais comum no mundo. Estima-se que o crescente aumento no número de casos de pessoas acometidas com câncer no mundo inteiro, se dá principalmente pelo crescimento e envelhecimento da população, dentre outros fatores. Diante disso, a prevenção do câncer é um dos problemas mais significativos em saúde pública do século XXI.

Devido as diversas morfologias e fenótipos moleculares evidenciados nos tumores mamários, o câncer de mama não é uma doença singular, e sim um grupo heterogêneo de doenças que se apresentam com diversas respostas a terapia, probabilidade de recaída e sobrevivência geral em pacientes classificados com o mesmo tipo de tumor (Abreu & Koifman, 2002; SAÚDE & (Fiocruz), 2018; SILVA et al., 2017). De acordo com a morfologia do tumor, a Organização Mundial da Saúde (OMS), em conjunto com o American Joint Committee on Cancer (AJCC) e o National Cancer Institute (NCI), classificou as neoplasias mamárias em mais de 20 tipos (figura 1) com exceção do carcinoma medular (POURTEIMOOR *et al.*, 2016; SINN, KREIPE, 2013).



**Figura 1:** classificação histológica dos tumores mamários malignos segundo American Joint Committee on Cancer(AJCC) e o National Cancer Institute (NCL) 2015. Fonte: <http://www.cancer.gov> e <https://cancerstaging.org>.

O câncer de mama é originado no tecido mamário, mais comumente no epitélio ductal (83%) e lobular (13%) (MA *et al.*, 2018; ACS, 2017a). O tumor mamário pode comumente diferir bastante nos níveis histológicos e moleculares entre os portadores de doença e até mesmo dentro de um único tumor. Com base em suas características histológicas, os tumores de mama são amplamente divididos em dois subtipos, carcinoma de mama pré-invasivo ou *in situ* e carcinoma de mama invasivo. O carcinoma *in situ* é classificado em ductal ou lobular. O ductal é subclassificado de acordo com as características do tumor em cinco subtipos: comedo, cribforme, micropapilar, papilar e sólido (SAÚDE & (Fiocruz), 2018; SILVA *et al.*, 2017).

Os carcinomas invasivos são um grupo heterogêneo de tumores, com subtipos histológicos que constituem 5% de todas as lesões e incluem ductal infiltrante, carcinoma lobular invasivo, ductal /lobular, mucinoso, tubular, medular e papilar. O tipo mais comum, com cerca de 70 a 80% de todas as lesões invasivas, é o ductal infiltrante que ainda é subdividido em bem diferenciado, moderadamente diferenciado ou pouco diferenciado com base nos níveis de pleomorfismo nuclear, glandular, formação de túbulo e índice mitótico (LESTER SC *et al.*, 2009).

A mama é uma glândula caracterizada como dependente de hormônios (JENSEN E JORDAN, 2003). Assim, além da classificação morfológica, o tumor mamário é classificado de acordo com receptores hormonais, de crescimento e marcadores de proliferação (RUSSO & RUSSO, 2004; PEROU *et al.*, 2011; POURTEIMOOR *et al.*, 2016; DAÍ *et al.*, 2016). O hormônio estrogênio é o principal responsável pela proliferação do epitélio mamário normal e cancerígeno por isso, os tumores são classificados de acordo com a ausência ou presença de receptores: ER (receptor de estrogênio) PR (receptor de progesterona) e HER2 (fator de crescimento epidérmico humano) (Said *et al.*, 2016).

De acordo com esses receptores, o tumor pode ser classificado como: Luminal A (ER e / ou PR positivo e HER2 negativo); Luminal B (ER e / ou PR positivo e HER2 positivo); enriquecido com HER2 (ER/PR negativo e HER2 positivo) e Basal Like (câncer de mama triplo negativo) (Sun *et al.*, 2019). Essa classificação molecular

ajuda a determinar a terapêutica abordada, assim como o prognóstico da doença (M.B. Amin et al. (eds.), 2017).

## 1.1 Epidemiologia

O câncer de mama é o câncer mais comum entre as mulheres. É a neoplasia maligna mais incidente em mulheres na maior parte do mundo (Bray et al., 2018). De acordo com dados do **GLOBOCAM 2020**, o câncer de mama acomete uma em cada quatro mulheres diagnosticada com neoplasia no mundo. No Brasil, as estimativas de incidência em mulheres no ano de 2020 foi de 66.280 mil casos novos o que representa 29,07% do total de todas as neoplasias menos pele não melanoma. No entanto, não é uma patologia exclusiva feminina, dos casos notificados, 1% foi de homens, podendo assim, ser considerada como um acometimento raro no sexo masculino (**SEVERSON; ZWART, 2017**). Em 2019, o câncer de mama, foi a neoplasia com maior número de óbitos com 18.068 casos o que representou 16.4% de todas as mortes por neoplasia no Brasil (**SAÚDE & (Fiocruz), 2018**) (**INCA, 2019**).

Segundo o Concord-3, no Brasil, as estimativas de sobrevida em cinco anos foram de 76,9% (75,5-78) para o período de 2005 a 2009 e de 75,2% (73,9-76,5) para o período de 2010 a 2014. Vários fatores estão relacionados a diminuição das taxas de sobrevida, dentre eles está o diagnóstico tardio e as dificuldades de acesso ao tratamento adequado (**ALLEMANI, 2018**).

O câncer de mama é muito raro antes dos 30 anos, com o avanço da idade a predisposição aumenta vertiginosamente até os 50 anos e a partir daí, sofre uma desaceleração (LAGE, 2016)ação (**INCA, 2019**). O câncer de mama pode ter causas hereditárias ou esporádicas. Os de causas hereditárias representam de 5% a 10% dos casos em todo o mundo, são marcados pela mutação em nucleotídeos na linhagem familiar de células germinativas e tem tendência em ocorrer em mulheres mais jovens (**CANTINELLI et al., 2006**). Já os de causas consideradas esporádicas, decorrem de mutações somáticas adquiridas ao longo da vida e representam mais de 90% dos casos em todo o mundo (**GREENLEE et al., 2000**).

Dados do Instituto Nacional do Câncer (SAÚDE & (Fiocruz), 2018)(INCA) 2020, mostram que o Estado do Espírito Santo, apresentou 32,82% de casos novos de câncer de mama no ano de 2020. E segundo o painel oncologia do Sistema Nacional de Saúde do Brasil, a cidade de Guarapari registrou 31 casos de neoplasia maligna de mama no ano de 2020.

## 1.2 Radioatividade de fundo natural

Desde a explosão das bombas de Hiroshima e Nagasaki, vários estudos foram desenvolvidos em diversas regiões mundiais que apresentaram a relação da radiação ionizante de fundo natural com os efeitos biológicos e na saúde da população exposta a esse tipo de radiação. A radiação também tem sido exaustivamente estudada como um dos fatores para o desenvolvimento do câncer de mama (MC GREGOR *et al.*, 1977).

Estudos epidemiológicos revelaram a incidência de malformações congênitas induzidas pela exposição à radiação de fundo natural (Jaikrishan *et al.*, 2013); câncer na população adulta; caso-controle sobre fenda labial/palatina e retardo mental. No entanto, nenhum desses estudos apresentou prejuízos ou benefícios da radiação de fundo quando comparados aos habitantes expostos a radiação considerada de nível normal (Jain *et al.*, 2017).

A radioatividade natural é a principal fonte de irradiação interna e externa do corpo humano (UNSCEAR,2000). Essa irradiação pode ocorrer de duas formas: irradiação externa devido a emissão gama formada por elementos radioativos primários da crosta terrestre como potássio, urânio, tório e seus produtos de decaimento radioativo e a radiação interna, devido a ingestão da dieta ou inalação do ar (AQUINO,2010).

A soma da radiação cósmica e radioatividade natural do solo, ar, água e alimentos, expõe os habitantes de uma determinada área à uma radiação gama (UNSCEAR, 2000). De acordo com UNSCEAR (2008), a radiação de fundo natural é classificada como nível baixo (5mSv), médio (5-20mSv); alto (20-50mSv) e muito alto (>50mSv). No entanto, esses valores dos níveis de radiação, não são iguais em todo os países,

eles variam com base no nível de desenvolvimento, geologia dos solos, grau de exposição à radiação do ciclo nuclear e ao fator radioativo.

Em algumas regiões do planeta, devido ao processo de sedimentação que levam a formação de minerais contendo tório, a concentração de tório nas rochas alcalinas pode ultrapassar 500 Bq/kg. A monazita apresenta como um componente importante do elemento tório, sendo que o mesmo está presente sob a forma de fosfato (6% de tório e 0,3% de urânio). Ela é considerada um mineral de terras raras (Payne et al., 2008) totalmente insolúvel, presentes em algumas praias mundiais (UNSCEAR, 1993). Os radionucléicos em monazita pertencem a série do tório, mas também existe urânio. O Brasil comporta uma importante faixa de areia composta por esse material (RIEDEL EISENMENGER, 1999), com destaque aos depósitos de areia monazítica ao longo da costa atlântica, localizados no município de Guarapari (EISENBUD, 1987). As areias monazíticas presentes na praia de Meaipe, apresentam o tório (Th) e o ítrio (Y) na sua composição em associação com cério (Ce), neodímio (Nd), cálcio (Ca) e fósforo (P). Esses elementos conferem a praia de Meaipe, altos níveis de radiação que podem reduzir o crescimento de algumas cepas de bactérias (D' AZEREDO et al., 2022).

Há vários outros cenários no Brasil com exposições de atividades nucleares tais como Poços de Caldas, Arachá em Minas Gerais e Guarapari. Guarapari é um município localizado no litoral do Espírito Santo, possui uma população estimada em 124.859 habitantes e uma extensa área costeira (IBGE, 2019; UNSCEAR, 2017). Em meados dos anos 1960/1970 Guarapari ficou conhecida nacionalmente pelos altos níveis de radiação de fundo natural emitido pela areia monazítica. A areia monazítica foi identificada na areia da praia e nas principais ruas da cidade. No entanto, avaliações mais recentes mostraram que com o processo de urbanização ao longo dos anos, que levou a pavimentação das ruas, a construção de prédios e a extração de areia preta contendo monazita das praias, diminuíram os níveis de radiação deixando-os próximos da média global, com exceção de alguns pontos das praias e na vila de Meaipe (UNSCEAR, 2017). As praias de Meaipe (20 ° 44'17 "S, 40 ° 32'20" W), possui valores de radiação natural semelhantes aos de Kerala, na Índia (R. Veiga et al., 2006).

O conceito para os riscos ou benefícios da radiação no organismo é fundamentado na premissa que a energia é depositada no núcleo da célula para obter uma resposta. Assim, as células que têm seus núcleos atingidos são consideradas irradiadas (Dauer et al., 2010).

As células expostas à radiação podem apresentar instabilidade genômica ou respostas adaptativas na sua sensibilidade ou interação com outras células. Esse processo inclui reações de oxidação, alterações no ciclo celular, cascatas de sinalização, senescência e ou até apoptose e morte celular. No entanto, ainda não há um consenso sobre os efeitos sobre células irradiadas e célula que não sofreram ação da radiação (Dauer et al., 2010). As respostas adaptativas ocorrem onde as células, tecidos ou organismos irradiados por baixa dose, reduz os efeitos adversos de uma nova exposição a uma dose maior (Jain et al., 2017).

Tem sido mostrado que a irradiação tecidual em altas doses apresenta grande potencial carcinogênico, no entanto, ainda é pouco compreendido como esse evento celular acontece, seguido de inúmeras outras alterações moleculares, genéticas, e epigenéticas que se estabelecem até a consolidação de um tumor. De acordo com BEIR VII, a radiação de baixa dose pode causar riscos à saúde dos seres humanos. As células corporais irradiadas, o microambiente tecidual e os sistemas de defesa interagem entre si para minimizar ou eliminar os riscos de mutação celular. O funcionamento adequado, dos mecanismos que removem ou transformem as alterações induzidas pela radiação, podem diminuir os riscos de câncer. Estudos demonstram que o tecido normal pode suprimir a carcinogênese por meio dos genes supressores de tumor p53 e do fator de necrose do tumoral. Esse sistema de supressão bloqueia o ciclo celular até que ocorra o reparo ou modificação da frequência ou apoptose (Dauer et al., 2010).

Quando comparada com radiação de alta letalidade, a radiação gama deposita menos energia na célula e por isso pode ser caracterizada com menor poder de ação prejudicial à célula. O relatório BEIR VII, define radiação de baixa dose com valores de até 100 mSv/ano (0,1 Sv). Ainda há poucos enfoques associados à compreensão dos efeitos da radiação ionizante de baixas dose na saúde humana. No entanto, o conhecimento atual permite inferir, que a radiação ionizante atua na

estrutura celular do corpo e muitas das mudanças provocadas são tão complexas que os mecanismos de reparo fisiológicos podem não conseguir corrigi-las corretamente (Council, 2006).

Todas as proteínas e membranas celulares podem ser afetados pela exposição à radiação, e as consequências nessas estruturas podem ser causadas por danos diretos e radicais livres, gerando espécies reativas de oxigênio (EROs). As EROs interagem com as biomoléculas como DNA, proteínas e lipídios e produz lesões oxidativas. Da mesma forma, o dano a mitocôndria seguida das demais organelas, a relação entre células e tecido atuam nos efeitos da radiação ionizante de baixas doses (Dauer et al., 2010; Jain et al., 2017).

DAUER (2010), relata as modificações induzidas pela radiação de baixa dose no perfil de expressão gênica da resposta a danos no DNA e nos genes de reparo do DNA. Os danos causados no DNA direta ou indiretamente por baixas doses de radiação podem ser proporcionais aos danos provocados por doses mais altas. Após a exposição do corpo inteiro a 1 mGy de fótons ou elétrons de baixa transferência de energia linear (LET), cada célula é atravessada, em média, por um elétron, gerando, em média, duas lesões de DNA, incluindo uma quebra de fita simples, 4 1022 rupturas de fita dupla (DSBs), 1,5 1021 ligações cruzadas e 2,5 danos base. As exposições e transformações causadas no DNA, envolvem várias vias de sinalização que modificam muitos eventos que podem ser reparadores, protetores ou prejudiciais.

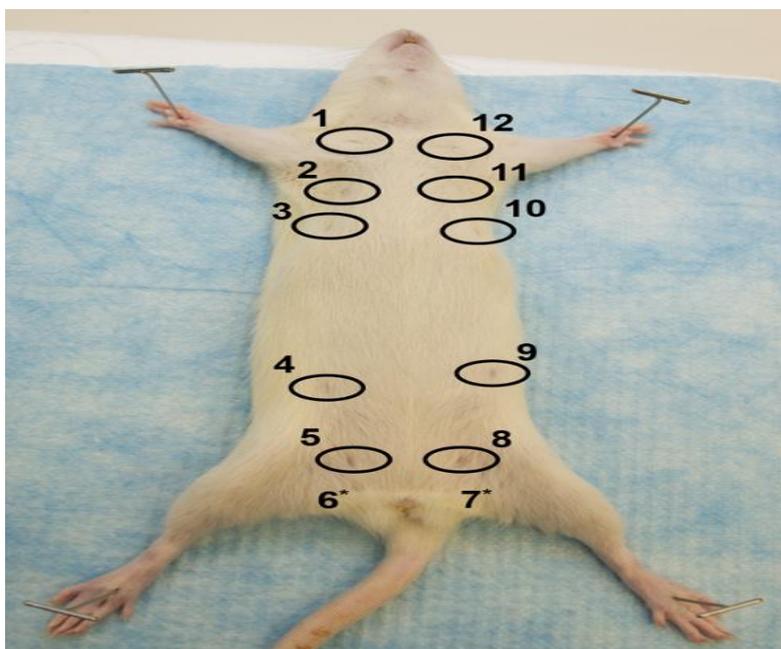
Desde a metade do século XX, a cidade de Guarapari é conhecida como cidade saúde devido ao possível efeito benéfico da areia monazítica presente em suas praias. Com isso, as praias de Guarapari, tornaram-se foco de estudos e interesses relacionado à saúde e economia (Nascimento Jr et al., 2010). Ainda não está claro quais os efeitos da radiação emitida pelas areias poderiam provocar sobre os organismos vivos. Traria efeitos benéficos? Poderia levar a uma redução do número de casos de mulheres com câncer de mama?

### 1.3 Carcinogênese química mamaria em roedores

Durante toda a vida, as células dos seres vivos sofrem agressões induzidas pelo processo de respiração oxidativa que geram espécies reativas de oxigênio. No entanto, as células possuem o sistema de correção dessas agressões inerentes ao DNA-polimerase. Quando esse sistema não consegue corrigir as falhas de manutenção do ciclo celular ou há um excesso de falhas, o sistema de correção satura e cria um ambiente propício para o câncer (FRUEHAUF & MEYSKENS *et al.*, 2007). O desenvolvimento de uma neoplasia é um processo longo que envolve as etapas de iniciação, promoção e progressão. Todas essas etapas são influenciadas por fatores genéticos (mutações pontuais, ampliações e deleções gênicas) e epigenéticos (metilação do DNA e metilação e acetilação de histonas). Resumidamente, a iniciação neoplásica é caracterizada pela exposição de células normais há uma quantidade excessiva de danos ao DNA no qual a capacidade de reparos embutido na DNA-polimerase fica saturada. Com a mutação consolidada, as células passam por um processo de expansão clonal e formam lesões consideradas pré-neoplásicas classificadas como período de promoção cancerígena. Na segunda etapa, os clones iniciados se multiplicam, acumulam mais mutações que aumentam a instabilidade genética. Na última etapa, denominada de promoção, as células sofrem mais mutações e adquirem características mais agressivas e passam a expressar o fenótipo maligno. Após essa etapa, as células ainda podem continuar o processo de mitose, com infiltração vascular e linfática e a colonização de tecidos distantes das células iniciadas (VINCENT & GATENBY, 2008; LIU *et al.*, 2015b).

Para compreensão de todo esse processo, muitos pesquisadores usam carcinógeno químico para induzir o câncer em animais, principalmente em roedores. E a glândula mamaria é um órgão altamente suscetível a indução cancerígena por indução de carcinógeno químico (RUSSO *et al.*, 1996). A glândula mamaria de uma rata é formada por seis pares de mamas localizadas no tecido subcutâneo, ventro-lateral das regiões cervical, torácica, abdominal e inguinal (figura 2). Cada glândula é formada por tecido epitelial ou parênquima e estroma; o estroma é formado por tecido conjuntivo, tecido adiposo, vasos sanguíneos e linfáticos, nervos, linfonodos e fibras de músculo liso (MASSO-WELCH *et al.*, 2000, GOUON-EVANS *et al.*, 2002).

De acordo com **RUSSO et al, 1996**, as ratas são consideradas o modelo ideal para essa indução do câncer de mama, pois possui a glândula com alto grau de suscetibilidade neoplásica e mimetiza a carcinogênese em seres humanos. Dentre as linhagens existentes, as mais utilizadas são Sprague-Dawley, Wistar, Furth e Fisher pois são mais susceptíveis a ação dos cancerígenos **(Russo et al., 2004)**. As substâncias mais utilizadas para indução do câncer mamário em roedores são o 7,12- dimetilbenz(a)antraceno (DMBA) e a N-metil-N-nitrosourea (MNU) **(RUSSO et al., 1994; RUSSO & RUSSO, 1996)**.

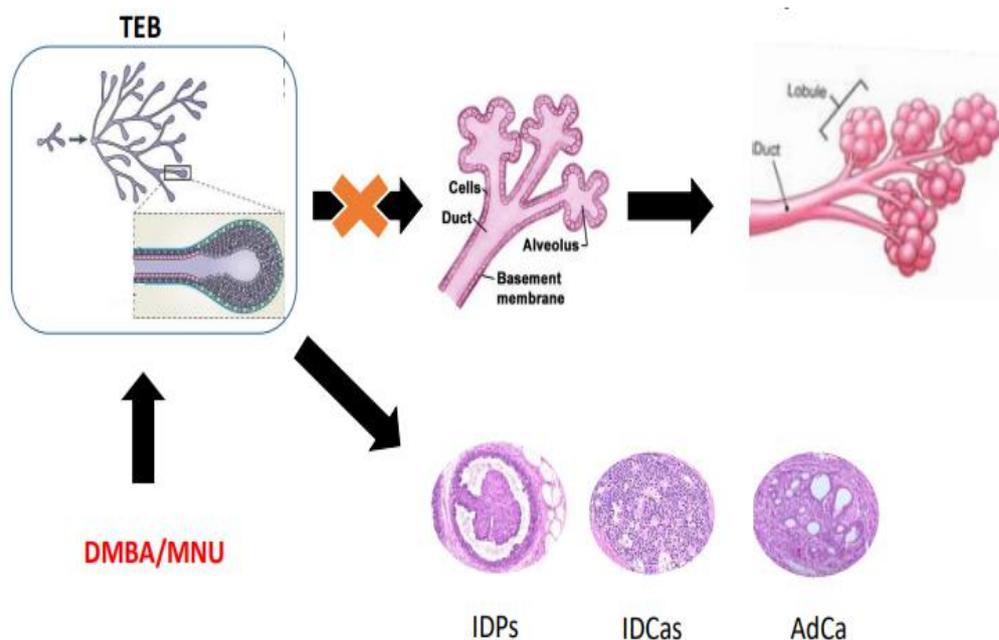


**Figura 2:** Glândula mamária de uma rato wistar: distribuição anatômica dos seis pares de mamas localizadas no tecido subcutâneo (1,12), ventro-lateral das regiões cervical (2,11), torácica (3,10), abdominal (4,9) e inguinal (5,6,8,7).

[https://cloudfront.jove.com/files/ftp\\_upload/55789/55789fig1.jpg](https://cloudfront.jove.com/files/ftp_upload/55789/55789fig1.jpg)

A glândula mamaria de uma rato virgem normal com idade entre 40-60 dias é formada por (terminal end buds) TEBs que evoluem para ductos e alvéolos e que culminam em lóbulos (figura 3). Os TEBs possuem alta taxa de proliferação e baixo índice de morte celular. No entanto, ao metabolizar um carcinógeno, geram metabólitos que causam danos ao DNA, por isso são os principais alvos dos carcinógenos químicos. Após a administração do DMAB/MNU a maioria dos TEBs se tornam mais espessos e formam as primeiras projeções papilares denominadas de proliferações intraductais (IDPS). Os TEBs que não sofreram ação do carcinógeno

continuam com o seu processo de desenvolvimento e se diferenciam em ABs. A junção dos IDPS forma microtumores que podem evoluir para carcinomas intraductais (IDCas) (RUSSO *et al.*, 1989; RUSSO & RUSSO, 2000; RUSSO & RUSSO, 2004).



**Figura 3:** Desenvolvimento de tumores mamários em roedores induzidos quimicamente. Os TEBs afetados pelo carcinógeno se tornam progressivamente mais espessos formando as proliferações intraductais (IDPs). Essas projeções se confluem originando os carcinomas intraductais (IDCas) e estes os adenocarcinomas (AdCa). Extraído de ZAPATERINE (2007)

O 7,12-dimetilbenzantraceno (DMBA) é um forte imunossupressor e carcinogênico, membro da família dos compostos hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HPA) que são um grupo de poluentes ambientais com efeitos cancerígenos, produzidos pela combustão completa de combustíveis fósseis (JUNG; WALLIG; SINGLETARY, 2006; MA *et al.*, 2018). Após a administração, o DMBA é biotransformado no fígado e tecido mamário e rapidamente absorvido pelo trato gastrointestinal e se acumula no tecido adiposo. Considerando o acúmulo de tecido adiposo na glândula mamária,

o DMBA, é amplamente utilizado na indução do câncer de mama pré-clínico (NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 1981).

O DMBA é um agente promotor de mutações nos genes responsáveis. Quando o DMBA é administrado, ele ativa o receptor citosólico aril-hidrocarboneto (AhR) que regula diretamente o crescimento celular. O DMBA é translocado para o núcleo por meio da ação de AhR e depois é associado à proteína do translocador nuclear AhR (ARNT), formando um complexo AhR / ARNT que induz a regulação positiva da enzima do citocromo P450 que metaboliza o DMBA em um intermediário epóxido mutagênico formando um aducto de DNA causando mutações. Esse processo é considerado um importante evento na carcinogênese mamária. Além disso, o DMBA induz o estresse oxidativo devido à geração de espécies reativas de oxigênio (EROs). O estresse oxidativo, por sua vez, desempenha um papel significativo na carcinogênese (Trombino et al., 2000).

O DMBA induz principalmente a lesão em ductos terminais resultando em hiperplasticidade do epitélio ductal e posteriormente cancerização de dutos. O complexo AhR /ARNT se liga especificamente em regiões do DNA conhecidas como Dioxin Regulatory Elements (DRE) ou Xenobiotics Regulatory Elements (XRE) (OLIVEIRA, 2006);(Rajendran et al., 2019).

Pelo seu potencial carcinogênico, o DMBA é amplamente utilizado na indução do câncer mamário em ratas e pode ser administrado via oral através de gavagem (Skrajnowska et al. 2015). A radiação ionizante também provoca alterações no ciclo celular. No entanto, esse processo ocorre durante toda a vida, apenas uma fração de células expostas à radiação pode ser mutada e evoluir para um câncer (Dauer et al., 2010). A radiação ionizante é um fator bem estabelecido para o risco de câncer por muitos autores, inclusive para o câncer de mama. Esses estudos, na grande maioria, medem algumas mudanças epigenéticas, mas não identificam quais mudanças previnem ou induzem ao câncer de mama. A indução de tumores em animais com carcinogêneo químico, é usado para obter informações sobre a processo de promoção e desenvolvimento de tumores mamários. (EIDEMULLER et al., 2015 ; HENDERSON et al. 2010 ; LITTLE E MCELVENNY 2017 ; MOSKOWITZ et al., 2014 ;RIVINA et al., 2016 ; RUSSO 2015), No entanto, não encontramos na

literatura, ensaios que induzem câncer de mama com substâncias químicas e expõe a radiação de fundo natural durante 24h por dia. Desta forma, o presente estudo induz câncer de mama com DMBA e propõe verificar os efeitos da radiação ionizante emitidas pela areia da praia de Meaipe sobre o desenvolvimento do câncer de mama em ratas Wistar.

## 2.JUSTIFICATIVA

Muitos estudos tem abordado os efeitos da radiação gama na saúde humana e animal, entretanto, ainda não foi possível determinar um limiar e linearidade de segurança para a saúde humana (ICRP, 2018). Muitas questões precisam ser elucidadas para a quantificação de possíveis danos ou benefícios desse tipo de radiação e quais os mecanismos estariam sendo ativados para promover as alterações induzidas pela radiação (Shibamoto & Nakamura, 2018).

Pesquisas recentes apontam efeitos protetores da radiação de baixa dose (Shibamoto & Nakamura, 2018). Esses estudos observaram efeitos anti tumorigênicos e de reparação tecidual, além de desenvolver ação antioxidante à exposição à radiação de fundo natural. Sharma et al., (2019), corroborou os dados anteriores apresentando um aumento de enzimas antioxidantes, diminuição da peroxidação lipídica nos rins e cérebro, além do aumento na contagem de leucócitos, linfócitos e eosinófilos utilizando raio x em ratas. No entanto, as células e tecidos germinativos são considerados mais sensíveis a exposição à radiação do que outros. A sua exposição à radiação gama pode causar danos como acelerar a idade reprodutiva, amenorreia e infertilidade (Said et al., 2016).

Outros estudos sugerem efeitos nocivos (MOLLER E MOUSSEAU ,2013) para a radiação de alta dose. Doses acima de 3 mSv<sup>v</sup> são consideradas como doses altas, capazes de induzir a tumorigenese e a carcinogênese, além de outros danos biológicos (LOU *et al.*, 2018). Veiga & Koifman, (2005) apresentam um crescimento significativo na mortalidade por diferentes tipos de câncer nas regiões com radiação de fundo natural.

Devido à crescente preocupação da ação dos fatores ambientais no risco de câncer de mama, uma melhor investigação da interação entre exposição corporal a radiação natural e desenvolvimento do câncer é fundamental para compreender o formato dose-radiação na região da baixa dose. Por isso, este estudo se justifica devido ao fato do câncer de mama, ser a patologia de maior incidência na população feminina mundial e Meaipe ser uma praia do litoral de Espírito Santo considerada

como a região que tem a maior incidência de radiação gama do Brasil frequentada por muitas pessoas anualmente (R. Veiga et al., 2006). Nessa perspectiva, o interesse deste estudo é desenvolver uma estimativa de riscos ou benefícios possíveis da exposição à radiação de baixa dose no desenvolvimento do câncer de mama feminino (Barcellos-Hoff, 2008).

Nesse contexto, após pesquisas realizadas, pouco foi observado na literatura sobre a relação da radiação de fundo natural com a promoção e/ou prevenção de câncer em mulheres. Os dados desses estudos são de mulheres expostas à radiação médica diagnóstica ou terapêutica e dos sobreviventes das bombas atômicas japonesas (RONCKERS; 2005). Sabendo que a glândula mamária, principalmente na idade jovem, é altamente sensível a carcinogênese associada a radiação, nosso grupo de pesquisa criou um simulador físico de radiação gama, para reproduzir a composição física da areia monazítica encontrada na praia de Meaipe, localizada na cidade de Guarapari, litoral de Espírito Santo. A partir desse protótipo, a hipótese é que a exposição de ratas de linhagem wistar induzidas ou não ao câncer de mama com DMBA, a uma radiação ionizante de aproximadamente 3,61  $\mu\text{Sv/h}$  leve a alterações benéficas para proteção contra o câncer de mama.

## **3 OBJETIVOS**

### **3.1 Objetivo Geral**

-Avaliar os possíveis efeitos da radiação natural emitida pelas areias monazíticas de Guarapari, sobre a mama de ratas Wistar com e sem indução de câncer.

### **3.2. Objetivos Específicos**

- Avaliar os efeitos da exposição à radiação sobre o peso das ratas;
- Avaliar os efeitos da exposição à radiação sobre o ciclo estral e níveis de estrogênio das ratas;
- Avaliar os níveis de pressão arterial;
- Analisar o perfil inflamatório das mamas;
- Avaliar o estresse oxidativo nas mamas;
- Comparar o desenvolvimento do câncer de mama das ratas expostas e não expostas à radiação;
- Analisar as alterações morfométricas e histopatológicas no desenvolvimento do câncer de mama nas ratas expostas e não expostas à radiação.

## 4 METODOLOGIA

### 4.1 Animais Experimentais

Foram utilizadas 32 ratas Wistar com ciclo regular, pesando entre 120 g e 300 g, com 7 semanas de idade, que foram mantidas em gaiolas de polipropileno (43 cm x 30 cm x 15 cm), disponibilizadas pelo biotério da Universidade Federal do Espírito Santo. As ratas jovens são mais sensíveis à indução do câncer de mama com DMBA (STANKO, 2016). Os animais foram mantidos sob temperatura controlada de 23 a 25°C em um ciclo de 12 horas de claro/escuro, com livre acesso à água e comida durante todo o experimento. O uso e o cuidado desses animais experimentais estiveram conforme as Diretrizes Brasileiras para Cuidado e Utilização de Animais para fins Científicos e Didáticos publicada pelo CONCEA (2017). Todos os protocolos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Animais da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES, nº 05/2018). Além disso, todos os experimentos foram realizados de acordo com as Diretrizes de Pesquisa Biomédica para o Cuidado e Uso de Animais de Laboratório disponíveis on-line e seguiram as recomendações das Diretrizes da Associação Americana de Medicina Veterinária (2007).

O experimento teve a duração de 26 semanas e foi organizado em quatro grupos experimentais com n=8 em cada grupo de ratas da linhagem Wistar: o grupo Sham recebeu solução salina; grupo Radiação, exposto a radiação; o grupo Câncer + Radiação, recebeu a dose de 160 mg/kg de DMBA e foi exposto a radiação e o grupo Câncer que recebeu a dose de 160mg/kg de DMBA. Os grupos Câncer+Radiação e Radiação, foram expostos a radiação durante 24horas por dia (3,61 µSv/ h).

As ratas foram mantidas em acompanhamento durante 26 semanas para observação do aparecimento e progressão do câncer de mama.

## 4.2 Protocolo Experimental

Embora muitos estudos tenham examinados os efeitos do uso do DMBA na indução do câncer mama, ainda não há um método padronizado. Neste Contexto, foi realizado um levantamento na literatura científica buscando encontrar dentre os existentes, as vias de administração e suas respectivas doses de DMBA. Com estas informações realizou-se um quadro comparativo da dose, via de administração e sua eficácia na indução do câncer de mama. Logo, o tumor mamário foi induzido com uma adaptação do protocolo descrito por [Stanko \*et al.\*, \(2016\)](#). O DMBA foi administrado com uma única dose oral, por gavagem de 160 mg/kg de DMBA dissolvido em 1 ml com (0.75 ml) de óleo de girassol e (0.25 ml) solução salina fisiológica. Os animais foram mantidos sobre condições normais durante 26 semanas, para posterior análise. Somente os grupos Câncer e Câncer + Radiação receberam dose oral única de 1 ml com 160 mg/kg de DMBA. O grupo sham recebeu uma dose oral simulada de 1 ml de solução salina (0.9%).

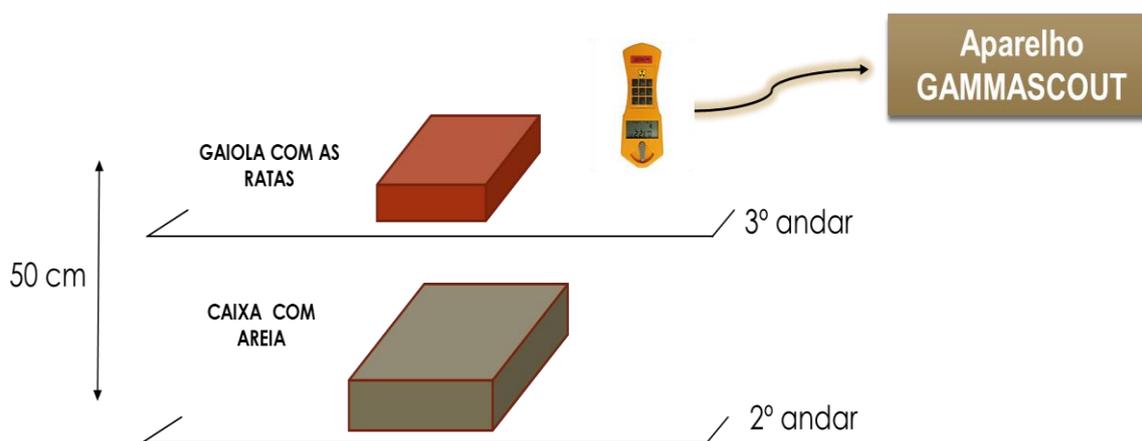
## 4.3 Protocolo de exposição à radiação monazítica

O simulador físico de radiação gama (PS) foi construído com uma amostra de areia, coletada em (20.739 ° S; 40.545 ° W), em 19 de março de 2017, representando uma taxa de dose extrema de radiação gama de cerca de 20  $\mu\text{Sv/h}$ . A areia coletada foi submetida a uma peneira com malha de 1 mm para remoção de conchas e pequenos pedaços de material orgânico. A areia foi então lavada com hipoclorito e seca por 8 horas em um forno a 120 °C, eliminando substâncias orgânicas e organismos vivos.

Para a montagem do PS, 20kg de areia limpa foi colocada em caixas (60 cm x 40 cm x 10 cm), ocupando 1/3 do volume de cada caixa. Entre as paredes da caixa e a areia, foi instalada uma chapa de chumbo com 2,5 mm de espessura para eliminar a emissão de radiação em todas as direções, exceto na direção normal da superfície da camada de areia. As gaiolas de PVC, cada uma com 4 ratas, foram instaladas em uma prateleira imediatamente acima deste conjunto, 50 cm alto. A intensidade de 3,61  $\mu\text{Sv/h}$  foi obtida usando gaiolas a uma distância vertical de 50 cm da areia monazítica. Essa geometria de isolamento permite simular a emissão a radiação

Gama original da praia da areia de Meaípe de forma direcional apenas para a parte superior da caixa.

As medições de radiação foram realizadas, a 10 cm de altura sobre a areia, usando um detector Gamma Scouter acoplado a um localizador GPS Etrex 10 (Garmin). As ratas foram irradiadas e não contaminadas. Logo fica claro que elas não ficaram emitindo nenhum tipo de radiação, uma vez que elas não ingeriram e nem injetaram nenhuma substância radioativa. A radiação do tipo Gama tem um alto poder de penetração, porém um alcance curto. Portanto, o revestimento de chumbo blindava a radiação em direções não desejadas (laterais e fundo). A radiação emitida pela areia oferece uma dose ultrabaixa variando entre 0,4 e 26 microSivert / hora na praia de Meaípe-Guarapari.

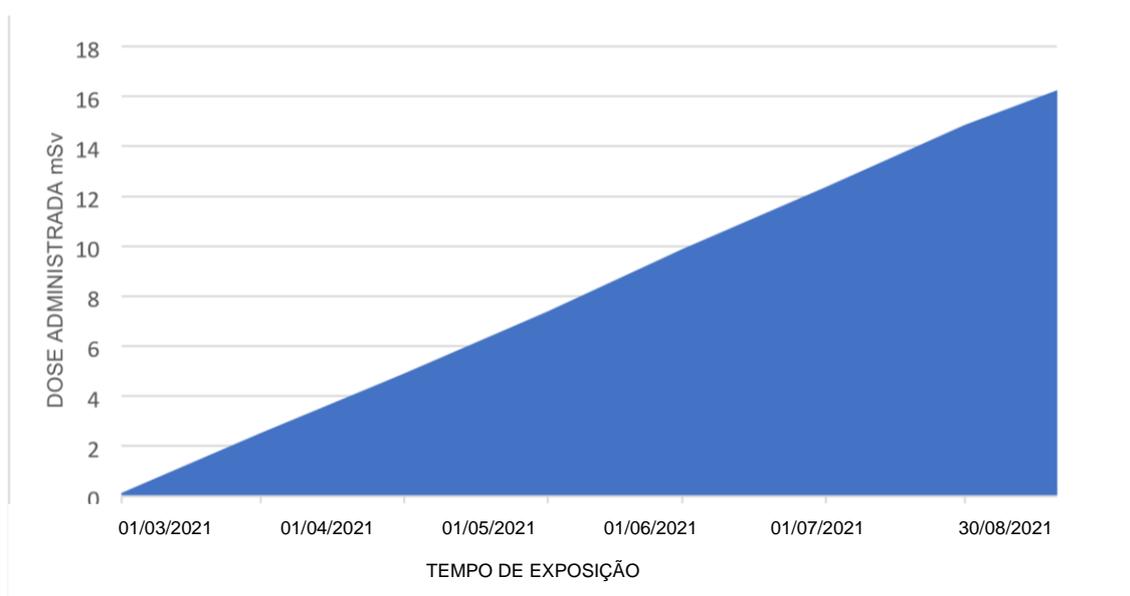


**Figura 4:** Configuração esquemática do simulador físico de radiação gama

O simulador físico de radiação gama, foi capaz de emitir radiação gama similar à encontrada nas praias de Meaípe no município de Guarapari. Por ser um ambiente aberto, a radiação nesse local não é homogênea e nem constante. No entanto, os animais do grupo, do Radiação e do grupo Câncer + Radiação foram expostos durante 24h a uma intensidade média de radiação de 3,61  $\mu\text{Sv/h}$ . O simulador físico de radiação usado neste estudo teve o registro da dose efetuada por um medidor de radiação gama denominado GAMMA-SCOUT, calibrado pelo Grupo de Física Aplicada da UFES. Esse equipamento gravou a dose de radiação em intervalos de

01 hora e ao final de cada intervalo armazenou a soma dos pulsos emitidos. O primeiro intervalo iniciou no dia 01/03/2021 às 10:26h e o último foi no 30/08/2021 às 07:20h da manhã. Portanto, a taxa de dose calculada reflete o valor correspondente à taxa média de pulso durante o intervalo examinado. A distribuição do pulso temporal dentro de um intervalo, não foi levada em consideração neste estudo, uma vez que o equipamento realizava a média no intervalo de 01 hora e a registrava.

A figura 5 mostra os resultados da radiação média equivalente na qual as ratas foram expostas. Durante o período do experimento as ratas receberam uma dose equivalente média de 0,00361 mSv/h, 0,0866 mSv ao dia 2,60 mSv/mês que totalizou uma dose acumulada de 15,0 mSv durante o período de 4.151 horas.



**Figura 5:** Valores médios da radiação equivalente mensal a que as ratas do grupo Câncer + Radiação e do grupo Radiação foram expostas.

#### 4.4 Avaliação do ciclo estral das ratas

O ciclo estral foi monitorado no intuito de verificar a regularidade do ciclo prevista de 4 a 5 dias. O material coletado foi avaliado por doze dias no início e quatorze dias no final do experimento. A ciclagem foi acompanhada através da coleta diária

do esfregaço vaginal de acordo com o protocolo adaptado DE MARCONDES e COLS, (2002). A secreção vaginal dos animais foi coletada diariamente entre as 8:00 e 10:00 horas da manhã, utilizando uma pipeta e ponteira adequadas contendo de 10 µL de solução salina (NaCl à 0,9%). O material foi adquirido através da inserção suave e superficial da ponta da ponteira na vagina da rata. O volume de salina era liberado no interior da vagina e, subseqüentemente, aspirado e colocado em lâminas histológicas de vidro devidamente identificadas de acordo com a caixa e o número do animal. Em seguida, essas lâminas foram analisadas no microscópio de luz (Bel Photonics FLUO-2) sem o uso da lente condensadora, com 10x e 40x lentes objetivas.

As fases do ciclo foram determinadas por citologia e pela consistência do muco vaginal, onde, quando observado muco pouco espesso com predominância de leucócitos, poucas células epiteliais nucleadas bem formadas, e pouca ou nenhuma célula cornificada, foi identificada como transição de diestro-proestro (DP). Quando o muco possuía consistência média, predominância de células nucleadas, de nenhum a poucos leucócitos degenerando, bem como, pouco a nenhuma célula cornificada, foi classificado como proestro (P). Se não havia leucócitos, presença de células nucleadas, predominância de células cornificadas e muco de consistência média, foi nomeada como transição proestro-estro (PE). Já, o muco com consistência média a muito denso e a presença apenas de células cornificadas, foi descrito o ciclo como estro (E). Se o esfregaço apresentou poucos leucócitos e predominância de células cornificadas maiores do que em estro, além de, muco com densidade média a muito espessa, classificamos a fase como metaestro 1 (M1). Na predominância de leucócitos, poucas células nucleadas e irregulares, poucas células cornificadas e muco com espessura de média para muito espesso, classificamos como metaestro 2 (M2). Ao observamos predominância de leucócitos e poucas células nucleadas com características irregulares, com muco pouco espesso, classificamos como diestro (D) (NELSON *et al.*, 1982).

A frequência total de cada fase observada neste período, para cada animal, foi utilizada para a duração das fases de proestro, estro e metaestro-diestro (em dia), bem como, a duração total do ciclo estral. Determinou-se a fase metaestrodiestro (M-D) devido às incertezas para classificar M1, M2 e D com precisão. Todas as

quantificações foram realizadas por um único observador (MARCONDES *et al*, 2002; BECKER *et al*, 2005; PODRATZ *et al*, 2015).

#### 4.2.3 Análise da medida indireta da pressão arterial sistólica (PAS)

A medida indireta da pressão arterial das ratas foi obtida por meio do registro da onda de pulso da porção proximal da cauda das ratas captada por um transdutor foto elétrico após inflação do manguito. A coleta de dados foi realizada nos animais de todos os grupos estudados, no tempo zero (antes da indução ao câncer e à exposição à radiação ionizante) e nos últimos quatro dias antes do sacrifício dos animais. As medidas foram realizadas de acordo com BUÑAG (1973) e modificada segundo GRIZZO *et al.*, (2008) através de um pletismógrafo de cauda (IITC Life Science– 23924 Victory Blvd, Woodland Hills, CA).

Antes do início da aferição da PAS, os animais passaram por processo de climatização durante três dias consecutivos para se adaptarem ao pletismógrafo e ao contentor e só assim foram feitas as aferições reais. O processo de climatização tem o intuito de minimizar alterações pressóricas devido ao estresse do novo ambiente e do procedimento. Com o aparelho calibrado, os animais foram acomodados em contentores de acrílicos de acordo com o tamanho do animal. A aferição foi feita em um animal por vez e coletados valores de três mensurações consecutivas e a média dessas medidas foi utilizada. Antes da coleta dos dados, os animais ficaram por aproximadamente 20 minutos expostos há uma temperatura de cerca de 32°C para obtenção de uma adequada vasodilatação caudal.

Os animais foram previamente climatizados, durante três dias antes da mensuração, para adaptarem-se ao pletismógrafo, e desta forma, prevenir alterações pressóricas devido ao estresse do animal frente ao procedimento. Após calibração do aparelho, os animais A, B, C e D foram acondicionadas em contentores de acrílico, selecionados de acordo com o tamanho do animal e mantidos em temperatura aproximada de 32°C por aproximadamente 20 min para obtenção de uma adequada vasodilatação caudal, sendo que a média de três medidas foi utilizada.

#### **4.5 Protocolo de extração de sangue**

Ao final do experimento, após a decapitação dos animais, foi coletado sangue em tubos plásticos com EDTA e centrifugado por 10 min, 4000 rpm a 4°C. Logo após, as alíquotas de plasma foram removidas e armazenadas a -80° para posterior análise dos biomarcadores bioquímicos.

#### **4.6 Protocolo de extração de material biológico**

Os animais foram pesados semanalmente. Eles foram submetidos à eutanásia por decapitação com guilhotina e foram dissecados seis pares de glândulas mamárias. Após a eutanásia os animais foram colocados em uma prancha de madeira, em decúbito dorsal com os membros mantidos em abdução. Após a tricotomia foi realizada a antissepsia em toda região abdominal com gases e solução de iodo. Em seguida os animais foram submetidos à laparotomia mediana para a coleta material biológico.

#### **4.7 Avaliação Histológica**

##### **4.7.1 Preparação e análise de whole mount**

As glândulas mamárias do 4º par do lado direito foram dissecadas e dispostas de forma esticadas em lâminas de vidro com dimensões de 50 x 76 mm, onde ficaram à temperatura ambiente por um tempo suficiente para que a glândula grudasse na lâmina, sem ressecar (cerca de 30 minutos). As lâminas contendo as glândulas foram então imersas em uma cuba de vidro contendo fixador carnoy (75% de ácido acético glacial, 25% de etanol absoluto), onde ficaram em temperatura ambiente por dois dias. Após o período, as lâminas foram lavadas em EtOH 70% e imersas em água destilada por 30 minutos. Em seguida, as lâminas foram transferidas para uma nova cuba de vidro contendo coloração de alumínio Carmim até a completa coloração (quando se observou os gânglios linfáticos corados). O tecido mamário corado foi desidratado em banhos de 1 hora em concentrações crescentes de soluções alcoólicas (70%, 95% e 100%). Após a última lavagem as mamas foram dispostas

em outra cuba contendo xilol por um período mínimo de 2 dias para deslipidação do coxim gorduroso mamário. Após esse processo, as lâminas foram armazenadas em cubas contendo salicilato de metila (HODSON LJ *et al.*, 2013; DE ASSIS *et al.*, 2010; PLANTE; STEWART; LAIRD, 2011). As glândulas mamárias coradas foram analisadas em microscópio óptico, em objetiva de 4 vezes. Delineou-se 3 regiões distintas em cada glândula, sendo elas, área próxima da papila mamária, área central e área distal (próxima da camada gordurosa). Dentro de cada uma destas regiões, cinco campos foram analisados onde os terminais alveolares 1 (AB1) e 2 (AB2) e lóbulos (L) foram contados (DA COSTA CS *et al.*; 2019; MONSEFI *et al.*, 2015).

#### 4.7.2 Histomorfometria da Glândula e do tecido adiposo mamário

O 4º par esquerdo das glândulas mamárias foi rapidamente removido e fixado em PBS-formol com pH 7,4 por um período entre 24 e 48 horas à temperatura ambiente. Em seguida, os tecidos foram desidratados em etanol, clarificados com xilol e embebidos em parafina 60°C. Após esse processo, os blocos de parafina foram cortados em micrótomo (Leica RM 2125 RTS), obtendo 3 secções (5 µm) por animal, com 50 µm de distância entre elas. Para a análise histológica, foi utilizado um sistema de imagem que consiste de uma câmera digital (Evolution, Media Cybernetics, Inc., Bethesda, MD) ligada a um microscópio de luz (Eclipse 400, Nikon). Imagens de alta qualidade (2048 x 1536 pixels) foram capturadas com o Pro Plus 4.5.1 (Media Cybernetics). Os tecidos foram corados com hematoxilina e eosina (H&E) e os protocolos de coloração estavam de acordo com BERTULOSO *et al.*, (2015). Um total de 10 micrografias por animal foram capturadas por um microscópio óptico em ampliação de 40x, e realizou contagem de adipócitos e ductos pela área das imagens. A avaliação da estrutura e arquitetura da glândula foram feitas usando o software de quantificação padrão Image J (PRODRATZ *et al.*, 2015; RAJAKUMAR *et al.*, 2018).

#### 4.7.3 Histopatologia da glândula mamária

Três secções histológicas de 5 µm do 4º par direito da glândula mamária das ratas foram usadas para identificação e classificação de lesões. As avaliações foram realizadas em microscópio de luz Eclipse E200, Nikon® por um único patologista.

Os critérios de avaliação do tecido mamário e a classificação das lesões, foram baseados no atlas de classificação histológica dos tumores da glândula mamária de ratas, propostas por **RUSSO E RUSSO (2000)**. Em uma objetiva de menor aumento, avaliou-se o tecido como um todo, abrangendo regiões de alvéolos e interstício, seguida de uma avaliação morfológica do epitélio de revestimentos dos ductos e túbulos, em uma objetiva de maior aumento. Os critérios de malignidade utilizados para classificar as lesões tumorais foram anisocitose, anisocariose, pleomorfismo celular e nuclear. As mitoses identificadas foram contadas na objetiva de 40 x, em 10 campos escolhidos aleatoriamente.

#### **4.7.4 Contagem de mastócitos**

Cortes histológicos foram corados pelo método de Alcian Blue. Em microscópio óptico, foram contados mastócitos presentes no tecido, sendo contado e as contagens realizadas e imagens obtidas foram capturadas por meio da câmera Leica acoplada a microscópio (ICC50 HD Leica Microsystems).

#### **4.7.5 Depósito de colágeno**

Três cortes de cada animal foram obtidos, depositados em lâminas de vidro, corados com Picrosirius Red para identificação e morfometria de fibras colágenas (área  $\mu\text{m}^2/\text{campo}$ ). As análises foram realizadas em programa FIJI versão 3.7.3 (ImageJ 2018). Ao todo, 10 campos de cada lâmina foram fotografados e utilizados para quantificação da deposição de colágeno no tecido adiposo e nos ductos. As imagens foram obtidas na câmera Leica acoplada ao microscópio (ICC50 HD Leica Microsystems).

#### **4.8 Detecção da Produção de Ânion Superóxido IN SITU por DHE**

A fluorescência oxidativa ao dihidroetídio (DHE) foi utilizada para avaliar a produção de ânion superóxido in situ, e os procedimentos foram semelhantes aos utilizados por Coutinho et al., (2016). Segmentos congelados do 3º par das glândulas mamárias, foram cortadas no criostato em 10  $\mu\text{m}$  de espessura e colocadas em lâminas gelatinizadas, congeladas até o momento do protocolo com DHE. No dia do

protocolo as lâminas foram mantidas em estufa a 37°C por uma hora para retirar o meio de inclusão. A seguir as secções de tecidos mamários foram incubadas com tampão Krebs-HEPES (8 mM HEPES, 2mM CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O, 130mM NaCl, 5mM KCl, 2,45mM MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O, 11,1mM glicose, pH 7,4), em idênticas condições por 30 min a 37°C. Foram então secadas e incubadas com solução tampão de Krebs-HEPES contendo DHE (2 µM) em câmara úmida e protegida da luz, à temperatura de 37°C por 30 min. Após este período as lâminas foram montadas com meio de montagem (ErvMount, Easy Path) e lamínula. Um total de 05 imagens por animal foram adquiridas em um microscópio de fluorescência de luz invertida (Leica DM 2500), com a objetiva de 40x e uma câmera Leica DFC 310 FX que foi utilizada para obter as fotos. A intensidade de fluorescência na região analisada foi calculada usando o programa Image J.

#### **4.9 Análise dos Níveis de Estrogênio**

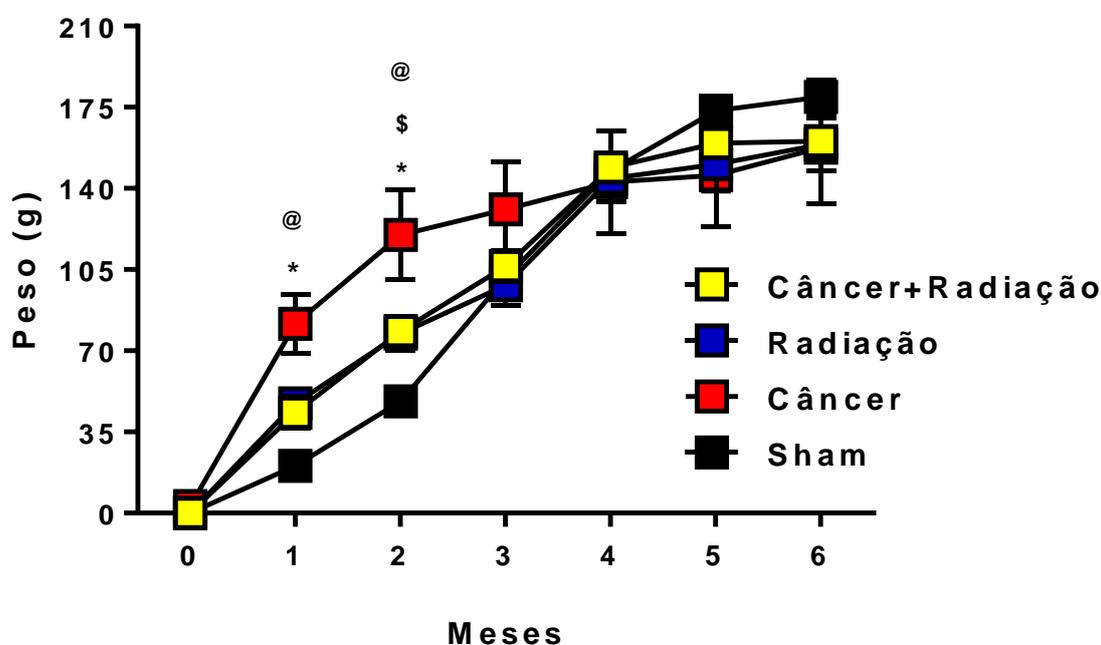
Amostras de soro (n= 5) foram obtidas para determinar os níveis basais de estrogênio (E2), foram medidos usando o kit ELISA (EIA-2693, DRG Instruments GmbH, Alemanha) (SENA *et al.*, 2017). Os protocolos foram realizados de acordo com a bula dos fabricantes.

## 5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM). Para encontrar possíveis outliers nos resultados, o teste de Grubbs bilateral foi usado. Quando o teste identificou um outlier, usamos um método ROUT adaptado para detectar quaisquer outliers daquela coluna de resultados e os removemos de acordo com a configuração de Q em 1% (alfa = 0,01). Os testes omnibus D'Agostino e Pearson foram usados para avaliar a normalidade dos dados. Comparações entre os grupos foram realizadas usando os testes t de Student e o teste de Mann-Whitney para dados gaussianos e não gaussianos. Um valor de  $p < 0,05$  foi considerado significativo. As análises estatísticas foram realizadas com o GraphPad Prism versão 6.00 (La Jolla, CA, EUA).

## 6. RESULTADOS

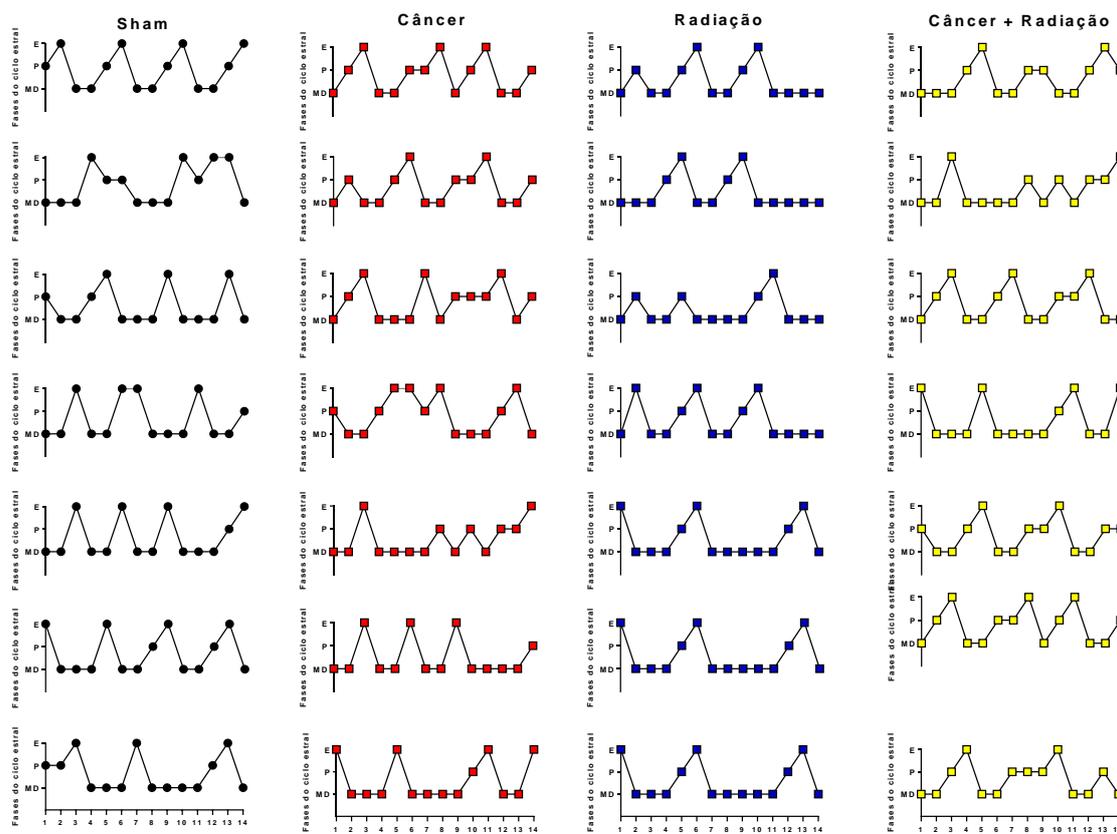
Neste trabalho a indução química ao câncer de mama com DMBA e exposição à radiação ionizante com as areias monazíticas apresentaram alterações significativas no ganho de peso do grupo Câncer nos primeiros dois meses de experimento. Nos dois últimos meses do experimento (Sham 95.84g  $\pm$ 27.98; Câncer 111.60g  $\pm$ 20.34; Radiação 96.69g  $\pm$ 22.46; Câncer + Radiação 99.61g  $\pm$ 23.55), o peso dos animais de todos os grupos se estabilizou e não apresentou diferença estatística. (Figura 6).



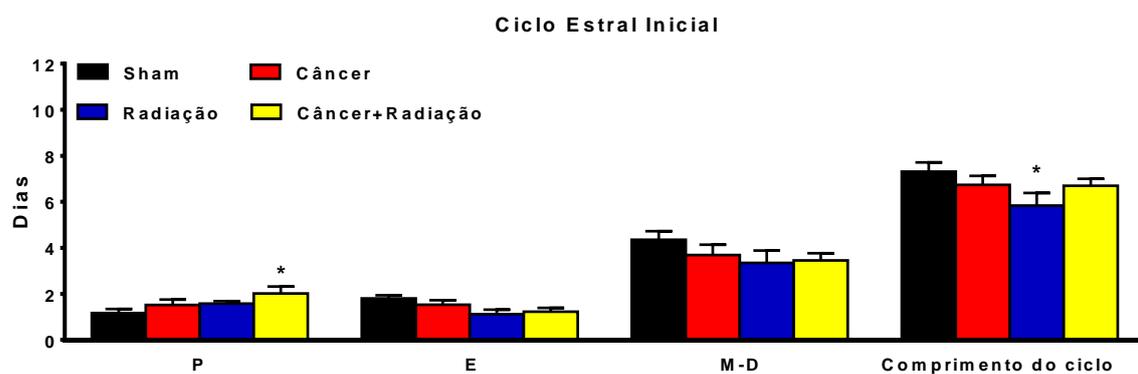
**Figura 6** : Avaliação do ganho de peso em gramas (g) inicial e final das ratas em seis meses de estudo dos grupos Sham, Câncer, Radiação e Câncer + Radiação (n=8). \*: p<0,05 vs Sham; \$:p<0,05 vs Radiação; @:p<0,05 vs Câncer+Radiação. Os valores foram expressos como MEDIA $\pm$  EPM.

Em relação ao ciclo estral inicial (figura 7) não houve anormalidades evidentes e as fases permaneceram constantes durante os 12 dias avaliados. No entanto, as ratas do grupo Câncer + Radiação esteve maior número de vezes na fase proestro e as ratas do grupo Radiação teve menor quantidade de ciclos quando comparadas aos demais grupos.

A



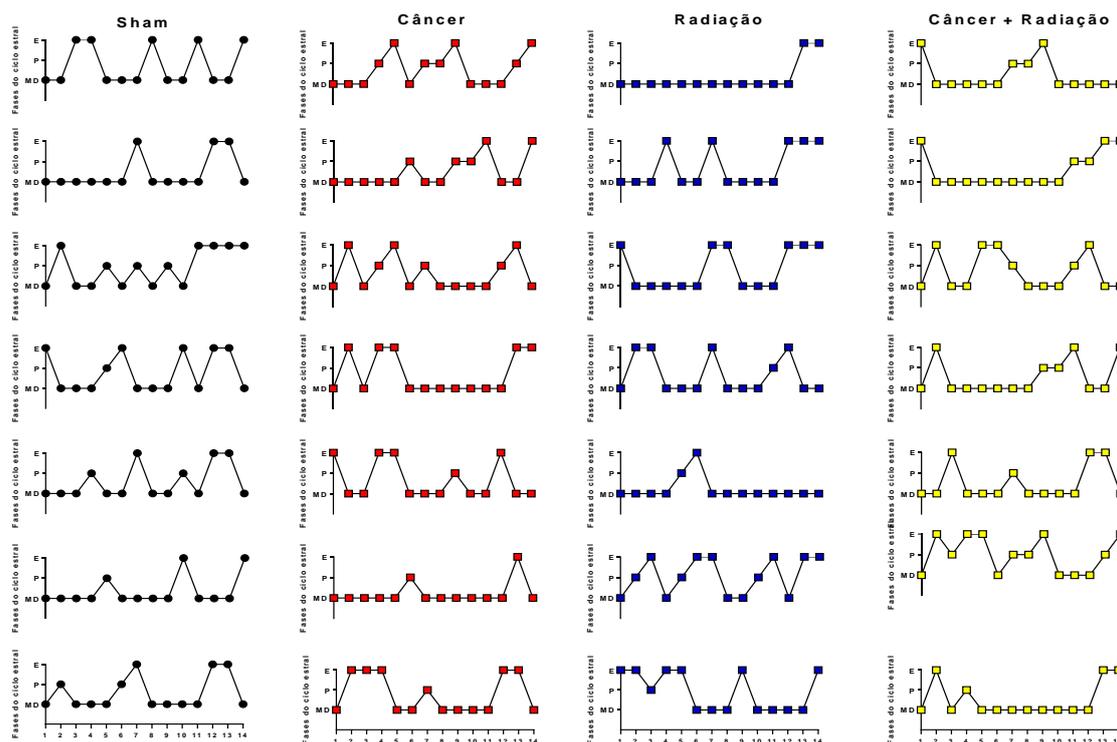
B



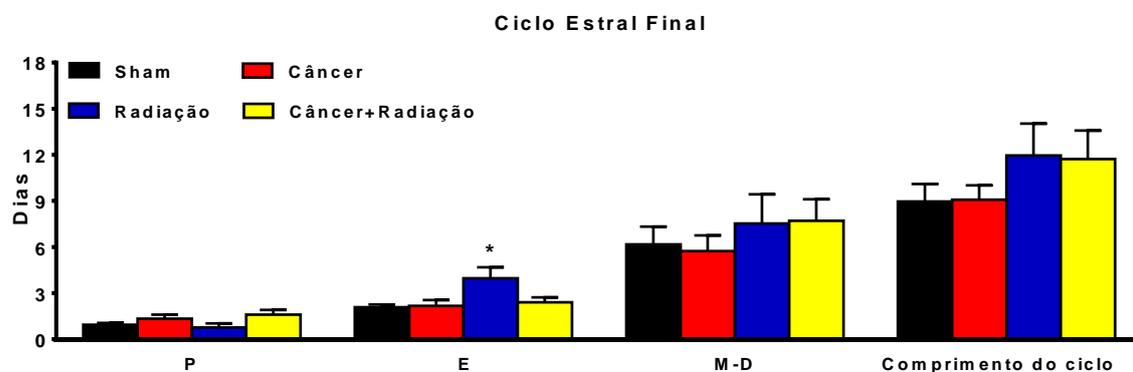
**Figura 7:** Avaliação individual das fases do ciclo estral inicial (A) das ratas durante 12 dias: estro (E), proestro (P) metaestro (M-D) dos grupos Sham (1,2d  $\pm$ 0,2) Câncer (1,5d  $\pm$ 0,2), Radiação (1,6d  $\pm$ 0,1) e Câncer+Radiação (2d  $\pm$ 0,3) \*: p<0,05 vs Câncer+Radiação. (B) Duração das fases de ciclo estral e duração total dos ciclos: Sham (1,8d  $\pm$ 0,1), Câncer (1,5d  $\pm$ 0,2), Radiação (1,1d  $\pm$ 0,2) e Câncer + Radiação (1,2d  $\pm$ 0,2). \*: p<0,05 vs sham; os valores foram expressos como MEDIA EPM n=7 \*p<0.05.

Nos últimos 14 dias de experimento foi possível constatar que o grupo Radiação permaneceu mais tempo na fase do ciclo estro quando comparado ao grupo sham. Nos demais grupos não houve alterações significativas no ciclo estro individual das ratas assim como na duração total das fases (figura 8).

A



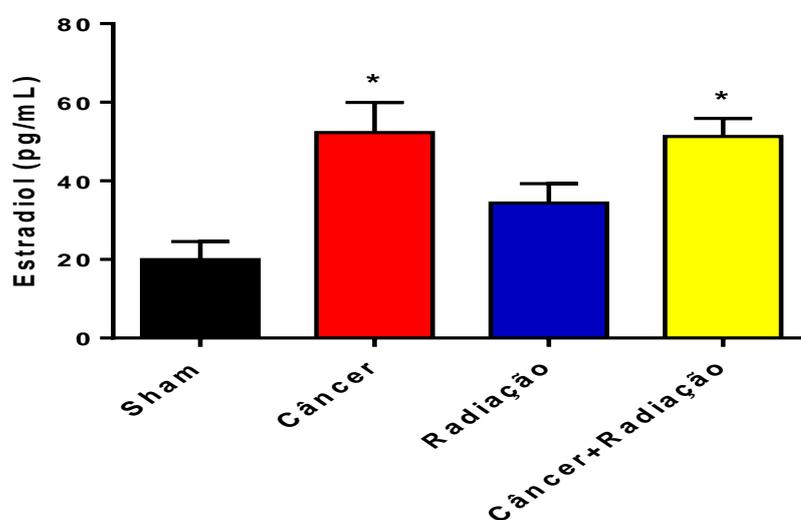
B



**Figura 8:** Avaliação individual das fases do ciclo estro final das ratas durante 14 dias (A): proestro (P), estro (E), metaestro (M-D) dos grupos Sham, Câncer, Radiação e

Cancer+Radiação \*:  $p < 0,05$  vs Sham. (B) Duração das fases de ciclo estral e sua duração total. Os valores foram expressos como MÉDIA  $\pm$  EPM  $n=7$ .

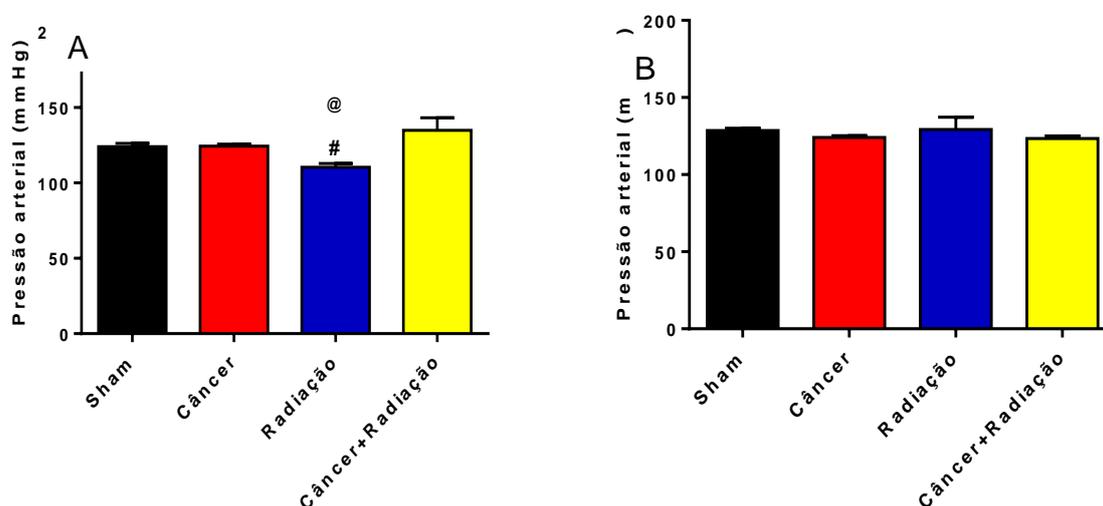
Os grupos Câncer e Câncer + Radiação apresentaram aumento significativo ( $p < 0,05$ ) no nível sérico de estradiol (figura 9) em comparação com o grupo Sham (19,9pg/ml  $\pm$ 4,6), Câncer (52,3pg/ml  $\pm$ 7,6) Radiação (34,4pg/ml  $\pm$ 4,8) Câncer + Radiação (51,2pg/ml  $\pm$ 4,6). Além disso, nenhuma diferença significativa foi observada nos demais grupos.



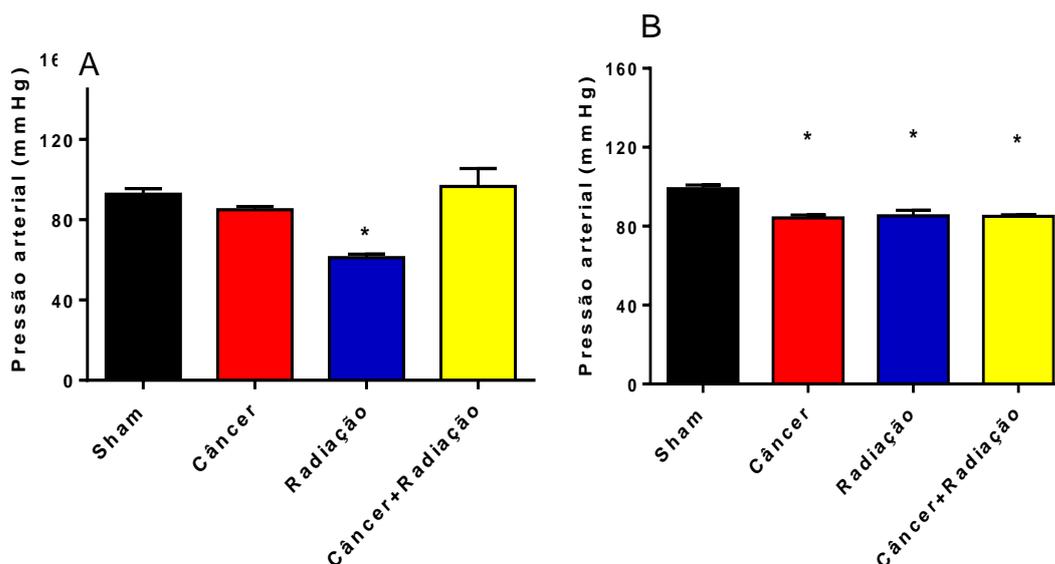
**Figura 9:** Determinação dos níveis de estrogênio circulante. Os valores foram expressos como MÉDIA  $\pm$  EPM.

A pressão arterial das ratas foi aferida na primeira e última semana após a indução ao câncer e exposição as areias monazíticas pelo método de pletismografia caudal (Figura 10). As ratas expostas à radiação (110  $\pm$  1) mmHg apresentaram redução significativa na pressão arterial sistólica quando comparadas aos grupos Câncer (124  $\pm$ 1) mmHg e Câncer+Radiação(134  $\pm$  8) mmHg . Essa diferença não foi evidenciada na aferição final da pressão arterial: sham (128,5  $\pm$  2) mmHg; Câncer (124,1  $\pm$ 1) mmHg; Radiação (129,3  $\pm$  7) mmHg; Câncer + Radiação (123,4  $\pm$  1) mmHg.

Na última semana de experimento, tanto a pressão sistólica inicial quanto final (figura 10 A e B) apresentaram diferenças. O grupo Radiação apresentou pressão arterial diastólica inicial menor (figura 10 A) quando comparada ao grupo Câncer e Câncer + Radiação. Já na pressão diastólica final (figura 11B), todos os grupos apresentaram pressão arterial menor quando comparados ao grupo sham. Pressão arterial diastólica inicial (figura 11 A): sham ( $92,7 \pm 2$ ) mmHg; Câncer ( $84,9 \pm 1$ ) mmHg; Radiação ( $61,1 \pm 1$ ) mmHg; Câncer + Radiação ( $96,6 \pm 8$ ) mmHg. Pressão arterial final: sham ( $99,05 \pm 1$ ) mmHg; Câncer ( $84,1 \pm 1$ ) mmHg; Radiação ( $85,2 \pm 2$ ) mmHg; Câncer + Radiação ( $85,05 \pm 0,7$ ) mmHg. Os valores foram expressos como MÉDIA  $\pm$  EPM  $n=8$   $p<0.05$ .

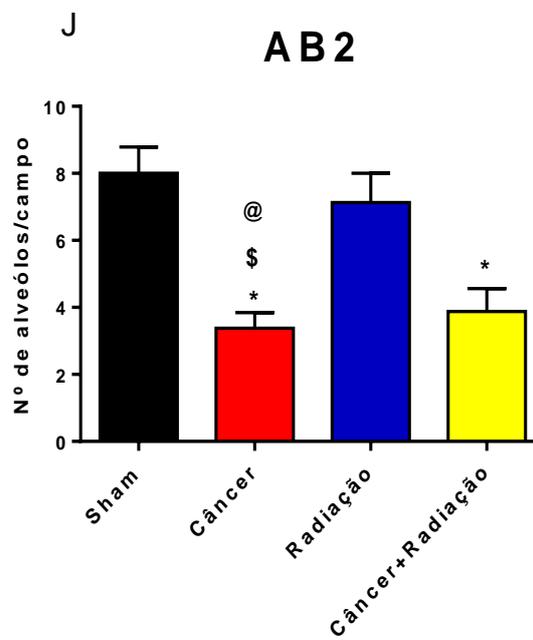
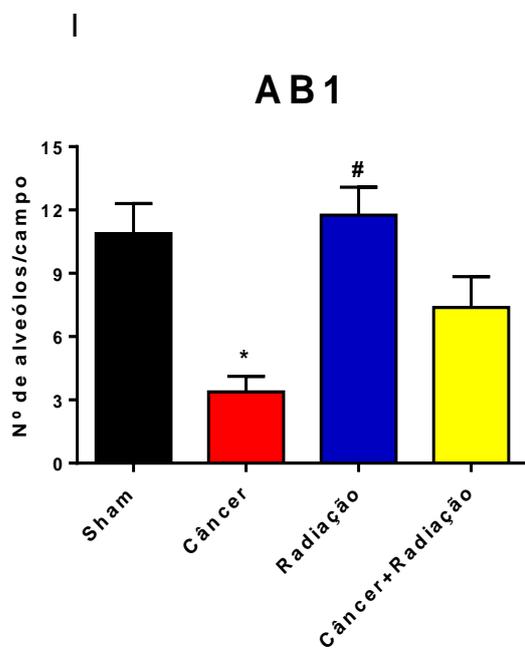
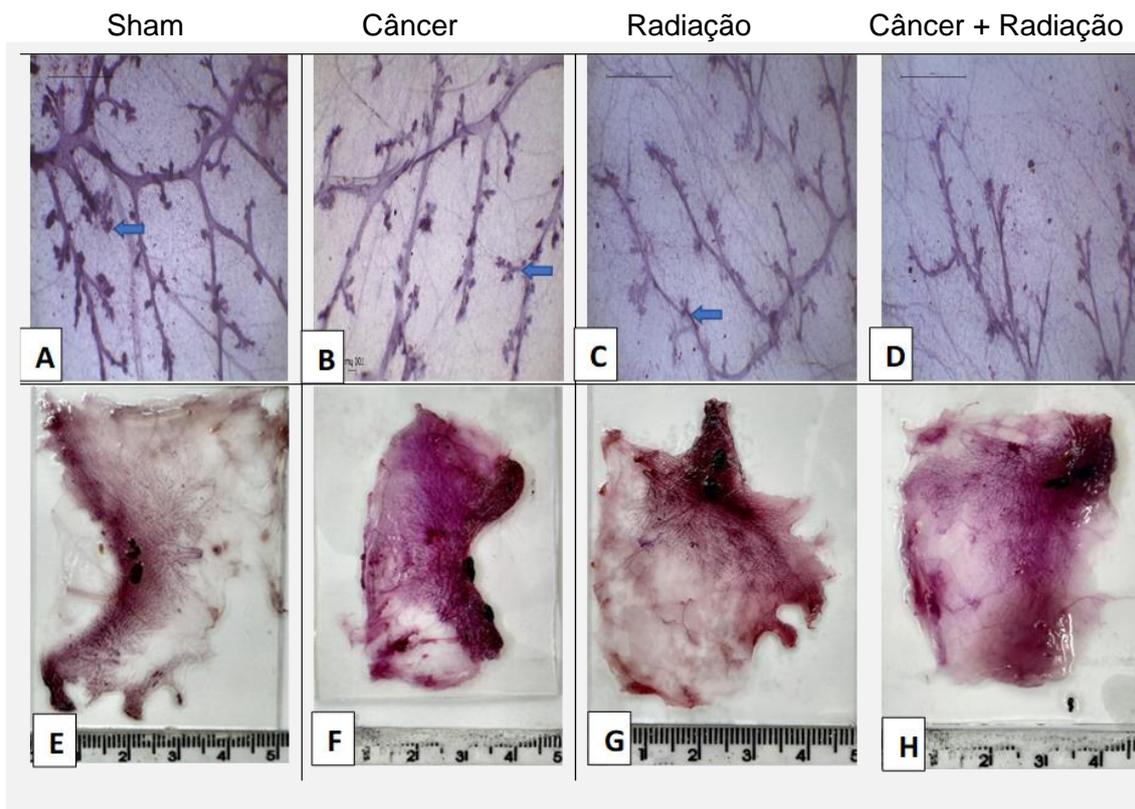


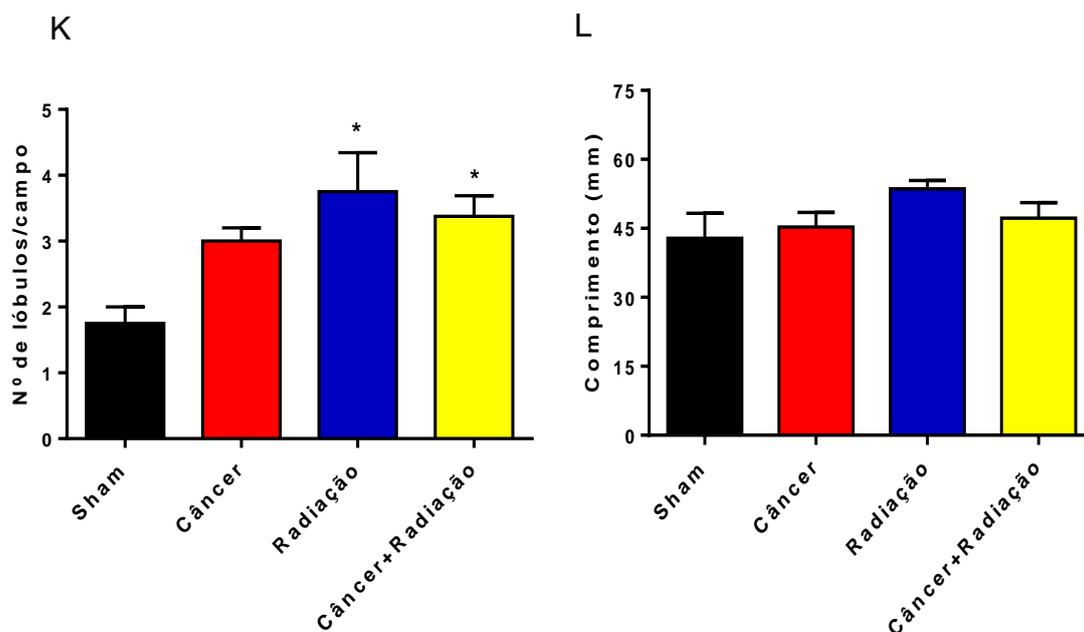
**Figura 10:** Avaliação da pressão arterial sistólica (A) inicial e (B) final das ratas na primeira semana de experimento avaliada pelo método de pletismografia caudal: #:  $p<0,05$  vs Câncer; @:  $p<0,05$  vs Câncer+Radiação. Os valores foram expressos como MÉDIA  $\pm$  EPM.



**Figura 11:** Avaliação da pressão arterial diastólica (A) inicial \*:  $p < 0,05$  vs Sham; Câncer; Câncer+Radiação e (B) final: \*:  $p < 0,05$  vs Sham das ratas avaliadas pelo método de pletismografia caudal. Os valores foram expressos como  $MEDIA \pm EPM$ .

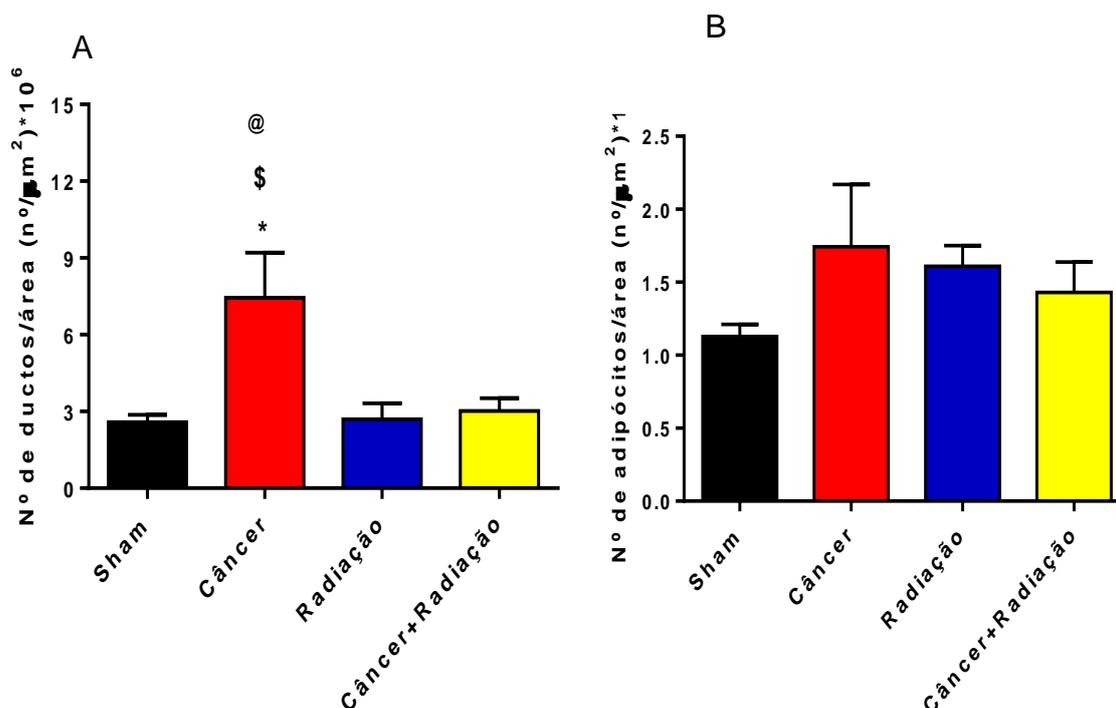
A técnica de whole mount realizada com o corante carmine permitiu analisar e quantificar as estruturas das glândulas mamaria das ratas (Figura 12 E, F, G e H), sendo observado por meio desta, a diminuição quantitativa dos alvéolos tipo AB1, tipo AB2 e lóbulos (Figura 12 A, B, C e D) nas ratas induzidas ao câncer. Com auxílio do software FIJI (Image J), foi realizada a quantificação dos alvéolos por campo do tipo AB1 (C e I) (Sham  $5,5 \pm 1,6$ ; Câncer  $6,3 \pm 1,3$ ; Radiação  $6,0 \pm 1,2$ ; Câncer + Radiação  $12,3 \pm 3,8$ ) e alvéolos por campo do tipo AB2 (B e J) (Sham  $3,7 \pm 1,1$ ; Câncer  $3,3 \pm 0,4$ ; Radiação  $3,3 \pm 0,6$ ; Câncer + Radiação  $3,8 \pm 0,6$ ) lóbulos por campo (A e K) (Sham  $3,3 \pm 0,3$ ; Câncer  $1,7 \pm 0,2$ ; Radiação  $3,7 \pm 0,5$ ; Câncer + Radiação  $3,0 \pm 0,2$ ) e comprimento (E, F, G, H e L) (Sham  $42,8\text{mm} \pm 5,43$ ; Câncer  $45,3\text{mm} \pm 3,1$ ; Radiação  $53,5\text{mm} \pm 1,8$ ; Câncer + Radiação  $47,2\text{mm} \pm 0,3$ ) dos grupos experimentais. As fotografias das glândulas mamarias foram utilizadas para medição da sua alongação (Distância medida a partir da área da papila mamária até o ponto mais distal da glândula mamaria). Contudo, não foram observadas diferenças nos parâmetros de alongação das glândulas.





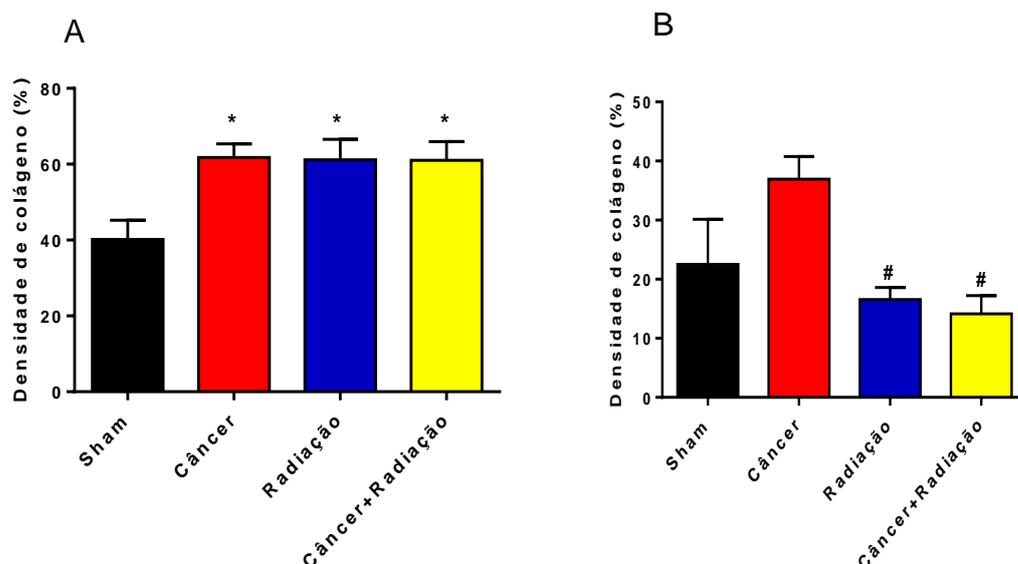
**Figura 12:** Análise morfométrica da glândula mamária pela técnica whole mount. Quantificação dos alvéolos por campo do tipo AB1, alvéolos por campo do tipo AB2 (B e J) ductos por campo (A e K) e comprimento (E, F, G, H e L) dos grupos experimentais. \*:  $p < 0,05$  vs Sham; #:  $p < 0,05$  vs Câncer; \$:  $p < 0,05$  vs Radiação; @:  $p < 0,05$  vs Câncer+Radiação. Os valores foram expressos como  $MEDIA \pm EPM$ . As setas das imagens representam estruturas mamarias: (A) Lóbulo, (B): AB2, (C): AB1.

A análise histológica pela coloração de H&E com auxílio do microscópio Leica acoplado a câmera ICC50 HD, permitiu a obtenção de fotos do tecido adiposo mamário das ratas para a quantificação de adipócitos e ductos por campo, com avaliação com o software FIJI. Observou-se por meio desta análise um aumento quantitativo no número de ductos no grupo Câncer ( $7,4\mu m^2 \pm 1,75$ ) quando comparados aos demais grupos (Sham  $2,5\mu m^2 \pm 0,2$ ; Radiação  $2,5\mu m^2 \pm 0,6$  Câncer + Radiação  $3,0\mu m^2 \pm 0,5$ ). Quanto aos adipócitos, não se observou nenhuma diferença entre os grupos do experimento. (Sham; Câncer; Radiação; Câncer + Radiação)



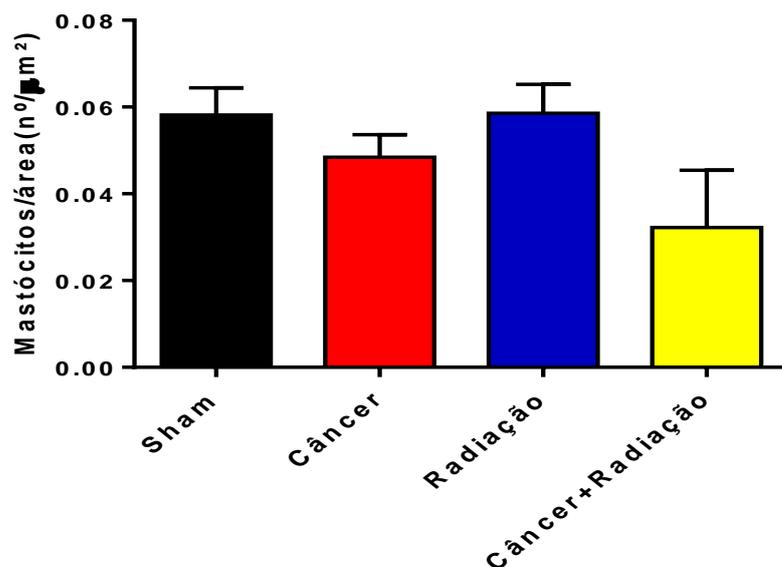
**Figura 13:**Quantificação de ductos por área (A) e dipócitos (B) por campo\*: p<0,05 vs Sham; \$:p<0,05 vs Radiação; @:p<0,05 vs Câncer+Radiação. Os valores foram expressos como MEDIA± EPM.

Secções histológicas coradas com Picrossírius red foram utilizadas para mensuração da deposição de colágeno em torno dos ductos mamários das ratas (Figura 14 A) e no tecido adiposo mamário (Figura 14 B). Com auxílio do software FIJI, as microfotografias obtidas dos cortes foram avaliadas e sua análise indicou aumento na deposição de colágeno nos ductos nas ratas dos grupos Câncer (61,78% ±3,57) Radiação (61,20% ±5,36) Câncer + Radiação (61,04% ±4,92) quando comparados ao grupo Sham (40,20% ±5,07). A deposição de colágeno no tecido adiposo foi reduzida de forma significativa nos grupos Radiação (16,55% ±2,05) e Câncer + Radiação (14,16% ±3,08) quando comparados ao grupo Câncer.



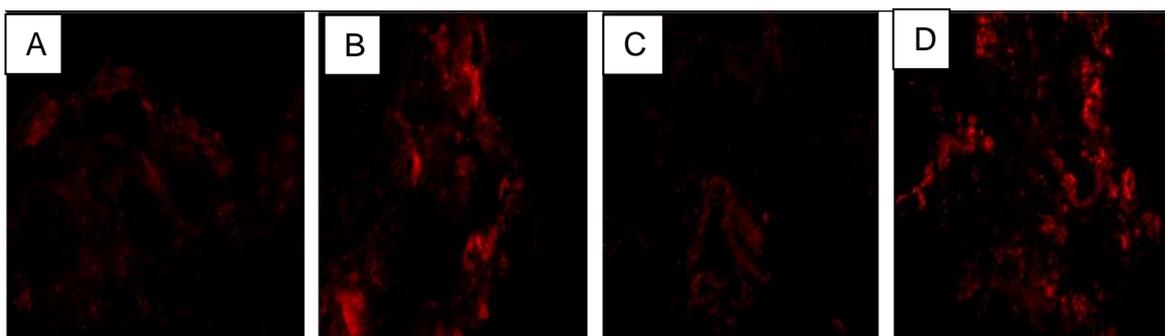
**Figura 14:** Quantificação da deposição de colágeno nos ductos:  $p < 0,05$  vs Sham. (A) e no tecido adiposo mamário. #: $p < 0,05$  vs Câncer. Os valores foram expressos como  $MEDIA \pm EPM$ .

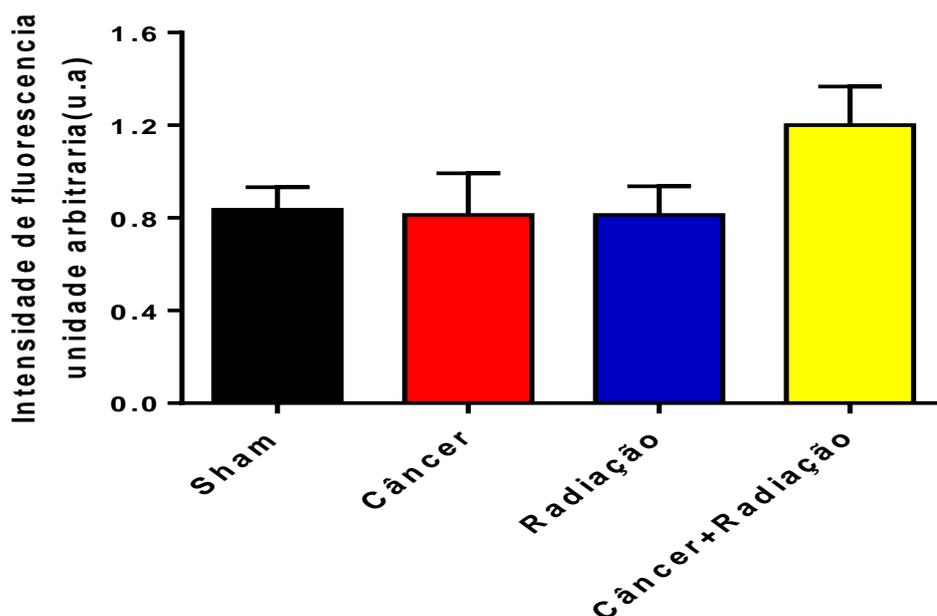
A inflamação na GM foi avaliada por contagem de mastócitos (figura 15), onde secções foram coradas com Alcian blue e as lâminas fotografadas na objetiva de 40x. A contagem permitiu observar o aumento significativo na quantidade de mastócitos no grupo Câncer ( $0,006 \mu m^2 \pm 0,005$ ) quando comparado aos demais grupos.



**Figura 15:** Quantificação de mastócitos das glândulas mamárias coradas com Alcian blue em contato com os ductos e por área de estroma. Valores expressos como média  $\pm$  EPM.

Criosecções de tecido mamário previamente emblocado em OCT foram incubadas com dihidroetídeo (DHE) para determinação da produção de ânions superóxidos ( $O_2^-$ ) (Figura 16). A análise proveniente desta técnica não permitiu observar aumento na produção de ânions superóxidos nas GMs das ratas dos grupos (Sham (0,8 u.a  $\pm$  0,09), Câncer (0,8 u.a  $\pm$  0,1), Radiação (0,8 u.a  $\pm$  0,1) Câncer + Radiação (1,2u. a  $\pm$  0,1)).





**Figura 16:** Análise do estresse oxidativo das GMs por meio de quantificação de fluorescência de DHE dos grupos Sham (A), Câncer (B), Radiação (C) Câncer + Radiação (D). Valores expressos como  $MEDIA \pm EPM$

Tabela com um resumo dos achados histopatológico das ratas dos grupos Câncer; Radiação; Câncer + Radiação; pela coloração H&E que permitiu a obtenção de fotos da glândula seguido de análises e avaliações realizadas em microscópio de luz Eclipse E200, Nikon® as cegas por um único patologista. O grupo Radiação apresentou o maior número de glândulas com hiperplasia ductal (42,85%) e sem alterações dignas de nota (57,14%); o grupo Câncer apresentou o maior número de célula com adenoma e com carcinoma cribriforme (37,5%).

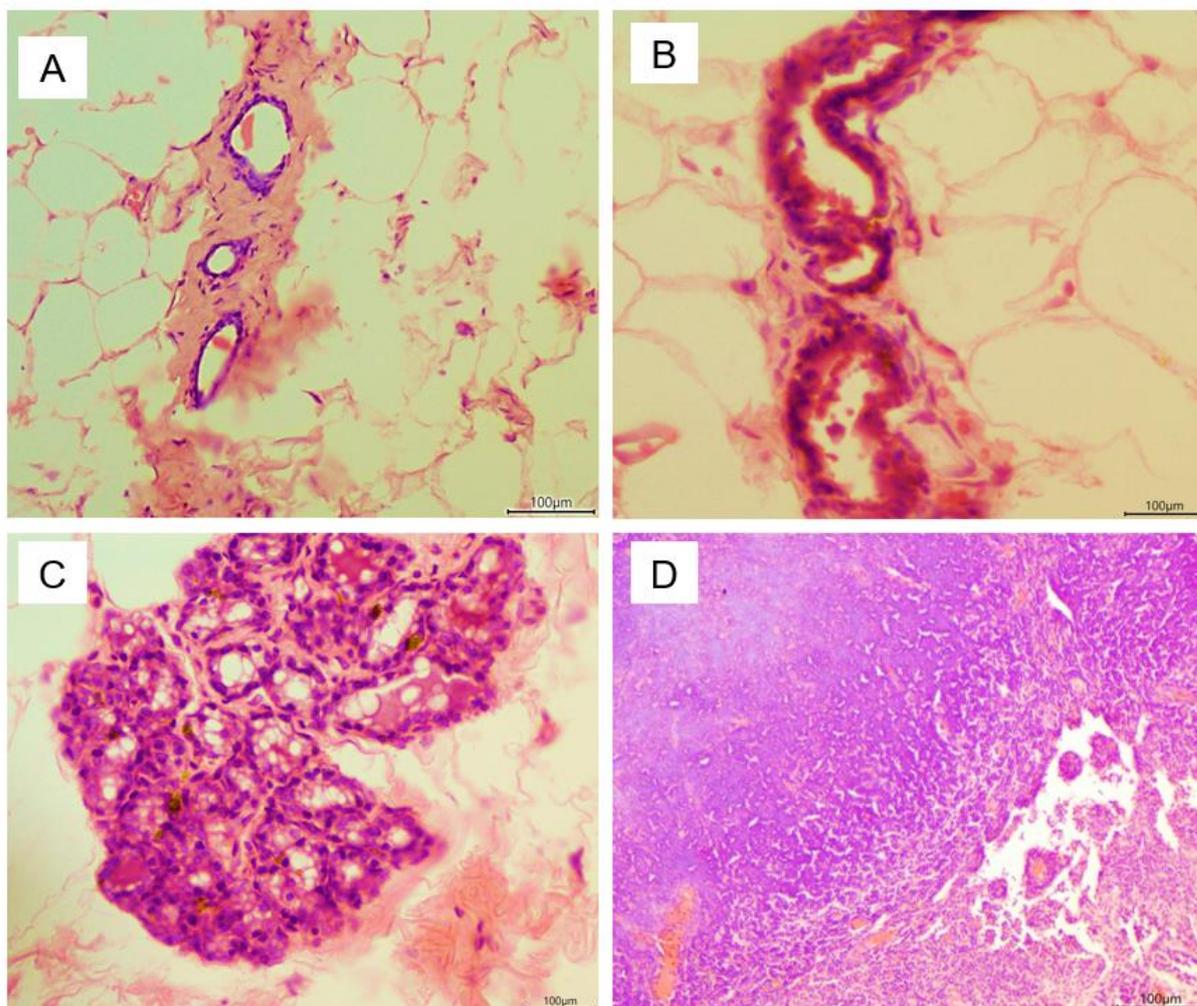
**Tabela 1:**Resumo dos achados histopatológicos em mamas de ratas.

	Sham	Câncer	Radiação	Câncer + Radiação
<b>Achados</b>				
<b>Hiperplasia ductal (%)</b>	0	25	42,85	22,22
<b>Adenoma (%)</b>	0	25	0	22,22
<b>Carcinoma cribriforme (%)</b>	0	37,5	0	22,22
<b>Sem alterações (%)</b>	100	12,5	57,14	33,33

%; porcentagem relativa ao número de animais por grupo.

Análise histopatológica do tecido mamário (figura 17) das ratas do grupo Sham; Câncer; Radiação; Câncer + Radiação; pela coloração H&E que permitiu a obtenção de fotos da glândula seguido de análises e avaliações realizadas em microscópio de luz Eclipse E200, Nikon® as cegas por um único patologista. A imagem (A) apresenta glândula mamária sem alterações dignas de nota com tecido constituído por poucos ductos e túbulos, revestidos por uma camada de células epiteliais cuboidais simples, com alta adesividade, citoplasma eosinofílico e pouco delimitado, núcleo ovalado a arredondado, cromatina espessa e nucléolos pouco evidentes. Anisocariose discreta, pleomorfismo nuclear discreto e não foram observadas figuras de mitose. Tecidos adiposo e mioepitelial sem alterações. A imagem B da glândula mamária apresenta hiperplasia ductal com tecido constituído por ductos e túbulos, revestidos por uma a duas camadas de células epiteliais cuboidais simples, que por vezes realizam projeções papilares para o lúmen. Células com alta adesividade, citoplasma eosinofílico e pouco delimitado, núcleo ovalado a arredondado, cromatina espessa e nucléolos pouco evidentes. Foi observado também discreta Anisocariose, pleomorfismo nuclear e não foram observadas figuras de mitose. As células alveolares estavam organizadas em monocamada, revestindo o lúmen dos alvéolos. As células epiteliais apresentaram citoplasma eosinofílico, com formato predominantemente cuboidal, núcleo ovalado, cromatina densa e nucléolos pouco

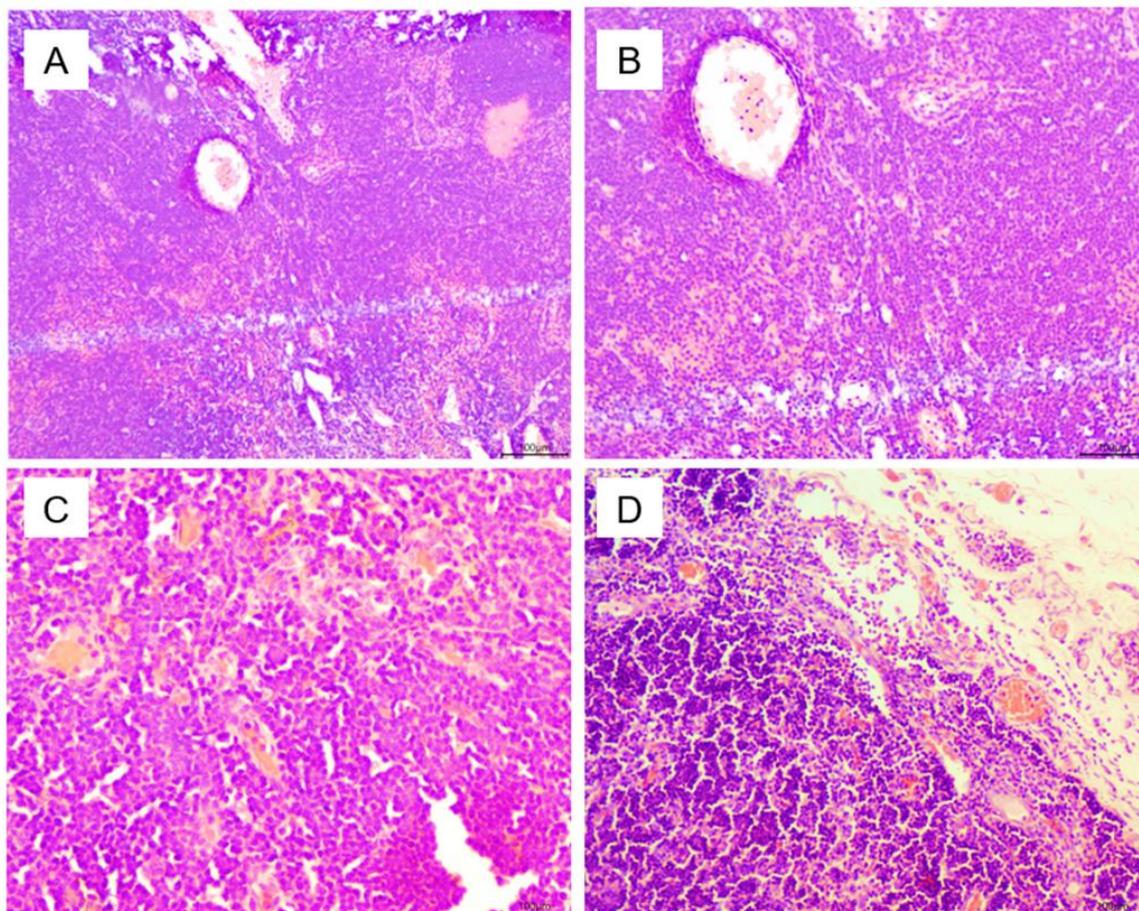
evidentes. Além disso as células apresentaram pouca quantidade de tecido conjuntivo intra alveolar. A imagem D apresenta Glândula mamaria com neoformação constituída por intensa proliferação de células epiteliais cuboidais simples dos ductos, que assumem um padrão sólido e, por vezes, formam lúmen secundário. Anisocariose e pleomorfismo nuclear moderados. Não foram observadas figuras de mitose. Discreta a moderada reação desmoplásica e neovascularização. A imagem C apresenta a imagem de um adenoma com tecido constituído por poucos lóbulos, que possuem alguns alvéolos revestidos por uma camada simples de células epiteliais cuboidais, com marcante vacuolização intracitoplasmática supranuclear. Núcleo ovalado, assumindo posição basal e cromatina densa. Anisocitose e pleomorfismo nuclear discretos, não sendo observadas figuras de mitose.



**Figura 17:** Alterações histopatológicas do tecido mamário de ratas (*R. norvegicus*), da linhagem Wistar, submetidas a radiação natural das areias monazíticas do litoral de Meaípe, Espírito Santo, e induzidos ao câncer com 7,12-dimetilbenzantraceno (DMBA). A) Glândula mamária sem alterações (grupo Sham); B) Hiperplasia ductal, caracterizada por formações de projeções papilares do epitélio para o lúmen do ducto; C) Adenoma mamário, exibindo células epiteliais alveolares apresentando citoplasma vacuolizado (\*) e núcleo localizado basalmente; D) Carcinoma cribiforme induzido por 7,12-dimetilbenzantraceno, caracterizado por uma intensa proliferação de células epiteliais neoplásicas, que assumem padrão sólido (seta). Hematoxilina e eosina, Bar= 100µm.

Imagens histológicas da evolução do carcinoma (figura 18) encontrado no grupo induzido ao câncer sem exposição à radiação. Seções do 4º par da glândula mamaria foi corada com H&E que permitiu a obtenção de fotos da glândula seguido de análises e avaliações realizadas em microscópio de luz Eclipse E200, Nikon® as cegas por um único patologista. A imagem A mostra a neoformação epitelial maligna com

aspecto sólido; a imagem B apresenta formação de lúmen secundário entre as células tumorais; a imagem C mostra a neovascularização entre células epiteliais e a imagem D mostra células epiteliais malignas e neovascularização na borda do tumor.



**Figura 18:** Evolução do carcinoma cribforme, diagnosticado na glândula mamaria de ratas submetidos a indução ao câncer pelo 7,12 dimetilbenzantraceno. A) Neoformação epitelial maligna assumindo aspecto sólido; B) Formação de Lúmen secundário entre células tumorais (seta); C) Neovascularização entre as células epiteliais; D) Células epiteliais malignas e neovascularização na borda do tumor (seta) Hematoxilina e eosina, Bar= 100µm.

## 7.DISCUSSÃO

Este estudo é pioneiro em avaliar os possíveis efeitos da radiação natural encontrada nas areias monazíticas da praia de Meaípe (Guarapari-ES), sobre o desenvolvimento do câncer de mama em ratas Wistar. Para isso, foram formados grupos experimentais de ratas que foram expostas a radiação, induzidas ao câncer e após 26 semanas de indução ao câncer com DMBA e/ou exposição à radiação, foi possível identificar, analisar e comparar os efeitos da radiação no processo de desenvolvimento e estabelecimento do câncer mamário. A simulação foi realizada com as areias retiradas da praia de Meaípe no município de Guarapari, pois a cidade possui uma das maiores taxas de radiação de fundo natural do mundo e é conhecida no estado do Espírito Santo como cidade saúde devido à presença dessas areias nas praias.

Resumidamente, nosso trabalho fornece evidências que a exposição à radiação ionizante não causou alterações na pressão arterial. As estruturas mamárias AB1 e AB2, estiveram aumentadas nos grupos irradiados, e esse dado demonstra que as mamas das ratas induzidas ao câncer tiveram menos TEBs acometidos pelo carcinogênico. Esse achado foi evidenciado também no número de lóbulos que estava maior nos grupos tratados com radiação ionizante demonstrando assim a progressão do desenvolvimento sadio da glândula. Além disso, os números de ductos foram menores no grupo que associou radiação e indução do câncer. Nosso achado principal culminou com o número de ratas acometidas com lesões na glândula mamária. O grupo induzido ao câncer e exposto a radiação apresentou menor porcentagem de câncer cribriforme, considerado o mais agressivo, e maior taxa de mamas sem alterações quando comparado ao grupo que foi induzido ao câncer sem exposição à radiação.

Alguns pesquisadores ainda se contrapõem quanto aos efeitos biológicos da radiação ionizante de fundo natural, a dose mínima e o tempo de exposição a que um organismo vivo pode ser submetido sem causar danos biológicos. Nosso grupo de estudo já demonstrou que a exposição contínua a radiação ionizante por 3 meses em ratas, de linhagem wistar, virgens com 10 semanas de vida a uma dose baixa

(3,61  $\mu\text{Sv/h}$ ) e alta (20  $\mu\text{Sv/h}$ ) não causou nenhuma alteração antropométrica, na pressão arterial, no ciclo estral, na estrutura ovariana, no tecido hepático e nem houve aumento de estresse oxidativo ao final do experimento (COUTINHO, 2020).

Durante toda a condução do experimento, os pesos corporais das ratas foram monitorados uma vez por semana e o ganho de peso foi evidenciado em todos os grupos experimentais. Na análise dos pesos verificamos que os animais do grupo Câncer apresentou maior ganho de peso no primeiro mês de experimento, quando comparado ao grupo Sham e ao grupo Câncer+Radiação e no segundo mês quando comparado aos demais grupos, já o grupo Radiação, não apresentou nenhuma diferença quando comparado aos demais grupos. Dobrzynski (2015) em um estudo sobre a mortalidade por câncer entre pessoas que vivem em áreas com vários níveis de radiação natural afirma que baixas doses de radiação podem induzir o equilíbrio fisiológico e a reparação ao dano celular. Com base em um levantamento de dados de estudos que abordaram a temática da radiação de fundo natural, eles não evidenciaram nenhuma alteração antropométrica induzida pela radiação de fundo natural em nenhum dos grupos analisados (COUTINHO,2020; DOBRZYNSKI, 2015; CALEGARO, 2019).

As Normas de Proteção Radiológica recomendam que um indivíduo público que mora em áreas onde há radiação de fundo receba sem que possa haver alterações biológicas em seu organismo a dose de 1,46 mSv em 365 dias e 1,08 mSv em sete meses, que equivale à 0,004mSv ao dia. Considerando a relatividade entre a massa corporal de um rato e de um ser humano, é possível perceber que a dose acumulada máxima para um rato num período de vinte e seis semana é de 0,146mSv (CNEN, 2011). Logo, as ratas do presente estudo receberam uma dose acumulada 103 vezes maior do que a dose recomendada, pois foram expostas a dose acumulada de 15,0 mSv. Mesmo com a exposição a uma dose considerada muito alta para o cidadão comum, é possível inferir que as ratas desenvolveram um processo adaptativo à radiação gama.

De acordo com Calegato (2019), as células são capazes de adaptar à certos níveis de radiação, assim como fazem com outras formas de agressões celulares. Para superar o processo adaptativo e não construir resultados falso positivos, as ratas

foram expostas a radiação por um período de cento e oitenta e dois dias. CALEGARO (2019) em seu estudo, comparou também indicadores biológicos de cidades com elevado nível de radiação natural com outras consideradas normais e não evidenciou efeitos danosos nos dados analisados da saúde dos habitantes das cidades com radiação de fundo natural. De acordo com Veiga & Koifman, (2005)Veiga, a alta radiação emitida de fontes naturais pode gerar danos biológicos. No entanto, a literatura ainda apresenta controvérsias quanto a relação do aparecimento do câncer com a exposição à radiação pelo risco ocupacional, a radiação liberada pelos procedimentos médicos, e a radiação de pessoas que residem em lugares com emissão de radiação de fundo natural (GYULEVA *et al.*, 2015, ICRP, 2018; BEIR, 2005; UNSCEAR, 1993).

Num caso extremo, havendo algum sistema biológico que resida e permaneça de forma contínua sobre uma fonte de radiação natural com taxa de 0,00361 mSv/h, este sistema biológico receberá uma radiação acumulada de 15 mSv no período de aproximadamente sete meses e 30,96 mSv ao final de um ano de exposição. Portanto, dependendo da frequência, do tempo de permanência e da região que um ser humano se localize na praia de Meaípe, os valores de dose acumulada poderão estar acima dos recomendados pela Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico (NEA-OCDE 1979), Conselho Internacional de Proteção Radiológica (ICRP, 2002) e o Comitê das Nações Unidas sobre os Efeitos da Radiação Atômica (UNSCEAR 2000). Poderão também estar acima das doses recomendadas por BEIR VII (2005).

Em relação ao ciclo ovariano das ratas, visualizamos como descrito na literatura por CORA (2015), em que o ciclo estral de todos os grupos experimentais tanto no início quanto nos últimos quatorze dias de experimento, teve a duração média de 4 a 5 dias com identificação das fases de proestro, estro e diestro e a presença de todos os tipos de células características de cada período do ciclo. COUTINHO 2020, não detectou alterações no ciclo estral quando as ratas foram expostas a dose de radiação igual a usada neste experimento (3.61 µSv/h). No atual estudo, todos os grupos apresentaram pequenas oscilações na regularidade, tamanho e quantidade de ciclos. Essas pequenas alterações só foram evidentes no grupo Câncer+Radiação na fase de proestro do grupo e nas ratas sham quando

comparadas entre grupos na mesma etapa. As pequenas alterações foram evidentes também no grupo Radiação quando comparado com os grupos de experimentos diferentes. Em um experimento realizado por **Kerdelhué B (2016)** as ratas de linhagem wistar quando foram induzidas ao câncer de mama com DMBA, não apresentaram nenhuma alteração nas secreções pré-ovulatórias ou basais de LH, FSH, PRL em nenhum momento do ciclo estral. **Wood (2002)** aponta em seu estudo que as lesões pré-neoplásicas desenvolvidas pelo DMBA não evoluem bem em ratas wistar.

De acordo com um estudo realizado por **Lo Prest (2004)**, quanto menor a dose e o campo de irradiação a que o ovário é exposto, maiores são as chances de reparação fisiológica. Como nossos animais foram irradiados de corpo inteiro, não foi possível mensurar a dose recebida apenas em um órgão. **Adrienens (2009)** aponta dados em seus estudos que mostram que as alterações provocadas nas células germinativas podem apresentar consequências na sua função reprodutiva ou em gerações seguintes.

De acordo com **Unscear (2000)**, o núcleo da célula é o principal local de mutação celular induzida por radiação e o DNA é o alvo principal. Quando esse dano ocorre, inicia o processo de reparação celular e a eficácia do reparo determina o retorno das funções celulares normais. No entanto, se o reparo falhar, pode ocorrer alterações, perda de informações genéticas e apoptose. O DMBA ao ser metabolizado pelas células epiteliais mamárias, geram metabólitos polares que também causam danos no DNA.

Estudos científicos com protocolos de irradiação não mostraram aumento na latência, incidência ou número total tumores mamários em animais que receberam doses fracionadas quando comparados a animais que receberam doses únicas **(RUSSO 1996)**.

Assim como **Coutinho (2020)**, as ratas expostas a radiação não apresentaram alterações na pressão arterial. O grupo exposto a radiação sem indução neoplásica iniciou o experimento com pressão arterial sistólica menor quando comparado aos grupos Câncer e Câncer + Radiação e pressão arterial diastólica menor quando

comparadas aos demais grupos. Ao final do experimento, não houve diferença na pressão arterial sistólica e todos os grupos apresentaram pressão arterial diastólica menor que o grupo sham.

No nosso protocolo experimental, o DMBA foi administrado em fêmeas de ratas virgens com 49 dias de idade. Nesse período, as glândulas mamárias apresentam as estruturas dos chamados terminal and buds (TEBs) altamente proliferativas, densas e com baixo índice de morte celular quando comparados aos lóbulos e alvéolos (RUSSO *et al.*, 1996; MACEJOVÁ & BRTKO, 2001). Por isso, os TEBs são os principais alvos da ação de carcinogênicos na glândula mamária. Com a indução do câncer, os TEBs se tornam mais espessos devido à proliferação epitelial e ao invés de se diferenciar em AB1 ou AB2, forma um lumem secundário com múltiplas camadas que se diferencia em proliferações intraductais (IDPS). As convergências dos IDPS evoluem para microtumores que inicialmente são chamados de carcinomas intraductais e que podem continuar se desenvolvendo e culminar em adenocarcinomas. Os adenocarcinomas por sua vez se diferenciam em cribiforme, comedo, tubular e papilar (RUSSO *et al.*, 1989; RUSSO & RUSSO, 2000; RUSSO & RUSSO, 2004). A alta sucessibilidade de TEBs a transformação neoplásica apresentada por Russo & Russo, (2004) foi evidenciado no nosso estudo pois a quantidade de AB2 no grupo câncer foi menor quando comparado ao grupo Sham, já a quantidade de AB1 foi menor matematicamente nos grupos Câncer e Câncer+Radiação quando comparados aos grupos Sham e Radiação.

Os lóbulos também são estruturas mamárias formados da evolução dos TEBs. No entanto ao metabolizar o DMBA, nas glândulas mamárias as alterações induzidas pela administração do carcinogênio causam alterações no desenvolvimento dos TEBs que não se diferenciam até formar o lóbulo. Russo & Russo (1996), afirma que mesmo nos grupos com indução do câncer, alguns TEBs ainda sofrem diferenciação, porém sempre em número menor que o grupo Câncer como mostra o nosso estudo. Ao comparar o grupo Câncer com o grupo Câncer + Radiação podemos perceber que há um aumento matemático no número de lóbulos no grupo exposto à radiação. Esse dado pressupõe um efeito benéfico da radiação ionizante.

Os TEBs afetados pelo DMBA não se diferenciam em AB1 ou AB2, e podem desenvolver lesão cancerígena (RUSSO & RUSSO, 2004; RUSSO, 2015). O presente estudo, evidenciou os caminhos da progressão histológica do câncer no grupo tratado com DMBA sem exposição à radiação ionizante. As ratas desse grupo apresentaram maior número de ductos quando comparados aos demais grupos da pesquisa. Nenhum grupo apresentou alteração no tamanho do quarto par da glândula mamaria medidos em centímetros e processadas com o protocolo de whole mount. A literatura não apresenta dados que relacione o comprimento da mama com o desenvolvimento ou prevenção do câncer de mama em animais e humanos.

O câncer de mama é considerado uma patologia de etiologia hormonal. E os estrogênios são hormônios esteroides presentes na glândula mamaria capazes de promover o crescimento e o desenvolvimento de cânceres celulares, especialmente em órgãos sensíveis ao estrogênio, como o tecido mamário. A literatura relata que o câncer de mama é o câncer dependente de estrogênio mais prevalente em mulheres de países em desenvolvimento (SANKARANARAYANAN R, 2014; GUTNIK LA;2016). Os estrogênios possuem o papel de promover a proliferação, tanto em células normais como em células neoplásicas e a sua ação nos mamíferos é em grande parte mediada por seus receptores (RE- $\alpha$  e RE- $\beta$ ) e respectivos cofatores (LO E SUKUMAR, 2008). Esses receptores regulam a transcrição de diversos genes relacionados a regulação de ciclo celular, replicação do DNA, desenvolvimento dos órgãos reprodutivos, angiogênese e progressão tumoral (RONDÓN-LAGOS *et al.*, 2016). Em nosso estudo, os grupos induzidos ao câncer apresentaram níveis elevados de estradiol. Essa alteração é justificada pelo aumento da invasão e densidade de células cancerígenas dos tumores mamários e hipertrofia dos lóbulos que estavam diminuídos nesses grupos e aumento dos IDPs. Além disso, o estrogênio possui papel significativo na estimulação e proliferação celular característicos da progressão do câncer.

Além das alterações nos níveis de estradiol induzidos pelo câncer, estudos mostram que a radiação ionizante aumenta as taxas do hormônio estradiol e de seus metabólicos. Em um estudo realizado por Suman *et al.*, 2012 camundongos foram expostos a 2  $\gamma$ -radiação do corpo inteiro com uma taxa de dose 1 Gy/min e após três seções de irradiação em dois meses, os animais apresentaram níveis de estradiol

cinco vezes maiores que nos animais do grupo controle. Além disso, as ratas da avaliação dos níveis de estradiol do presente trabalho estavam na fase estro do ciclo estral. De acordo com os estudos de Helm JS, 2020; os níveis elevados de estradiol e a fase estro do ciclo, potencializam os efeitos cancerígenos da radiação ionizante. Esses efeitos foram demonstrados nos níveis de estradiol dos grupos Câncer e Câncer + Radiação que foram maiores que os grupos Sham e Radiação. Yuan L et al., 2016 evidenciou em seus estudos que o estrogênio também aumentou diretamente o estresse oxidativo em camundongos virgens.

Várias pesquisas científicas relacionaram a exposição à radiação ionizante com produção de espécies reativas de oxigênio e danos ao DNA (LEACH 2001; NARAYANAN et al., 1997; JONES et al., 2007 ; SAENKO et al., 2013). Os danos podem ser imediatos ou tardios. Com base nos dados desses estudos, as ROS aumentam de acordo com a dose e o período de análise após a exposição. As células que receberam entre 0,5 e 12 Gy apresentam níveis de ROS elevados após 1 a 2 dias (SAENKO et al., 2013 ). No entanto, quando as células foram expostas a raios de 1Gy, as ROS se estabilizam após 7 dias da exposição (WERNER et al., 2014 ). O tipo de dano ao DNA depende da transferência linear de energia por unidade de comprimento ou LET. A qualidade e quantidade da LET, depende da fonte. E a radiação gama é de baixa LET, e depositam pouca excitação energética (GOODHEAD; 1988 ). Essa baixa deposição corrobora nossos dados pois não evidenciamos diferença das ROS entre os grupos experimentais.

As espécies reativas de oxigênio são moléculas baseadas no oxigênio que geram radicais livres incluindo o ânion radical superóxido (EGEA et al., 2017 ). O aumento da produção desse ânion no organismo causa oxidação da dihidroetidina (DHE) (MILLER et al., 1998). A microscopia de fluorescência do DHE, foi usada em nosso experimento como marcador do estresse oxidativo da glândula mamária. No entanto, não foi evidenciado diferença na avaliação do estresse oxidativo do terceiro par da glândula mamária das ratas em nenhum grupo experimental.

O acúmulo de mastócitos também tem sido associado ao processo de tumorigenese pois eles fazem parte do sistema imunológico inato e é constantemente ativado no desenvolvimento tumoral. O seu acúmulo é caracterizado como responsável pelo crescimento e prognóstico desfavorável em vários cânceres humanos incluindo o

carcinoma mamário (MANTOVANI *et al.*, 2008; GALLI *et al.*, 2010). Isabella, S, (2018), demonstrou em seus estudos, que os grupos induzidos ao câncer com DMBA apresentaram número de mastócitos superiores quando comparados aos grupos tratados e controle.

O adipócito é um tipo de célula abundante no estroma do tecido mamário, uma fonte de moléculas de sinalização e de suporte para o crescimento do tumor mamário em resposta a estímulos nutricionais ou hormonais (SCHERER PE, 2006; RAJALA MW; 2014). Dentre outras funções, os adipócitos também produzem e secretam colágeno, sendo a fonte potente do colágeno tipo VI. A expressão do colágeno é altamente enriquecida no tecido adiposo e contribui com funções essenciais para o ambiente local da matriz extracelular (SCHERER PE, 1998; VOGEL, 2001). No nosso experimento, o número de adipócitos não apresentou diferença entre os grupos. Os dados da deposição de colágeno nos ductos estavam maiores nos grupos Câncer, Radiação e Câncer + Radiação. Na análise da deposição de colágenos no tecido adiposo, o grupo tratado com DMBA sem exposição à radiação apresentou maior deposição, quando comparado aos grupos Radiação e Câncer + Radiação. Iyengar *et al.*, (2005) demonstrou em um estudo com camundongos, que adipócitos isolados do colágeno tipo IV foram incapazes de sustentar o crescimento tumoral. Iyengar, *et al.*, (2005), demonstrou também que a falta do colágeno tipo IV leva a uma redução do crescimento tumoral. Ainda de acordo com os estudos anteriores, o colágeno secretado pelo adipócito, promove a displasia e crescimento tumoral precoce in vivo. Isabella, S, (2018) em um estudo com ratas de linhagem Sprague Dawley observou um acúmulo excessivo de colágeno e de populações de mastócitos no grupo tratado com DMBA sozinho quando comparado ao grupo tratado com DMBA+ Diindolilmetano (DIM).

A cidade de Guarapari, especialmente na praia de Meaipe, possui uma radiação de fundo natural considerada uma das mais altas do mundo. Alguns autores apresentam dados de uma maior incidência de alterações biológicas associadas a exposição à radiação de fundo natural (L. H. S. Veiga & Koifman, 2005; R. Veiga *et al.*, 2006). Outros autores postulam que não há alterações malélicas ou benéficas na tumorigenese mamaria quando animais são expostos a radiação de fundo natural (ESLAMI *et al.*, 2019; GYULEVA *et al.*, 2015). Nosso grupo de estudo não observou

alterações no grupo exposto a radiação que favorece ao desenvolvimento do câncer, pois 57 % não apresentaram nenhuma alteração neoplásica e 43 % apenas hiperplasia ductal. Assim, nessa exposição não há danos, mas, será necessário elucidar os efeitos da radiação no organismo humano pois há evidências de uma forte relação linear entre a dose ofertada e os danos causados (COUTINHO *et al.*, 2020; VEIGA, KOIFMAN, 2005). Quando comparados os grupos tratados com DMBA, o grupo Câncer apresentou maior número de animais com carcinoma cribriforme 37,5% e o grupo Câncer + Radiação apresentou o maior número de animais sem alterações 33,33%. Esses dados podem corroborar com a ideia de que as células desenvolvem adaptação ao estímulo da radiação postulado em alguns trabalhos científicos e que as células irradiadas desenvolvem mecanismo de proteção para uma nova exposição (SHARMA *et al.*, 2019; DAINO *et al.*, 2018; SUIT *et al.*, 2007). É importante ressaltar que as ratas de linhagem wistar apresentam baixa sensibilidade ao desenvolvimento de câncer de mama com indução química pelo DMBA quando comparadas às outras linhagens de ratos disponíveis. Assim, algumas alterações evidenciadas na indução do câncer em algumas linhagens, não foram observadas nas ratas wistar do nosso estudo (KUBATKA; 2002).

As convergências dos IDPS evoluem para microtumores que inicialmente são chamados de carcinomas intraductais e que podem continuar se desenvolvendo e culminar em adenocarcinomas (AdCa). Os adenocarcinomas por sua vez se diferenciam em cribriforme, comedo, tubular e papilar (RUSSO *et al.*, 1989; RUSSO & RUSSO, 2000; RUSSO & RUSSO, 2004).

As ratas expostas a radiação sem indução neoplásica apresentaram 42,85% de glândulas mamárias classificadas como hiperplasia ductal. Nessa classificação o tecido é constituído por ductos e túbulos com pouca quantidade na região intra alveolar, revestidos por uma a duas camadas de células epiteliais cuboidais simples, que por vezes realizam projeções papilares para o lúmen. A hiperplasia ductal é identificada como a fase intermediária no desenvolvimento da tumorigenese e é comumente observada após exposição à radiação ionizante e indução neoplásica com indutores químicos como o DMBA (HELM JS, 2020; PURNELL 1980; RUSSO *et al.*, 1977). TANAKA *et al.*, (2007) em um estudo com 4000 camundongos realizou um experimento com exposição à radiação gama de baixa dose e não encontrou

diferença significativa no aparecimento de neoplasias quando comparou o grupo controle ao grupo exposto a radiação gama com dose crônica abaixo de 0,021 Gy/dia.

Diante dos achados, concluímos que doses ~ 15,0 mSv de radiação ionizante por meio da utilização de um simulador físico de radiação gama (SF) construído a partir das areias monazíticas da praia de Meaípe - Guarapari (Brasil) não são capazes de causar danos estruturais nem promover o desenvolvimento de câncer de mama, além de impedir o desenvolvimento de câncer cribriforme nas ratas.

## 8. CONCLUSÃO

Em conclusão, nosso modelo demonstra que a exposição a dose (3,61  $\mu\text{Sv/h}$ ) de radiação gama não tem a função de potencializar o câncer na glândula mamária de ratas wistar, onde é demonstrado no número reduzido de ratas exposta a radiação e tratadas com carcinogêneo DMBA, acometidas com lesões na glândula mamária. Essa premissa é evidenciada nos efeitos fisiológicos da radiação demonstrados pela não identificação de lesões características do câncer cribriforme mamário. A radiação ionizante não foi capaz de promover aumento do estresse oxidativo e nem alterações na pressão arterial. É possível que as células das ratas expostas à radiação tenham desenvolvido mecanismos adaptativos a radiação ionizante pois não houve alterações no número de mastócitos como marcador de inflamação assim como alterações no ciclo estral. Além disso, as glândulas mamárias das ratas expostas a radiação apresentaram maior número de glândulas sem alterações fisiológicas. Esse estudo por sua vez permite ampliar o conhecimento dos efeitos biológicos da radiação de fundo natural da praia de Meaípe, no município de Guarapari-ES e garantir que mais análises sejam realizadas para entender os mecanismos envolvidos na radiação e glândulas mamárias.

## 9. REFERÊNCIAS

ABREU, E. DE; KOIFMAN, S. Fatores prognósticos no câncer da mama feminina.

**Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 48, n. 1, p. 113–131, 2002.

ACS. American Cancer Society. Cancer Facts & Figures 2017.

ADRIAENS I, SMITZ J, JACQUET P. 2009. The current knowledge on radiosensitivity of ovarian follicle development stages. **Hum Reprod Update**. 15:359–377.

AQUINO.R. R. Avaliação da Radioatividade Natural em Areias das Praias da Grande Vitória, Espírito Santo.2010. 79 f. Dissertação (Mestrado em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear –Aplicações) Ipen- Autarquia Associada à Universidade de São Paulo. São Paulo, 2010.

BECKER, J.B. et al. Strategies and methods for research on sex differences in brain and behavior. *Endocrinology*, v. 146, n. 4, p. 1650–1673, 2005.

BEIR. Beir VII : Health Risks from Exposure to Low Levels of Ionizing Radiation. 2005.

BERTULOSO, B. D.; PODRATZ, P. L.; MERLO, E. et al. Tributyltin chloride leads to adiposity and impairs metabolic functions in the rat liver and pancreas. *Toxicology Letters*, [s. l.], v. 235, n. 1, p. 45–59, 2015.

BRAY, F. et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 68, n. 6, p. 394–424, 2018.

CALEGARO, J. U. M. Efeitos Biológicos de Baixos Níveis de Radiação Ionizante. p. 12-21 . In: . **São Paulo: Blucher**, 2019. ISSN 2358-9337, DOI 10.5151/wcacem-18.

CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL- CONCEA. Diretriz brasileira para o cuidado e a utilização de animais para fins científicos e didáticos-DBCA. Anexo I. Peixes em instalações de instituições de ensino ou pesquisa científica. 2017.

CORA MC, KOOISTRA L, TRAVLOS G. Vaginal Cytology of the Laboratory Rat and Mouse: Review and Criteria for the Staging of the Estrous Cycle Using Stained Vaginal Smears. *Toxicol Pathol.* 2015;43(6):776-793. doi:10.1177/0192623315570339

COUTINHO, J.V.DA S. et al. Evaluation of induced biological effects in rats by continuous and natural gamma radiation using a physical simulator. *International Journal of Radiation Biology*, v. 27, n. 2, p. 1–13, 10 set. 2020.

D'AZEREDO ORLANDO MT et al. Caracterização físico-química da areia monazita e suas espécies bacterianas associadas das praias do Sudeste do Brasil. *Environ Sci Polui Res Int*. 2022 Fev;29(8):11815-11830. doi: 10.1007/s11356-021-16523-5. Epub 2021 22 de setembro. 34550521.

DA COSTA CS, MIRANDA-ALVES L, LA MERRILL MA, et al. The tributyltin leads to obesogenic mammary gland abnormalities in adult female rats. *Toxicol Lett*. 2019 Jun 1;307:59-71. doi: 10.1016/j.toxlet.2019.02.016. Epub 2019 Mar 1. PMID: 30831249.

Dai X, Xiang L, Li T, B et al. Cancer Hallmarks, Biomarkers and Breast Cancer Molecular Subtypes. *Journal of Cancer*. 2016;7(10):1281–94.

DAINO, K. et al. Epigenetic dysregulation of key developmental genes in radiation induced rat mammary carcinomas. *International Journal of Cancer*, 2018

DAUER, LT, BROOKS, AL, HOEL, DG, et al . Revisão e avaliação de pesquisas atualizadas sobre os efeitos na saúde associados à radiação ionizante em baixas doses. *Dosimetria de proteção contra radiação*, 140 (2), 103–136, 2010.

DE ASSIS, S.; WARRI, A.; CRUZ, M. I.; HILAKIVI-CLARKE, L. Changes in Mammary Gland Morphology and Breast Cancer Risk in Rats. *Journal of Visualized Experiments*, [s. l.], v. 21, n. 44, p. 2 4, 2010.

DOBRZYŃSKI L, FORNALSKI KW, FEINENDEGEN LE. Cancer Mortality Among People Living in Areas With Various Levels of Natural Background

EGEA J, et ai. Contribuição europeia para o estudo de ROS: um resumo dos resultados e perspectivas para o futuro da ação COST BM1203 (EU-ROS) *Redox Biol*. 2017; 13 :94-162. doi: 10.1016/j.redox.2017.05.007.

ESLAMI, J.; MORTAZAVI, S.M.J.; et al. A Glance at the Errors of Some Studies on the Health Effects of High Background Natural Radiation Areas. *Journal of Biomedical Physics and Engineering*. v. 9, n. 4, p. 389-394, 2019. Published 2019 Aug 1.

FRUEHAUF JP, MEYSKENS FL. Reactive Oxygen Species: A Breath of Life or Death? *Clin Cancer Res*. 8 de fevereiro de 2007;13(3):789.

GALLI R, Starace D, Busà R, Angelini DF, Paone A, De Cesaris P, et al. TLR Stimulation of Prostate Tumor Cells Induces Chemokine-Mediated Recruitment of Specific Immune Cell Types. *J. Immunol*. 3 de junho de 2010;184(12):6658.

GOODHEAD DT. Distribuição espacial e temporal da energia. *Saúde Física*. 1988; 55 :231-240. [ [PubMed](#) ] [ [Google Acadêmico](#) ]

GOUON-EVANS, V.; LIN, E.Y.; POLLARD, J.W. Requirement of macrophages and eosinophils and their cytokines for mammary gland development. *Breast Cancer Res*, v.4, n.4, n.155-164, 2002.

GREENLEE RT, MURRAY T, BOLDEN S, WINGO PA. Cancer statistics,

GUIA ONLINE. Cidade de Guarapari. Disponível em: [http://guarapari.guiaonline.net.br/index.php?option=com\\_content&view=article&id=47: guarapari-e-conhecida-como-a-cidade-saude&catid=35:guarapari-&Itemid=53](http://guarapari.guiaonline.net.br/index.php?option=com_content&view=article&id=47:guarapari-e-conhecida-como-a-cidade-saude&catid=35:guarapari-&Itemid=53). Acessado em: 20/03/2021.

GUTNIK LA, MATANJE-MWAGOMBA B., MSOSA V., et al. Rastreamento do câncer de mama em países de baixa e média renda: uma perspectiva do Malawi. *Jornal de Oncologia Global*. 2016; 2 (1): 4–8. doi: 10.1200/jgo.2015.000430. [ [PMC free article](#) ] [ [PubMed](#) ] [ [CrossRef](#) ] [ [Google Scholar](#) ]

GYULEVA, I. et al. Assessment of some immune parameters in occupationally exposed nuclear power plants workers: Flowcytometry measurements of T, B, NK and NKT cells. *Dose-Response*, v. 13, n. 1, 2015.

HELM JS, RUDEL RA. As vias de resultados adversos para radiação ionizante e câncer de mama envolvem danos diretos e indiretos ao DNA, estresse oxidativo, inflamação, instabilidade genômica e interação com a regulação hormonal da mama. *Arch Toxicol*. 2020;94(5):1511-1549. doi:10.1007/s00204-020-02752-z

HODSON LJ, CHUA AC, EVDOKIOU A, et al. Macrophage phenotype in the mammary gland fluctuates over the course of the estrous cycle and is regulated by ovarian steroid hormones. *Biol Reprod*. 2013 Sep 19;89(3):65. doi: 10.1095/biolreprod.113.109561. PMID: 23926283.

ICRP. 2002. Basic Anatomical and Physiological Data for Use in Radiological Protection: **Reference Values**. *Ann ICRP*. 32:1–277.

ICRP. 2018. Dose Coefficients for External Exposures to Environmental Sources [Internet]. :114. Available from: <http://www.icrp.org/docs/TG90 Draft Report for Public Consultation 2018-07-05>.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. Estimativa 2020: incidência de câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. – Rio de Janeiro: **INCA**, 2019.

ISABELLA, S., MIRUNALINI, S. 3, 3'-Diindolylmethane-encapsulated chitosan nanoparticles accelerate molecular events during chemical carcinogen-induced mammary cancer in Sprague Dawley rats. *Breast Cancer* **26**, 499–509 (2019). <https://doi.org/10.1007/s12282-019-00950>

IYENGAR P, ESPINA V, WILLIAMS TW, et al. O colágeno VI derivado de adipócito afeta a progressão precoce do tumor mamário in vivo, demonstrando uma interação

crítica no microambiente tumor/estroma. *J Clin Invest*. 2005;115(5):1163-1176. doi:10.1172/JCI23424

JAIN, V.; KUMAR, P.R.; KOYA, P.K.; JAIKRISHAN, G.; DAS, B. Lack of increased DNA double-strand breaks in peripheral blood mononuclear cells of individuals from high level natural radiation areas of Kerala coast in India. *Mutation Research*. 788, 50– 57, 2016.

JENSEN, E.V. AND JORDAN, V.C., 2003. The estrogen receptor: a model for molecular medicine. *Clin. Cancer Res*. 9, 1980-9.

JONES JA, Riggs PK, Yang TC, Pedemonte CH, Clarke MS, Feedback DL, Au WW. Bioefeitos induzidos por radiação ionizante no espaço e estratégias para reduzir a lesão celular e a carcinogênese. *Aviat Space Environment Med*. 2007; 78: A67-78.

JUNG, K. J.; WALLIG, M. A.; SINGLETARY, K. W. Purple grape juice inhibits 7,12-dimethylbenz[a]anthracene (DMBA)-induced rat mammary tumorigenesis and in vivo DMBA-DNA adduct formation. *Cancer Letters*, v. 233, n. 2, p. 279– 288, 2006.

KERDELHUÉ B, FOREST C, COUMOUL X. Dimethyl-Benz(a)anthracene: A mammary carcinogen and a neuroendocrine disruptor. *Biochim Open*. 2016 Oct 8;3:49-55. doi: 10.1016/j.biopen.2016.09.003. PMID: 29450131; PMCID: PMC5801823.

KUBATKA P, AHLERSOVÁ E, AHLERS I, et al. Variability of Mammary Carcinogenesis Induction in Female Sprague-Dawley and Wistar:Han Rats: the Effect of Season and Age *Physiol Res*. 2002; 51: 633-640.

LEACH JK, BLACK SM, SCHMIDT-ULLRICH RK, MIKKELSEN RB. A ativação da atividade constitutiva do óxido nítrico sintase é um evento de sinalização precoce induzido pela radiação ionizante. *J Biol Chem*. 2002; 277 :15400–15406. doi: 10.1074/jbc.M110309200.

LESTER SC, BOSE S, CHEN YY, et al. Protocol for the examination of specimens from patients with invasive carcinoma of the breast. *Arch Pathol Lab Med*.

LIU Y, NGUYEN N, COLDITZ GA. Links between alcohol consumption and breast cancer: a look at the evidence. *Women's health (London, England)*. janeiro de 2015<sup>a</sup>.

LO PK, SUKUMAR S. Epigenomics and breast cancer. *Pharmacogenomics*. dezembro de 2008;9(12):1879–902.

LO PRESTI, RUVOLO G, GANCITANO RA, CITTADINI E. 2004. Ovarian function following radiation and chemotherapy for cancer. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 113.

LOU, J. et al. Parotid gland radiation dose-xerostomia relationships based on actual delivered dose for nasopharyngeal carcinoma. *Journal of Applied Clinical Medical Physics.*, p. 1–10, 2018.

MA, Z. et al. DMBA promotes ErbB2-mediated carcinogenesis via ErbB2 and estrogen receptor pathway activation and genomic instability. ***Oncology Reports***, v. 40, n. 3, p. 1632–1640, 2018.

MACEJOVA D, Brtko J. Chemically induced carcinogenesis: a comparison of 1-methyl-1-nitrosourea, 7,12-dimethylbenzanthracene, diethylnitroso-amine and azoxymethan models (minireview). *Endocr Regul.* 2001;35(1):53–9.

MARCONDES FK. Determination of the estrous cycle phases of Rats: some helpful considerations. ***Braz. J. Biol.***, 62(4A): 609-614, 2002.

MASSO-WELCH, P.A.; DARCY, K.M.; STANGLE-CASTOR, N.C. et al. A developmental atlas of rat mammary gland histology. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, v.5, n.2, p.165-185, 2000

MATHIVADHANI P, Shanthi P, Sachdanandam P. Effect of *Semecarpus anacardium* Linn. extrato de porca na expressão mamária e hepática de enzimas xenobióticas no carcinoma mamário induzido pelo DMBA. *Environ Toxicol Pharmacol.* 2007 Maio;23(3):328-34. doi: 10.1016/j.etap.2006.12.004. Epub 2007 Jan 5. 21783776.

MC GREGOR H, LAND CE, CHOI K, et al. Incidência de câncer de mama entre sobreviventes de bombas atômicas, Hiroshima e Nagasaki, 1950-69. ***J Natl Cancer Inst.*** 1977; 59 (3): 799-811. doi: 10.1093 / jnci / 59.3.799

MILLER DJ, Hawthorne SB, Gizir AM, et al. Solubilidade de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos em água subcrítica de 298 K a 498 K. *J. Chem. Eng. Dados.* 1998; 43 (6):1043–1047. [ [Google Acadêmico](#) ]

MØLLER, A.P.; MOUSSEAU, T.A. The effects of natural variation in background radioactivity on humans, animals and other organisms. *Biological Reviews.* 88, 226 e 254, 2013.

MONSEFI, M.; ABEDIAN, M.; AZARBAHRAM, Z.; ASHRAF, M. J. *Salvia officinalis* L. induces alveolar bud growing in adult female rat mammary glands. *Avicenna journal of phytomedicine*, [s. l.], v. 5, n. 6, p. 560 7, 2015.

NARAYANAN PK, GOODWIN EH, LEHNERT BE. As partículas alfa iniciam a produção biológica de ânions superóxido e peróxido de hidrogênio nas células humanas. *Pode Res.* 1997; 57 :3963-3971. [ [PubMed](#) ] [ [Google Acadêmico](#) ]

NASCIMENTO JR, D. R. DO; AGUIAR, V. A. P.; GIANINI, P. C. F. Minerais pesados das areias praias de Guarapari (ES): distribuição, proveniência e fatores de risco à saúde. **XIII Congresso da Associação Brasileira de Estudos do Quaternário - ABEQUA**, p. 5, 2010.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. Drinking Water e health. Washington.DC: National Academy Press, 1981,V.4 p.257.

NEA-OECD NEA. 1979. Exposure to Radiation from Natural Radioactivity in Building Materials. Nuclear Energy Agency (NEA), Report by NEA Group of Experts, **Organization for Economic Co-Operation and Development, OECD, Paris, France. Paris.**

NELSON, J.F.; FELICIO, L.S.; RANDALL, P.K.; SIMS, C.; FINCH, C.E. A longitudinal study of estrous cyclicity in aging C57BL/6J mice: I. Cycle frequency, length and vaginal cytology. **Biology of reproduction**, v. 27, p. 327-339, 1982.

NORMAS PARA PROTEÇÃO RADIOLÓGICA. Disponível em <http://appasp.cnen.gov.br/seguranca/normas/normas.asp?grupo=3>. Acessado em Fevereiro de 2022.

OLIVEIRA.K.S. Fosfodiesterase 2A forma um complexo com co-chaperona XAP2 e regula o deslocamento do receptor aril hidrocarboneto para o núcleo.2006.122f. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Molecular do Programa de Pós Graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Biotecnologia) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2006.

PEROU CM. Molecular Stratification of Triple-Negative Breast Cancers. *The Oncologist*. 1 de janeiro de 2011;16(suppl 1):61–70.

PLANTE, I.; STEWART, M. K. G.; LAIRD, D. W. Evaluation of Mammary Gland Development and Function in Mouse Models. *Journal of Visualized Experiments*, [s. l.], n. 53, p. 2 6, 2011.

*PODRATZ, P.L.; DELGADO FILHO, V.S.; LOPES, P. F. I.; SENA et al. J.B. Tributyltin impairs the reproductive cycle in female rats. Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, v. 75.

*POPULAÇÃO ESTIMADA*: IBGE, Diretoria de Pesquisas, Coordenação de População e Indicadores Sociais, Estimativas da população residente com ano de referência 2020.

POURTEIMOOR V, MOHAMMADI-YEGANEH S, PARYAN M. Breast cancer classification and prognostication through diverse systems along with recent

emerging findings in this respect; the dawn of new perspectives in the clinical applications. *Tumor Biology*. 2016;37(11):14479–99.

PURNELL DM. A relação da hiperplasia do ducto terminal com o carcinoma mamário em ratos LEW/Mai tratados com 7,12-dimetilbenz(alfa)antraceno. *Am J Pathol*. 1980; 98 :311-324.

RAJAKUMAR, T. et al. Effect of allyl isothiocyanate on NF- $\kappa$ B signaling in 7,12dimethylbenz(a)anthracene and N-methyl-N-nitrosourea-induced mammary carcinogenesis. **Breast Cancer**, v. 25, n. 1, p. 50–59, 2018.

RAJALA MW, Scherer PE. Minirevisão. O adipócito: na encruzilhada da homeostase energética, inflamação e aterosclerose. *Endocrinologia*. 2003; **144** :3765–3773.

RAJENDRAN, J.; PACHAIAPPAN, P.; SUBRAMANIYAN, S. **Dose-dependent chemopreventive effects of citronellol in DMBA-induced breast cancer among rats***Drug Development Research*, 2019.

RONCKERS CM, ERDMANN CA, LAND CE. Radiação e câncer de mama: uma revisão das evidências atuais. *Res. câncer de mama*. 2005; 7 :21-32. doi: 10.1186/bcr970.

RONDÓN-LAGOS M, Villegas EV, Rangel N *et al*. Tamoxifen Resistance: Emerging Molecular Targets. *International Journal of Molecular Sciences*. 2016;17(8).

RUSSO IH, Russo J. Neoplasia da glândula mamária em estudos de longo prazo em roedores. *Perspectiva de Saúde Ambiental*. 1996; 104 :938-967. doi: 10.1289/ehp.96104938. [ [PMC free article](#) ] [ [PubMed](#) ] [ [CrossRef](#) ] [ [Google Scholar](#) ]

RUSSO IH, Russo J. *Base Molecular da Prevenção e Tratamento do Câncer de Mama*. Heidelberg: Springer-Verlag; 2004. Modelos in vitro para câncer de mama humano; págs. 227-80.

RUSSO J, Russo IH, van Zwieten MJ, Rogers AE, Gusterson BA. Classification of Neoplastic and Nonneoplastic Lesions of the Rat Mammary Gland. In: Jones TC, Mohr U, Hunt RD, organizadores. *Integument and Mammary Glands*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 1989. p. 275–304.

RUSSO J, RUSSO IH. Atlas and histologic classification of tumors of the rat mammary gland. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*. abril de 2000;5(2):187–200.  
Russo J, Russo IH. Toward a physiological approach to breast cancer prevention. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 1 de junho de 1994;3(4):353.

RUSSO J, SABY J, ISENBERG WM, *et al*. Pathogenesis of mammary carcinomas induced in rats by 7,12-dimethylbenz(a)anthracene. *J. Natl. Cancer Inst*. 1977; 59:435– 445.

RUSSO J. Significado de tumores mamários de ratos para avaliação de risco humano. *Toxicol Pathol* . 2015;43(2):145-170. doi:10.1177/0192623314532036

SAENKO Y, Cieslar-Pobuda A, Skonieczna M, Rzeszowska-Wolny J. Modificações de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio e funcionamento mitocondrial em células humanas K562 e HL60 expostas à radiação ionizante. *Radiat Res*. 2013; 180 :360-366. doi: 10.1667/RR3247.1.

SAID, R. S. et al. Resveratrol inhibits inflammatory signaling implicated in ionizing radiation-induced premature ovarian failure through antagonistic crosstalk between silencing information regulator 1 (SIRT1) and poly (ADP-ribose) polymerase 1 (PARP-1). [s.l.] **Elsevier Inc.**, 2016. v. 103

SANKARANARAYANAN R. Triagem para câncer em países de baixa e média renda. *Anais da Saúde Global*. 2014; 80 (5):412–417. doi: 10.1016/j.aogh.2014.09.014. [ PubMed ] [ CrossRef ] [ Google Scholar ]  
SAÚDE, M. DA; (FIOCRUZ), I. N. DE C. J. A. G. DA S. (INCA) F. O. C. **A mulher e o trabalho**. [s.l.: s.n.]. v. 40

SCHERER PE, Bickel PE, Kotler M, Lodish HF. Triagem de anticorpos subtrativos: um novo método para clonar proteínas secretadas e de superfície específicas de células. *Nat. Biotecnologia*. 1998; **16** :581-586.

SCHERER PE. Tecido adiposo: do compartimento de armazenamento de lipídios ao órgão endócrino. *Diabetes*. 2006; **55** (6):1537–1545. doi: 10.2337/db06-0263.

SENA, G. C.; FREITAS-LIMA, L. C.; MERLO, E. et al GRACELI, J. B. Environmental obesogen tributyltin chloride leads to abnormal hypothalamic-pituitary-gonadal axis function by disruption in kisspeptin/leptin signaling in female rats. *Toxicology and Applied Pharmacology*, [s. l.], v. 319, p. 22 38, 2017.

SEVERSON, T. M.; ZWART.W. A review of estrogen receptor/ androgen receptor genomics in male breast cancer. *Endocrine-Related Cancer*, v 24.

SHARMA P, et al, A concept of radiation hormesis. Stimulation of antioxidant machinery in rats by low dose ionizing radiation. **Hell J Nucl Med**. 22:43–48, 2019.

SHIBAMOTO, Y.; NAKAMURA, H. Overview of biological, epidemiological, and clinical evidence of radiation hormesis. *International Journal of Molecular Sciences*. 19 (8), pii: E2387, 2018.

SILVA, M. L. DA; LIMA, A. P. W.; NARDIN, J. M. Revisão Sobre a Eficácia Do Tratamento Do Câncer De Mama Com Tamoxifeno E a Correlação Com O Gene Cyp2D6. **Revista Saúde e Desenvolvimento**, v. 11, n. 9, p. 214–233, 2017.

SINN, H.; KREIPE, H. A brief overview of the WHO classification of breast tumors, 4th edition, focusing on issues and updates from the 3rd edition. *Breast Care*, Basel, v. 8, no. 2, p. 149–154, 2013. doi: 10.1159/000350774

STANKO JP, KISSLING GE, CHAPPELL VA, FENTON SE. Diferenças na taxa de desenvolvimento de glândulas mamárias in situ e outros parâmetros de desenvolvimento em três linhagens de ratos fêmeas comumente usadas em estudos de carcinogênese mamária: implicações para o tempo de exposição a carcinógenos. *Toxicol Pathol* . 2016; 44 (7): 1021-1033. doi: 10.1177 / 0192623316655222.

SUMAN S, Johnson MD, Fornace AJ Jr, Datta K. A exposição à radiação ionizante causa aumento a longo prazo no estradiol sérico e ativação da via de sinalização PI3K-Akt na glândula mamária do rato. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2012;84(2):500-507. doi:10.1016/

SUN, T. et al. Fabrication and characterization of solid lipid nano-formulation of astraxanthin against DMBA-induced breast cancer via Nrf-2-Keap1 and NF-kB and mTOR/Maf-1/PTEN pathway. **Drug Delivery**, v. 26, n. 1, p. 975–988, 2019.

TANAKA IB, 3o, et ai. Causa de morte e neoplasia em camundongos continuamente expostos a taxas de dose muito baixas de raios gama. *Radiat Res*. 2007; 167 :417-437. doi: 10.1667/RR0728.1.

TROMBINO, A. F. et al. Expression of the aryl hydrocarbon receptor/transcription factor (AhR) and AhR-regulated CYP1 gene transcripts in a rat model of mammary tumorigenesis. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 63, n. 2, p. 117–131, 2000.

UNSCEAR UNSC on the E of AR. 2000. Sources and effects of ionizing radiation: sources. [place unknown]: United Nations Publications.

UNSCEAR. 2013. Sources, Effects and Risks of Ionizing Radiation with Annex A - Levels and effects of radiation exposure due to the nuclear accident after the great east-Japan earthquake and tsunami. New York.

UNSCEAR. 2017. Sources, Effects and Risks of Ionizing Radiation with Annex B - Epidemiological Studies of Cancer Risk due to Low-Dose-Rate Radiation from Environmental Sources. New York.

UNSCEAR. Sources and Effects of Ionizing Radiation. United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation, United Nations, New York, 1993.

VEIGA LHS, KOIFMAN S. 2005. Pattern of cancer mortality in some Brazilian HBRA. **Int Congr Ser**. 1276:110–113.

VEIGA, R. et al. Measurement of natural radioactivity in Brazilian beach sands. **Radiation Measurements**, v. 41, n. 2, p. 189–196, 2006.

VINCENT TL, GATENBY RA. An evolutionary model for initiation, promotion, and progression in carcinogenesis. *Int J Oncol.* abril de 2008;32(4):729–37.

VOGEL WF. Sinalização do receptor de colágeno na saúde e na doença. *EUR. J. Dermatol.* 2001; **11** :506-514. [ [PubMed](#) ] [ [Google Acadêmico](#) ]

WERNER E, WANG H, DOETSCH PW. Papéis opostos para respostas impulsionadas por p38MAPK e espécies reativas de oxigênio na persistência e resolução da instabilidade genômica induzida por radiação. *PLoS UM.* 2014; 9 :e108234. doi: 10.1371/journal.pone.0108234.

WOOD GA, KORKOLA JE, ARCHER MC. Resistência específica do tecido ao desenvolvimento de câncer no rato: fenótipos de genes modificadores de tumor. *Carcinogênese.* 2002; 23 :1–9. doi: 10.1093/carcin/23.1.1. [ [PubMed](#) ] [ [CrossRef](#) ] [ [Google Scholar](#) ].

YUAN L, DIETRICH AK, ZIEGLER YS, *et al.* 17 $\beta$ -Estradiol altera danos oxidativos e expressão oxidativa da proteína de resposta ao estresse na glândula mamária do camundongo. *Mol Cell Endocrinol.* 2016;426:11-21. doi:10.1016/j.mce.2016.02.007