

Efecto Experimental de las Radiaciones Ionizantes en el Pulmón: Estudio Histopatológico, Ultraestructural y de Análisis Elemental

P. Michelli ¹, H. Finol ², N. González ², R. Avendaño ¹, M. Mejía ¹, S. Dickson González ¹.

¹Cátedra de Anatomía Patológica, Escuela de Medicina Luis Razetti e Instituto Anatomopatológico José A. O'Daly, Facultad de Medicina, Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela;

²Centro de Microscopía Electrónica, Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela.

Resumen

Las radiaciones ionizantes son agentes físicos ambientales naturales, o producto de la actividad humana para fines de energía nuclear, procesos industriales, diagnósticos y terapéuticos. Con el desarrollo de la radioterapia en tumores como carcinomas de mama, bronquios, esófago, linfomas, y otros, comienzan a observarse lesiones secundarias en distintos tejidos, especialmente en el parénquima pulmonar debido a su alta sensibilidad a las radiaciones y escasa capacidad regenerativa. Los cambios histopatológicos son dosis-dependiente y varían desde inflamatorios hasta neoplásicos. Entre las lesiones inflamatorias se ha descrito una fase temprana de neumonitis que puede evolucionar a una fibrosis pulmonar difusa. Se estudian los cambios histopatológicos, ultraestructurales y de microanálisis elemental mediante espectro de rayos-X dispersado por energía (Energy Dispersive Spectrum), en pulmones de ratones irradiados experimentalmente con dosis subletales de radiaciones ionizantes para observar la aparición de alteraciones tempranas y seguir su evolución posterior.

Palabras claves: Radiaciones ionizantes, pulmones, ratones, histopatología, ultraestructura, microanálisis elemental mediante espectro de rayos X. *Rev Soc Med Quir Hosp Emerg Perez de Leon* 2002; 33(1-2):1-6.

Abstract

The ionizing radiations are physical environmental natural agents or originated from human activities for nuclear energy, industrial, diagnosis and therapeutical purposes. With the development of therapeutic radiation for carcinomas of breast, bronchus, esophagus, lymphoma and other kind of tumors, it was begun to be observed secondary damages in several tissues, especially in pulmonary parenchima due to its high sensibility to radiation and scarce regeneration capacity. Hysthopathological changes are dosis-dependent and vary from inflammatory to neoplastic. Among inflammatory injuries, pneumonitis is described in the early stage that evolve to a pulmonary diffuse fibrosis. Pulmonary changes are study on hysthopathological, ultrastructural and experimental microanalysis by means of the energy dispersive spectrum (EDS) produced by ionizing radiations, in sub-lethal dosis irradiated mice to see early and late alterations produced.

Key words: Ionizing radiations, lung, mice, ultrastructure, histopathology, X-ray spectrum microanalysis. *Rev Soc Med Quir Hosp Emerg Perez de Leon* 2002; 33(1-2): 1-6.

Introducción

Las radiaciones ionizantes son agentes físicos que están en el ambiente en forma natural, aunque pueden ser producto de la actividad humana generada en la obtención de energía nuclear y de su aplicación en medicina para diagnóstico y tratamiento. Desde el descubrimiento de los rayos X en 1895, los investigadores pioneros padecieron sus efectos. Los efectos de las radiaciones ionizantes sobre el pulmón son conocidos desde 1909 ¹. Con la aplicación de la radioterapia en el tratamiento de tumores de mama, bronquios, esófago, linfomas, timomas, germinomas mediastínicos y otras lesiones torácicas, así como con la irradiación corporal total previa al trasplante de médula ósea, comienzan a observarse consecuencias iatrogénicas ²⁻³. Después del hematopoyético,

el tejido pulmonar es uno de los más sensibles, en parte ello se atribuye a su poca capacidad regenerativa. La gama de lesiones anatomopatológicas descritas varían desde cambios inflamatorios con dosis totales radiantes bajas, hasta la transformación neoplásica con dosis elevadas ⁴⁻⁷. Las lesiones inflamatorias que se han descrito consisten en neumonitis en una primera etapa, término acuñado por Chu desde 1955 en sus observaciones de pacientes irradiados en el tórax para tratamiento de carcinoma de mama; cuya base histológica es de carácter vascular exudativo, con presencia de células inflamatorias, predominantemente macrófagos que después de tiempo prolongado evoluciona a fibrosis pulmonar difusa en la fase tardía ⁸⁻⁹. En animales de experimentación se describe una fase de edema

intersticial, fase de alveolitis y fibrosis intersticial. En humanos en 1992 Anderson cita la existencia de un estadio agudo exudativo, Subagudo reparativo y crónico proliferativo¹⁰.

La fase aguda o exudativa se caracteriza por congestión, hemorragia reciente, edema intersticial, alveolar. Se observa además hiperplasia de neumocitos tipo II, infiltrado inflamatorio crónico a veces acompañado de metaplasia escamosa extensa, depósitos de material fibrinoide, presencia de membranas hialinas compuestas por líquido de edema y detritus celulares de acuerdo a la magnitud del agente lesivo. En la fase reparativa predomina la presencia de fibroblastos con producción de matriz colágena y fibrosis intraalveolar. La fibrosis pulmonar difusa es la vía final común de múltiples procesos ocasionando fibrosis intersticial y peribronquial severas, dilatación quística de los alvéolos, disminución de los capilares alveolares, hiperplasia de la media de las arterias y arteriolas pulmonares, metaplasia mucinosa del epitelio de revestimiento a veces con atipias¹⁰⁻¹³. El efecto de las radiaciones ionizantes sobre los tejidos sería producido, por acción directa sobre el Acido desoxiribonucleico (ADN) causando mutaciones, inhibición de la división y muerte celular, así como la formación de radicales libres.

Se observan las alteraciones pulmonares más precoces, se analizan los cambios en la composición de los elementos en el tejido pulmonar, a través de un estudio morfológico de las secciones tisulares de pulmones de ratones irradiados experimentalmente, coloreadas para su observación con microscopio de luz y de ultraestructura con microscopio electrónico de transmisión. Se realizó análisis elemental del tejido pulmonar mediante la espectroscopía de rayos-x.

Materiales y Métodos

Se utilizaron 30 ratones múridos de la cepa NIH, (Instituto Nacional de Higiene) de sexo femenino, de 20 gr de peso corporal, de los cuales 15 fueron irradiados y 15 como controles, sin irradiar. La dosis radiante utilizada fue subletal, de 10 Gy, (dosis

inferior a la letal media de 13Gy para el ratón a los 180 días DL50/180)¹⁴, aplicada durante 10 minutos (1 Gy/min), dirigida a todo el cuerpo en un campo de 30x30 cm con un equipo Theratron modelo 80, A. Energy, Canada y una fuente de ⁶⁰Co en dosis única. Los animales fueron sacrificados a los 8, 15, 30, 90, y 180 días siguientes a la irradiación, de todos ellos se tomaron muestras de pulmón representativas que después de fijadas en formaldehído al 10% se incluyeron en parafina y fueron seccionadas a 4 micras de espesor, para estudio histopatológico. Se realizaron coloraciones de hematoxilina-eosina (H.E), tricómico de Masson, coloración para fibras elásticas de Hart y coloración para fibras de reticulina de Slidders y Lendrun¹²⁻¹⁴. Para el estudio ultraestructural fragmentos de tejido de 2 mm de diámetro fueron fijados en glutaraldehído al 3% en buffer fosfato de Millonig, pH 7,4 a 4 °C y 320 mOsm, lavados en buffer por 5 minutos, fijados en OsO₄ al 1% en el mismo buffer a igual pH y osmolaridad durante una hora y deshidratados con etanol de concentración creciente. La inclusión se hizo en resina LX-112 previo tratamiento con óxido de propileno como solvente. Las secciones de 50-90 nm de espesor se practicaron con un ultramicrotomo Porter Blum MT 2B, fueron recojidas en rejillas de cobre de 3mm, cubiertas de colodión y como contrastantes se utilizaron acetato de uranilo al 3% durante 30 min y citrato de plomo por 10 min. La observación y toma de fotografías fué realizada en un microscopio electrónico de transmisión Hitachi H-500, con voltaje de aceleración de 100 kV. Las secciones obtenidas con el ultramicrotomo fueron coloreadas con azul de toluidina.

Para el estudio de análisis elemental por rayos-x, las muestras de pulmón de 2 mm en solución glucosada al 5% a 4°C, fueron colocadas en estufa a 60°C. Se utilizó un microscopio electrónico de barrido Hitachi modelo S-500 equipado con un sistema de microanálisis elemental mediante espectro de rayos-x dispersado por energía (EDS) Kevex 7000, serie 82. Tres áreas de cada muestra fueron examinadas, con voltaje de aceleración de 20 kV por un tiempo de análisis de 150-

200 seg, con un punto de haz de 50 nm de diámetro. Los espectros fueron evaluados semi-cuantitativamente con un software Via Magic V. Los resultados finales fueron expresados en porcentaje atómico y de peso.

Resultados

Las muestras de pulmones de ratones fueron evaluados por 2 patólogos de la Cátedra de Anatomía patológica y 2 microscopistas electrónicos de la Universidad Central de Venezuela. A los 8 días post-irradiación se encontró en las secciones histológicas sólo escasa vasodilatación de los capilares de la pared alveolar. A los 15 días se evidencian algunos polimorfonucleares neutrófilos, macrófagos y edema alveolar. En cortes de ultramicrotomo coloreados con azul de toluidina también se evidenció discreta acumulación de material laminar formando espirales que sugerían salida de material surfactante ¹⁴. A los 30 días los septos alveolares estaban engrosados con presencia de polimorfonucleares, macrófagos y linfocitos; el edema alveolar persistía en menor grado. A los 90 días se observó disminución de los espacios alveolares con mayor engrosamiento de la pared. A los 180 días había una alteración de la arquitectura pulmonar caracterizada por alvéolos pequeños de pared gruesa, hialina en parte, y en otras partes había áreas de enfisema con ruptura de las paredes y confluencia alveolar. La coloración de tricrómico mostró aumento del colágeno desde los 90 días, igualmente se observó incremento de fibras de reticulina y elásticas con las coloraciones respectivas (Fig. 1 y 2).

Los primeros hallazgos ultraestructurales fueron observados a los 8 días post-irradiación, identificándose cuerpos laminares de neumocitos tipo II en el espacio alveolar, además de lo que parecían ser restos de organelas celulares degeneradas (vesículas y microtúbulos), macrófagos y material surfactante. A los 15 días se identificaron macrófagos activos con bordes externos en forma de pseudópodos, además de polimorfonucleares neutrófilos y eosinófilos. En partes de la pared alveolar había alguna

separación de las fibras colágenas sugestiva de edema intersticial. A los 30 días el citoplasma endotelial alveolar presentaba vesículas pinocíticas dilatadas y además de las células inflamatorias descritas, se observaban neumocitos tipo II con cierto aumento de tamaño de sus citoplasmas y aparente aumento en el número de cuerpos laminares. A los 90 días los cambios anteriores seguían presentes y en la luz capilar se encontraron plaquetas agrupadas; las fibras colágenas intersticiales en la pared alveolar estaban aumentadas. A los 180 días esto último se hizo mucho más marcado (Fig. 3).

Los cambios más importantes del análisis elemental por rayos-x, correspondieron al fósforo y al azufre. Los valores obtenidos en cada estudio para estos elementos se expresaron en forma relativa (relación azufre/fósforo) obteniéndose un valor comparativo. A los 8 días post-irradiación el azufre tuvo un valor mayor que el fósforo (Tabla 1 y 2) como se observaba en los controles. A los 15 días hubo un aumento del fósforo (P) en relación con el azufre (S), invirtiéndose (haciéndose negativa) la relación S/P. Este aumento relativo del fósforo continuó en aumento a los 30 días. Finalmente a los 90 y 180 días se elevó progresivamente de nuevo el valor relativo del azufre. Para el análisis estadístico de estos valores se realizó una prueba de diferencias mínimas significativas, con valores significativos de $p=0,001352$, para los promedios de las lecturas de las muestras tomadas en los distintos períodos del experimento.

Figura 1. Pulmón de ratón, 90 días post-irradiación. Fibrosis de septos alveolares. Tricrómico de Masson 400X.

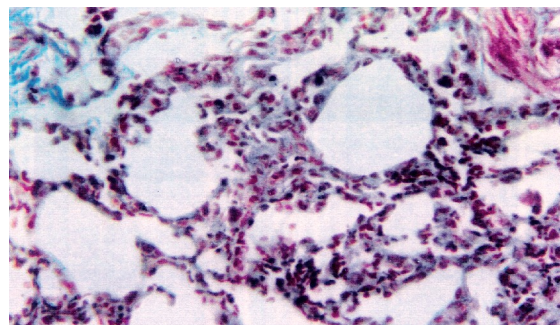


Figura 2. Pulmón de ratón, 90 días post-irradiación. Aumento moderado de fibras. Reticulina 400X.

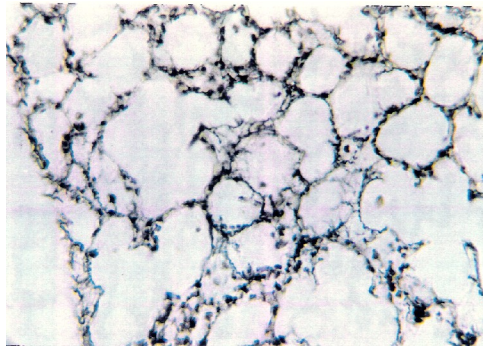


Figura 3. Fibras colágenas en pulmón de ratón, 180 días post-irradiación. ME 8750X.

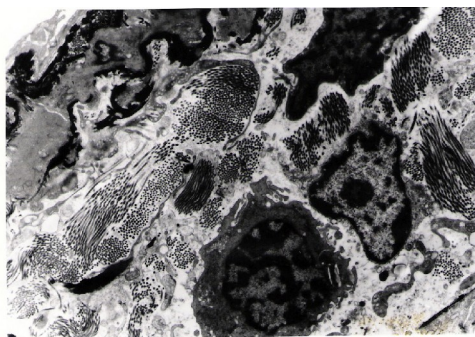


Tabla 1. Resultados del EDS obtenidos en porcentaje atómico (Tres lecturas para cada muestra).

	R C1	R C2	R 8d	R 15d	R 30d	R 90d	R 180d
S1	36,71	62,77	49,41	43,04	32,35	42,27	55,02
S2	50,00	53,56	49,89	40,64	34,06	40,12	48,2
S3	39,21	54,86	49,65	40,18	33,2	44,74	63,63
P1	16,53	37,23	27,7	36,52	40,27	35,2	39,73
P2	36,32	29,43	23,64	44,6	37,17	35,46	38,59
P3	43,08	30,89	25,57	40,3	38,72	36,89	36,37

R C1-2: ratones control; R d: ratones irradiados de 8-180 días post-radiación; S: Azufre; P: Fósforo.

Tabla 2. EDS, resultados relativos del Azufre y el fósforo (S/P).

	R C1	R C2	R C2*	R 8d	R 15d	R 30d	R 90d	R 180d
S/P1	2,22	1,68	-	1,78	1,17	0,8	1,28	1,38
S/P2	1,37	1,81	-	2,11	0,92	0,91	1,13	1,24
S/P3	0,91	1,77	-	1,93	1,05	0,86	1,21	1,74
PROM	1,5	1,75	1,62	1,94	0,9	0,85	1,2	1,45

R C: ratones controles. R d: días post-irradiación; *= Valor promedio de los controles.

Discusión

Los cambios en la pared alveolar de la primera semana como vasodilatación capilar y edema intersticial con presencia de cuerpos laminares de neumocitos tipo II y restos celulares en el espacio alveolar, parecen indicar un efecto por impacto directo de la energía de las radiaciones como ha sido descrito ⁶, con liberación reactiva del material surfactante ⁹. A las dos semanas la neumonitis con edema intersticial y alveolar indica aumento de la permeabilidad capilar ¹⁵. La observación de vesículas pinocíticas endoteliales dilatadas a los 30 días se interpretó como un signo temprano de lesión, semejante a la vacuolización que se ha descrito en estas células según Ward y Solliday ¹⁸. La persistencia y aumento de los cambios de neumonitis después de las cuatro primeras semanas estaría indicando un efecto lesivo continuo que se explicaría por el daño de macromoléculas importantes como el ADN, proteínas estructurales y funcionales debido a la ionización del agua, formación de radicales libres e inicio de reacciones en cadena, producido por las radiaciones, con inhibición de las mitosis, mutaciones, lesión y muerte celular, además de consecuencias posteriores en las células que sobreviven ¹⁷. A los tres meses ya se encuentran signos de reacción reparativa que conducen a la fibrosis, con aumento de fibras colágenas, elásticas y reticulares en el intersticio de la pared alveolar, confirmado con el ME y que es más marcado a los seis meses, apreciándose además un serio trastorno de la arquitectura pulmonar. Otros cambios encontrados como la presencia de neumocitos tipo II con aparente hipertrofia sugieren tal vez una respuesta reactiva al daño con incremento de la producción de surfactante ¹⁸. Un hallazgo interesante fue la agregación plaquetaria intravascular la cual podría ser el inicio de microtrombosis que tendría un papel en la fibrosis debido a la isquemia resultante, como se ha propuesto ⁹. Las plaquetas además producen fibronectina y citoquinas como otras células del proceso inflamatorio que también intervendrían en la fibrogénesis ¹⁹⁻²⁰.

El microanálisis elemental mediante el espectro de rayos-x dispersado por energía o

EDS (Energy Dispersive Spectrum) ²¹ se ha aplicado anteriormente para estudiar diversos aspectos de la patología pulmonar ²²⁻²⁶. Los cambios más importantes que detectamos correspondieron al fósforo y al azufre, elementos que por hallarse en forma no difusible presentan valores más confiables. El aumento observado del fósforo a los 15 y 30 días podría estar relacionado con el incremento de células inflamatorias que contienen ADN en sus núcleos o ser consecuencia de mayor salida y producción de fosfolípidos de la sustancia surfactante. La recuperación en etapas posteriores de los valores del azufre a su vez pudiera estar relacionado con incremento de las proteínas, pues este elemento según Eckenhoff es indicador del contenido de proteínas en los tejidos ²⁷, hallándose en los aminoácidos cistina, cisteína y metionina. Las proteínas que forman el colágeno no son ricas en estos aminoácidos pero en cambio sí lo son las fibras elásticas las cuales contienen cistina ²⁶. Por otro lado la fibronectina, factor que interviene en la fibrogenesis ⁶ posee puentes disulfuro en su molécula, sin embargo estudios posteriores deben realizarse para determinar sus implicaciones en la patogénesis de la fibrosis pulmonar post-radiaciones. El aumento del azufre también puede ser relativo, causado por una disminución del fósforo lo cual podría deberse al pase de la fase aguda a la crónica con enlentecimiento del cuadro inflamatorio agudo y menor número de núcleos (ADN) presentes o estar relacionado con una menor producción de surfactante (fosfolípidos) en la parte final del proceso. En cuanto a la intensidad de daño producido en el pulmón de estos ratones, hay que considerar las diferencias genéticas en sensibilidad a las radiaciones ionizantes existente entre diferentes razas múridas, ya que se ha encontrado variación en el grado de fibrosis producido entre ellas ²⁸⁻³¹. Según la respuesta obtenida los ratones múridos NIH tendría una sensibilidad intermedia entre las muy sensibles y las más resistentes.

Referencias

1. Wohlhauer R. Die Einfluss der Roentgenstrahlen auf der Lungengewebe. Deutsh Medizin. Wochenschr. 1909; 35:1074-1076.
2. Thomas D E, Buckner C, Strob R. Total body irradiation in preparation for marrow engraftment. Transplant. Proceed. 1976; 4: 591-593.
3. Weshler Z, Breuer R, Naparstek M, Pfeffer R, Lowental E, et al. Interstitial pneumonitis after total body irradiation: effect of partial lung shielding. Br. J. Hematol. 1990; 74: 61-64
4. Van Dyke J Radiation Pneumonitis following large single dose irradiation: A reevaluation based on absolute dose to lung. Int.J.Rad.Oncol.Biol.Phys. 1981; 7:461
5. Molls M, Herrmann T, Steinberg F, Feldmann HJ Radiopathology of the lung: Experimental and clinical observations. Recent Results Cancer Res.1993;130:109-21.
6. Taya A, Black A, Baker ST, Humphreys JA. Proliferation of mouse lung epithelial cells after inhalation exposure to ²³⁹PuO₂. Radiat Res. 1993;136(3):366-72.
7. Gross NJ, Narine KR. Experimental radiation pneumonitis. Corticosteroids increase the replicative activity of alveolar type 2 cells. Radiat Res. 1988;115(3):543-9.
8. Chu, FCH. Pneumonitis following radiation therapy for cancer of the breast by tangential technique. Radiol. 1955;64: 642-653.
9. Hasleton PS. Spencer's Pathology of the lung. 5th Ed. McGraw Hill Co NY 1996.
10. Anderson WR, Thielen K. Correlative study of adult respiratory distress syndrome by light scanning and transmission electron microscopy. Ultrastruct Pathol. 1992;16(6):615-28.
11. Ogino S, Franks TJ, Yong M, Koss MN. Extensive squamous metaplasia with cytologic atypia in diffuse alveolar damage mimicking squamous cell carcinoma: a report of 2 cases. Hum Pathol. 2002;33(10):1052-4.
12. Down JD, Steel G. The expression of early and late damage after thoracic irradiation. A comparison between CBA and C57 mice. Radiat Res. 1983;96(3):603-10.
13. Johnston CJ, Williams JP, Elder A, Hernady E, Finkelstein JN. Inflammatory cell recruitment following thoracic irradiation. Exp Lung Res. 2004;30(5):369-82.
14. Culling CFA;. Handbook of Histopathological Technique. Butterworth & Co. Publishers. London. 1957
15. Lockhart SP, Down JD, Steel GG. The effect of low dose-rate and cyclophosphamide on the radiation tolerance of the mouse lung. Int J Radiat Oncol Biol Phys. 1986;12(8):1437-40.
16. Gross NJ Surfactant subtypes in experimental lung radiation pneumonitis. Am J Physiol. 1991;260(4 Pt 1):L302-10.
17. Sharplin J, Franko A J. Pulmonary oedema during the latent period after irradiation of murine lung. Br J Cancer Suppl. 1986;7:336-9.

18. Ward WF, Solliday NH, Molteni A, Port CD. Radiation injury in rat lung. II. Angiotensin-converting enzyme activity. *Radiat Res.* 1983;96(2):294-300.
19. Phillips T, Fishman A`s. *Pulmonary diseases and disorders* 2nd Edit. Mc Graw Hill NY. 1988
20. Gross N.J. Experimental radiation pneumonitis. III. Phospholipids studies in the lung. *J Lab Clin Med.* 1979;93(4):627-37.
21. Corrin B, Dewar A. Pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis. *Ultrastruct Pathol.* 1996;20(4):369-71.
22. Ward H E, Kemsley L, Davies L, Holecek M, Berend N. The pulmonary response to sublethal thoracic irradiation in the rat. *Radiat Res.* 1993;136(1):15-
23. Terzakis JA. X ray microanalysis problem solving in surgical pathology. *Pathol Annu.* 1985;20 Pt 2:59-81
24. Down JD, Easton DF, Steel GG. Repair in the mouse lung during low dose-rate irradiation. *Radiother Oncol.* 1986;6(1):29-42.
25. Papadimitriou JC, Drachenberg CB. Ultrastructural analysis of asteroid bodies: evidence for membrane lipid bilayer nature of components. *Ultrastruct Pathol.* 1992;16(4):413-21.
26. Terzakis J. X ray micranalysis of periferal lung carcinomas. *Ultrastruct Pathol* 1995; 19:167-173
27. Eckenhoff RG, Rannels SR, Fisher AB. Secretory granule calcium loss after isolation of rat alveolar type II cells. *Am J Physiol.* 1991;260(2 Pt 1):L129-35.
28. Franko A, Sharplin J, Ward W, Hinz J. The genetic basis of strain-dependent differences in the early phase of radiation injury in the mouse lung. *Radiat Res.* 1991 Jun;126(3):349-56.
29. Araya J, Maruyama M, Sassa K, Fujita T, Hayashi R, et al. Ionizing radiation enhances matrix metalloproteinase-2 production in human lung epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2001;280(1):30-8.
30. O'Brien TJ, Letuve S, Haston CK. Radiation-induced strain differences in mouse alveolar inflammatory cell apoptosis. *Can J Physiol Pharmacol.* 2005;(1):117-22.
31. Iwakawa M, Noda S, Ohta T, Oohira C, Tanaka H, Tsuji A, Ishikawa A, Imai T. Strain dependent differences in a histological study of CD44 and collagen fibers with an expression analysis of inflammatory response-related genes in irradiated murine lung. *J Radiat Res (Tokyo).* 2004;45(3):423-33.

This document was created with Win2PDF available at <http://www.win2pdf.com>.
The unregistered version of Win2PDF is for evaluation or non-commercial use only.
This page will not be added after purchasing Win2PDF.