



UNICAMP



JOSÉ OSMAR VASCONCELOS FILHO

Cirurgião Dentista

UNICAMP

BIBLIOTECA CENTRAL

SEÇÃO CIRCULANTE

AVALIAÇÃO DO EFEITO RADIOPROTETOR DA  
VITAMINA E (dl- $\alpha$ -tocoferil) EM FERIDAS DE  
RATOS SUBMETIDOS A ALTAS DOSES DE  
RADIAÇÃO DE ELÉTRONS EM CORPO-TOTAL

Tese apresentada à Faculdade de  
Odontologia de Piracicaba, da  
Universidade Estadual de Campinas,  
para obtenção do título de MESTRE em  
Radiologia Odontológica.

PIRACICABA

2001

CIDADE <u>Be</u>	
CHAMADA:	
<u>T/Unicom</u>	
<u>44,0</u>	
Ex	
OMBO BC/	<u>45916</u>
ROC.	<u>16-392101</u>
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREC	<u>R\$11,00</u>
DATA	<u>10/08/01</u>
N.º CPD	

CM00158370-9



UNICAMP



**JOSÉ OSMAR VASCONCELOS FILHO**  
Cirurgião Dentista

**AVALIAÇÃO DO EFEITO RADIOPROTETOR DA  
VITAMINA E (dl- $\alpha$ -tocoferil) EM FERIDAS DE  
RATOS SUBMETIDOS A ALTAS DOSES DE  
RADIAÇÃO DE ELÉTRONS EM CORPO-TOTAL**

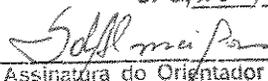
Tese apresentada à Faculdade de  
Odontologia de Piracicaba, da  
Universidade Estadual de Campinas,  
para obtenção do título de MESTRE em  
Radiologia Odontológica.

Orientador: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup> Solange Maria de Almeida

Banca Examinadora: Prof. Dr. Edmundo Médici Filho  
Prof. Dr. Frab Norberto Bóscolo  
Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup> Solange Maria de Almeida

Este exemplar foi devidamente corrigido,  
de acordo com a Resolução CCPG-036/83

CPG, 20 / 06 / 01



Assinatura do Orientador

PIRACICABA  
2001

### Ficha Catalográfica

V441e Vasconcelos Filho, José Osmar.  
Estudo do efeito radioprotetor da vitamina E (dl-alfa-tocoferil) na reparação tecidual em ratos. / José Osmar Vasconcelos Filho. -- Piracicaba, SP : [s.n.], 2001.  
x, 82f. : il.

Orientadora : Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Solange Maria de Almeida.  
Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

I. Radiação ionizante. 2. Antioxidantes. 3. Radicais livres – Biologia. I. Almeida, Solange Maria de. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.

Ficha catalográfica elaborada pela Bibliotecária Marilene Girello CRB/8-6159, da Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Piracicaba - UNICAMP.



FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA  
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Tese de MESTRADO, em sessão pública realizada em 22 de Fevereiro de 2001, considerou o candidato JOSÉ OSMAR VASCONCELOS FILHO aprovado.

1. Profa. Dra. SOLANGE MARIA DE ALMEIDA

Handwritten signature of Solange Maria de Almeida in cursive script, written over a horizontal line.

2. Prof. Dr. EDMUNDO MÉDICI FILHO

Handwritten signature of Edmundo Médici Filho in cursive script, written over a horizontal line.

3. Prof. Dr. FRAB NORBERTO BOSCOLO

Handwritten signature of Frab Norberto Boscolo in cursive script, written over a horizontal line.

## **Dedico este Trabalho**

Meus pais, **Osmar e Adélia**, que orientados por Deus, criaram uma família em que estudo e trabalho sempre foram tidos como base de uma boa formação.

À minha esposa **Carla** e minhas filhas **Jéssica e Lorena**, que me ajudaram a não desistir nos momentos mais difíceis em que a distância nos colocou e que “não podem ser a razão do meu viver já que são toda a minha vida”

## **Agradecimento Especial**

**À Professora Doutora Solange Maria Almeida**, mestra, a quem devo a realização deste trabalho, sua amizade, compreensão, disponibilidade, competência e estímulo me serviram de exemplo a ser seguido.

Agradeço aos professores

**Dr. Mário Roberto Vizioli**

**Dr Frab Norberto Bóscolo**

Pela orientação precisa e a experiência profunda transmitida para que o trabalho fosse concluído.

Aos professores **Agenor Montebello Filho e Francisco Haiter Neto** por poder contar sempre com o seu apoio no momento necessário.

Agradeço aos colegas:

**Anna Sílvia, Cláudia, Fabrício, Luciene, Mariliani, Melissa, Rívea, Tasso** e em especial, **Ricardo Matheus e Flávio Manzi** que me acolheram tão bem em seu meio e que com sua juventude e entusiasmo serviram de exemplo para que eu pudesse alcançar o final do curso.

Aos funcionários da disciplina de Radiologia da FOP:

**Raquel, Waldeck, Giselda e Gislaine** que sempre nos ajudaram em todos os momentos necessários.

Agradeço à Faculdade de Odontologia de Piracicaba, nas pessoas do Senhor Diretor, **Prof. Dr. Antônio Wilson Sallum**, e Diretor Associado, **Prof. Dr. Frab Norberto Bóscolo**, pela acolhida e pela luta para proporcionar condições ideais para o desenvolvimento dos Programas de Pós-Graduação.

Agradecimentos à **Faculdade de Odontologia da Universidade de Fortaleza (UNIFOR)** nas pessoas de seus dirigentes, doutores e funcionários.

Agradeço:

**Ao Chanceler Dr. Airton Queiroz**

**Ao Reitor Dr. Alberto Batista Souza**

**À Diretora do Centro de Ciências da Saúde Dr<sup>a</sup> Fátima Maria Fernandes Veras.**

Aos coordenadores passados e atual do curso de Odontologia:

**Dr. Galba Gomes**

**Dr. Haroldo Rodrigues**

**Dr<sup>a</sup> Polyana Rocha Novais**

Que me liberaram dos meus afazeres nessa Instituição, possibilitando a realização e conclusão deste trabalho.

Agradeço especialmente ao **Dr. Lúcio Mitsuo Kurita**, grande colega e amigo, sem a sua ajuda, compreensão e disponibilidade, seria impossível ter o tempo e as condições necessárias para realizar este trabalho.

Agradeço a **Professora Sandra Ximenes** e ao técnico **André Lírio** o apoio, e em fazer com que minha ausência não prejudicasse às atividades da disciplina.

Ao **CNPq**, pela concessão da bolsa de estudo.

# SUMÁRIO

Lista de Figuras .....	01
Resumo .....	04
Abstract .....	06
1- Introdução .....	08
2- Revista de Literatura .....	11
2.1- Reparação tecidual e radiação ionizante .....	11
2.2- Radiação ionizante e vitamina E .....	19
3- Proposição .....	30
4- Materiais e Método .....	31
4.1- Materiais .....	31
4.2- Métodos .....	33
5- Resultados .....	38
6- Discussão .....	62
7- Conclusão .....	75
8- Referência bibliográfica .....	76

## LISTA DE FIGURAS

Prancha 1 – Coloração por Hematoxilina-Eosina – 4º dia .....	41
Figura 1 – Grupo Controle – Aumento original 6,3 x 1,25 x 10 .....	41
Figura 1a – Grupo Controle – Aumento original 16 x 1,25 x 10 .....	41
Figura 2 – Grupo Vitamina E – Aumento original 6,3 x 1,25 x 10 .....	41
Figura 2a – Grupo Vitamina E – Aumento original 16 x 1,25 x 10 .....	41
Prancha 2 – Coloração por Hematoxilina-Eosina – 4º dia .....	42
Figura 3 – Grupo Irradiado – Aumento original 6,3 x 1,25 x 10 .....	42
Figura 3a Grupo Irradiado – Aumento original 16 x 1,25 x 10 .....	42
Figura 4 – Grupo Irradiado/Vitamina E – Aumento original 6,3 x 1,25 x 10 .....	42
Figura 4a Grupo Irradiado/Vitamina E – Aumento original 16 x 1,25 x 10 .....	42
Prancha 3 – Coloração por Hematoxilina-Eosina – 4º dia .....	43
Figura 5 – Grupo Óleo de Oliva – Aumento original 6,3 x 1,25 x 10 .....	43
Figura 5a – Grupo Óleo de Oliva – Aumento original 16 x 1,25 x 10 .....	43
Prancha 4 – Coloração por Hematoxilina-Eosina – 7º dia .....	46
Figura 6 – Grupo Controle – Aumento original 6,3 x 1,25 x 10 .....	46
Figura 6a Grupo Controle – Aumento original 16 x 1,25 x 10 .....	46
Figura 7 – Grupo Vitamina E – Aumento original 6,3 x 1,25 x 10 .....	46
Figura 7a Grupo Vitamina E – Aumento original 16 x 1,25 x 10 .....	46
Prancha 5 – Coloração por Hematoxilina-Eosina – 7º dia .....	47
Figura 8 – Grupo Irradiado – Aumento original 6,3 x 1,25 x 10 .....	47

Figura 8a Grupo Irradiado – Aumento original 16 x 1,25 x 10 .....	47
Figura 9 – Grupo Irradiado/Vitamina E – Aumento original 6,3 x 1,25 x 10 .....	47
Figura 9a Grupo Irradiado/Vitamina E – Aumento original 16 x 1,25 x 10 .....	47
Prancha 6 – Coloração por Hematoxilina-Eosina – 7º dia .....	48
Figura 10 – Grupo Óleo de Oliva – Aumento original 6,3 x 1,25 x 10 .....	48
Figura 10a Grupo Óleo de Oliva – Aumento original 16 x 1,25 x 10 .....	48
Prancha 7 – Coloração por Hematoxilina-Eosina – 14º dia .....	51
Figura 11 – Grupo Controle – Aumento original 6,3 x 1,25 x 10 .....	51
Figura 11a Grupo Controle – Aumento original 16 x 1,25 x 10 .....	51
Figura 12 – Grupo Vitamina E – Aumento original 6,3 x 1,25 x 10 .....	51
Figura 12a Grupo Vitamina E – Aumento original 16 x 1,25 x 10 .....	51
Prancha 8 – Coloração por Hematoxilina-Eosina – 14º dia .....	52
Figura 13 – Grupo Irradiado – Aumento original 6,3 x 1,25 x 10 .....	52
Figura 13a Grupo Irradiado – Aumento original 16 x 1,25 x 10 .....	52
Figura 14 – Grupo Irradiado/Vitamina E – Aumento original 6,3 x 1,25 x 10 .....	52
Figura 14a Grupo Irradiado/Vitamina E – Aumento original 16 x 1,25 x 10 .....	52
Prancha 9 – Coloração por Hematoxilina-Eosina – 14º dia .....	53
Figura 15 – Grupo Óleo de Oliva – Aumento original 6,3 x 1,25 x 10 .....	53
Figura 15a Grupo Óleo de Oliva – Aumento original 16 x 1,25 x 10 .....	53
Prancha 10 – Coloração por Hematoxilina-Eosina – 21º dia .....	56
Figura 16 – Grupo Controle – Aumento original 6,3 x 1,25 x 10 .....	56
Figura 16a Grupo Controle – Aumento original 16 x 1,25 x 10 .....	56
Figura 17 – Grupo Vitamina E – Aumento original 6,3 x 1,25 x 10 .....	56

Figura 17a Grupo Vitamina E – Aumento original 16 x 1,25 x 10 .....	56
Prancha 11 – Coloração por Hematoxilina-Eosina – 21° dia .....	57
Figura 18 – Grupo Irradiado – Aumento original 6,3 x 1,25 x 10 .....	57
Figura 18a Grupo Irradiado – Aumento original 16 x 1,25 x 10 .....	57
Figura 19 – Grupo Irradiado/Vitamina E – Aumento original 6,3 x 1,25 x 10 .....	57
Figura 19a Grupo Irradiado/Vitamina E – Aumento original 16 x 1,25 x 10 .....	57
Prancha 12 – Coloração por Hematoxilina-Eosina – 21° dia .....	58
Figura 20 – Grupo Óleo de Oliva – Aumento original 6,3 x 1,25 x 10 .....	58
Figura 20a Grupo Óleo de Oliva – Aumento original 16 x 1,25 x 10 .....	58
Prancha 13 – Coloração por Azul de Toluidina .....	61
Figura 21 – Incidência Paralela ao Plano de polarização da luz .....	61
Figura 22 – Incidência perpendicular ao Plano de polarização da luz.....	
Coloração azul ortocromática .....	61
Figura 23 – Incidência paralela ao Plano de polarização da luz .....	61
Figura 24 – incidência perpendicular ao Plano da luz .....	
Coloração róseo metacromática .....	61

## RESUMO

O efeito da Vitamina E sobre o processo de reparação tecidual de feridas irradiadas foi avaliado na presente pesquisa. Para tanto, ratos da linhagem Wistar sofreram um procedimento cirúrgico, sendo produzida uma ferida na região dorsal de cada animal, os quais constituíram cinco grupos experimentais: Grupo Controle, o qual foi constituído por animais que sofreram apenas o procedimento cirúrgico e não se submeteram a nenhum tipo de procedimento terapêutico; Grupo Irradiado, formado por animais que receberam uma dose de 6 Gy de radiação de elétrons com energia de 6 MeV, sendo irradiados corpo total; Grupo Vitamina E, cujos animais receberam uma dose de 180 U.I. de vitamina E, dissolvidos em 1,0 ml de óleo de oliva, 48 horas antes do procedimento cirúrgico; Grupo Óleo de Oliva, formado por

animais que receberam 1,0 ml de óleo de oliva, também 48 horas antes da cirurgia; e por fim o Grupo Vitamina E/Radiação, cujos animais receberam o mesmo tratamento que o grupo Vitamina E e 72 horas após a cirurgia foram irradiados. A avaliação do processo de reparação tecidual foi realizada 4, 7, 14 e 21 dias após a produção da ferida, sendo avaliada pelos métodos: Hematoxilina-Eosina e Dicroísmo. A avaliação dos resultados, permitiu concluir que a Vitamina E pode ser considerada um radioprotetor, visto que o grupo de animais que sofreu irradiação e foi tratado com vitamina E, apresentou um processo de reparação tecidual semelhante ao grupo controle.

## **ABSTRACT**

The vitamin E effect upon the process of tissue repair of the irradiated wounds was evaluated in this study. For this purpose, Wistar race rats underwent a surgical procedure, reproducing a wound on the dorsal region of each animal. They consisted of five experimental groups: Control Group, where the animals had just the surgical procedure, but no therapeutical procedure; Irradiated Group, where they've recieved a 6 Gy electron radiation dosage, with a 6 MeV energy on their whole body; Vitamin E Group, where the animals recieved a 180 U.I. vitamin E dosage, dissolved in 1,0 ml of olive oil, 48 hours before the surgical procedure; Olive Oil Group, formed by animals which had 1,0 ml of olive oil only, 48 hours before the procedure; and finally the

Vitamin E / Radiation Group, where the animals received the same treatment as the vitamin E group and 72 hours after the surgery they were irradiated. The evaluation of the tissue repair process was done 4, 7, 14 and 21 days after the wound was done, using the Hematoxylin-Eosin and Dicroism methods. The results analysis enabled us to conclude that the Vitamin E could be considered as a radioprotector, once the group of animals that were irradiated and treated with vitamin E presented the same tissue repair process as the Control Group.

## **1- INTRODUÇÃO**

O uso de radiações ionizantes com as mais diferentes finalidades continua sendo uma constante, desde que os raios X foram descobertos por Wilhelm Conrad Röntgen, em 1895. A ação da radiação ionizante nos tecidos vivos vem sendo estudada e muito tem sido esclarecido a respeito da interação da radiação com esses tecidos. Sabe-se que tornam-se inevitáveis os danos causados pela radiação quando esta interage com células vivas e isso constitui o principal fator que faz com que esse tipo de energia seja utilizada no tratamento de diversos tipos de câncer, levando-se em consideração a radiosensibilidade de células e tecidos. Entretanto, apesar das mais modernas formas de colimação é impossível evitar a produção de elementos nocivos que se formam quando ocorre a interação da radiação ionizante com os tecidos

vivos. Esses elementos, conhecidos como radicais livres, podem muitas vezes causar sérios danos ao organismo. Em virtude disso, muitas pesquisas vêm sendo realizadas tendo como finalidade estudar diversos compostos que podem, se não evitar, pelo menos diminuir a formação de radicais livres decorrente do uso das radiações ionizantes. Esses compostos são conhecidos como substâncias radioprotetoras. Diversas substâncias que ocorrem naturalmente vêm sendo estudada com esse fim, podendo-se citar a vitamina C, vitamina A, compostos derivados de selênio, betacaroteno, zinco e a vitamina E. Outras substâncias, os radioprotetores químicos, também são usados, principalmente quando ocorrem acidentes nucleares. Dentre eles pode-se citar os compostos WR-2721, WR-151327 e WR-3689.

O uso de substâncias radioprotetoras está intimamente relacionado ao seu efeito tóxico no organismo. Portanto, as pesquisas crescem principalmente em relação aos compostos naturais ou nutricionais, visto que esses compostos podem além de exercer eficazmente sua atividade radioprotetora, ainda trazer benefícios ao organismo decorrente de seu longo uso, como por exemplo efeitos anti-mutagênicos.

O tratamento de tumores a cada dia vem sendo realizado de forma multidisciplinar. Assim, tornou-se comum a realização do tratamento cirúrgico associado ao tratamento radioterápico. Muitas vezes, a cirurgia pode ser realizada no sentido de proporcionar melhor estética à pacientes que passaram por uma cirurgia reparadora. Portanto, deve-se levar em consideração, a ação da radiação ionizante no processo de reparação tecidual e por conseguinte, uma vez que já é sabido que a radiação ionizante interfere no processo de

reparação, estudos devem ser realizados para avaliar o efeito de substâncias já conhecidas como radioprotetoras, no processo de cura de feridas cirúrgicas que sofreram irradiação. A vitamina E, apesar de ser conhecida por sua atividade radioprotetora, ainda traz bastante controvérsia na realização desta função. Além disso, o seu papel no processo de reparação tecidual em feridas irradiadas, não foi estudado na literatura vista. Diante disso, torna-se de suma importância a realização de um trabalho com tal finalidade.

## 2- REVISTA DA LITERATURA

### 2.1- Reparação Tecidual e Radiação Ionizante

Devido a importância da angiogênese durante a reparação tecidual, **VAN DEN BRENK**, em 1959, avaliou o efeito de doses de 200 a 5.000 R de radiação X e  $\gamma$ , no tecido de granulação induzido em coelhos, irradiado após 5 a 7 dias de formação. Microscopicamente foi observado que doses menores que 400 R, de ambos os tipos de radiação, não alterou o crescimento de brotos capilares. Entretanto, o uso de doses entre 400 a 2.000 R causou dano imediato aos brotos capilares. Doses acima de 2.000 R impediram o crescimento dos brotos capilares.

Um estudo realizado sobre a organização macromolecular do tecido de granulação, induzido por esponjas implantadas subcutaneamente, foi realizado por **VIZIOLI**, em 1971, nos tempos de 3, 5, 7, 10, 13, 16, 21 e 28 dias da implantação de esponjas nos ratos. Foi observado então dois diferentes aspectos morfológicos para o tecido de granulação formado: a presença de uma cápsula fibrosa e tecido de granulação interno à esponja. O exame de dicroísmo revelou que a associação macromolecular entre as moléculas de glicosaminoglicanas e o colágeno teve início no sétimo dia de evolução do processo de reparação tecidual, atingindo sua organização após duas semanas.

Em 1973, o efeito da radiação X no endotélio capilar de ratas foi avaliado por **REINHOLD & BUISMAN**. A irradiação foi realizada com doses de 500 rad ministrada de uma única vez e dose de 500 rad aplicada duas vezes no mesmo animal com um intervalo de 24 horas. Após a irradiação, foi induzida a proliferação capilar. Foi observado que nos animais não irradiados, o tecido subcutâneo mostrou-se repleto de capilares. Nos animais irradiados houve redução na quantidade de vasos néo formados, sendo essa redução maior com dose total de 1.000 rad.

**DRÓZDZ et al**, em 1981, avaliaram o conteúdo de moléculas de glicosaminoglicanas (GAGs) em condições de irradiação sub-aguda, com doses fracionadas. Para tanto, ratos sofreram irradiação corpo total com dose única de 500 R de radiação  $\gamma$ . Após transcorridos 37 dias, estes foram sacrificados, sendo obtidas amostras de sangue, parede da aorta, pele da região abdominal, fígado e

pulmão. Houve um aumento significativo na quantidade de GAGs da pele, fígado, pulmão e parede da aorta. Em relação a taxa sérica dessas moléculas, não houve diferença significativa entre os animais irradiados e não irradiados. Esses achados indicam que a irradiação do tecido conjuntivo danifica a substância amorfa. Portanto, os autores concluíram que a radiação causa severos distúrbios no metabolismo das GAGs.

Em 1984, **MOORE**, publica uma revisão sobre a ação de radiação ionizante no processo de reparação tecidual. Segundo o autor, quando uma ferida é irradiada, estando o tecido de granulação já formado, a proliferação capilar e fibroblástica sofre um decréscimo, sendo retardada a síntese e maturação de colágeno. Ainda afirma o autor que o efeito é dose-dependente e doses únicas menores que 300 rad não causam retardo significativo no processo de reparação, enquanto doses de 1.000 rad já provocam alterações morfológicas e bioquímicas.

Também em 1984, **FRANKLIN & COULTAS**, avaliaram histologicamente componentes dérmicos e epidérmicos na reparação de feridas irradiadas. Foram usadas doses únicas de 10, 20 e 35 Gy de radiação X. Imediatamente e após 1, 2, 3 e 7 dias, foi realizada uma excisão na orelha dos animais e 5, 11 e 24 dias após esta cirurgia, os animais foram sacrificados. Foi observado retardo na reparação tecidual em todas as doses, sendo que com 35 Gy houve maior dano. Em relação ao preenchimento dérmico, este estava completo após 7 dias da cobertura epitelial. Os autores concluem que a irradiação de feridas deve ser realizada pelo menos 1 semana após o fechamento macroscópico da ferida.

**BARTON *et al***, em 1985, estudaram o efeito de doses eritematosas de radiação X em indivíduos que estavam sofrendo radioterapia. Em uma etapa do estudo, 5 indivíduos receberam 0,1; 0,5; 1 e 2 Gy, em dose única numa região da pele, que foi removida 6 dias após. Em outra etapa, 6 pacientes tiveram a pele exposta à 1 Gy e avaliada 1, 3, 7 e 14 dias após a irradiação. Os autores concluíram que com doses acima de 0,5 Gy ocorre redução temporária na divisão de células epidérmicas, caracterizando alterações funcionais após 3 dias da irradiação com 1 Gy, em 3 estágios do processo de queratinização.

Em 1987, **GUIDUGLI NETO** realizou feridas excisionais em ratos e 6 dias após irradiou-as com 2.000 rad. Animais controle e irradiados foram sacrificados 30 minutos; 1, 3, 6, 12 e 24 horas; 3, 7, 15 e 30 dias após. O autor observou baixo volume vascular relativo desde 30 minutos até 7 dias de observação, tanto no grupo controle como no grupo irradiado. Entretanto, este mostrou-se menor nos ferimentos irradiados, exceção feita ao tecido avaliado com 30 dias.

**KRISHNAN *et al***, também em 1987, estudaram a permeabilidade vascular, submetendo o tecido muscular de coelhos à 2, 4, 6, 8, 10, 12, 15, 20, 25, e 30 Gy de radiação X. Para avaliar a permeabilidade no momento da irradiação, foi injetada em metade dos animais albumina marcada com Iodo -125 e Sódio -22. Outra parte dos animais sofreu o mesmo procedimento 16 a 24 horas após a irradiação. O extravasamento de albumina marcada aumentou, imediatamente após a irradiação com doses tão baixas quanto 2 Gy, aumentando com doses mais elevadas. Doses equivalentes e maiores que 15 Gy foram observadas

alterações histológicas como hemorragia, granulações citoplasmáticas, edema intersticial, fibrose e espessamento da parede endotelial.

Em 1989, **BAKER & KROCHAK**, comentam sobre a relação entre a resposta vascular à irradiação e o dano tecidual precoce e tardio. Segundo os autores a permeabilidade vascular é a reação precoce e universal do tecido conjuntivo, sendo esta decorrente da despolimerização da substância cimentante mucopolissacarídea e liberação de enzimas vasoativas, como a histamina e serotonina. Entretanto, essa permeabilidade é transitória, durando somente poucas horas após a irradiação com doses inferiores a 1.000 rad, mas com maior duração com doses mais elevadas.

**MUSTOE *et al***, também em 1989, demonstraram a habilidade do fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF-BB) em reverter o processo de cicatrização de feridas prejudicadas por radiação em ratos que receberam irradiação local de 2500 rad pré-operatoriamente. Quando 800 rad de radiação de elétrons foram aplicados em todo o animal, o PDGF-BB não foi capaz de reverter o prejuízo na cicatrização. A depressão de macrófagos derivados da medula óssea, tornou esses animais incapazes de responder ao fator de crescimento aplicado exogenamente. Ainda, segundo o autor uma dose de 800 rad, aplicada em corpo todo é suficiente para produzir uma profunda depressão temporária da medula óssea.

**CROMACK *et al***, em 1993, estudaram o mecanismo de aceleração da cicatrização de feridas pelo fator transformante de crescimento (TGF- $\beta_1$ ) em

cicatrização prejudicada pela ação da radiação. Para tanto, um grupo de ratos foi irradiado pré-operatoriamente com uma dose única de 800 rad, utilizando uma bomba de cobalto 60. Outro grupo foi irradiado localmente com 2500 rad de radiação de elétrons com um feixe de 6 MeV. Dois dias após as irradiações foram produzidas duas incisões na pele dorsal de cada animal, onde em uma delas foi aplicada o TGF- $\beta_1$ . Um terceiro grupo de animais correspondia ao grupo controle. Os animais foram sacrificados 7 e 14 dias após o ferimento. Os autores observaram que nos dois grupos irradiados houve uma marcada deficiência na cicatrização da ferida. Naqueles animais que tiveram todo o corpo irradiado houve uma marcada supressão do sistema hematopoiético, com diminuição de macrófagos, o que não foi observado nos animais que receberam radiação local. A aplicação de TGF- $\beta_1$  acelerou a reparação e promoveu maior resistência tênsil à ferida nos animais irradiados corpo total, mas não nos animais irradiados localmente.

Em 1993, **VEGESNA et al**, quantificaram o impacto de irradiação local e sistêmica na cicatrização de feridas em ratos através da resistência tênsil das feridas medida com 14 dias. Os animais tiveram o corpo todo irradiado, metade de seus corpos irradiados e irradiação local, antes do ferimento. A dose para encontrar um mesmo efeito de 40% da resistência tênsil dos controles feridos foi 13 Gy menos para a exposição de corpo total do que para a irradiação local. As observações histológicas mostraram marcadamente poucas células inflamatórias nos animais que tiveram metade do corpo irradiada e corpo total, quando

comparado àqueles que foram irradiados localmente. Esses dados demonstram que a resposta da cicatrização em pele irradiada depende da extensão da supressão hematopoiética e que para baixas doses isso determina o resultado que o dano para células alvo, tais como os fibroblastos, que são relativamente resistentes à radiação.

O efeito da radiação de elétrons no processo de reparo foi avaliado por WANG *et al*, em 1994. Os autores utilizaram uma dose de 9,6 Gy de um feixe de elétrons com 4 MeV de energia aplicada na porção dorsal de ratos. Após 7 dias foi realizada uma incisão na área irradiada, sendo os animais sacrificados 1, 3, 7 e 14 dias após. Através de microscopia óptica e eletrônica, foi observado que a união epitelial estabeleceu-se 3 dias pós-cirurgia para os animais não irradiados e 7 dias para os irradiados. Observou-se que havia poucos fibroblastos e fibras colágenas mais esparsas e menos organizadas no grupo irradiado, indicando um retardo na reparação tecidual, entretanto esta restabeleceu-se no 14<sup>o</sup> dia.

DRAKE & OISHI, em 1995, fizeram alguns comentários sobre o processo de reparo em pacientes submetidos à quimioterapia e radioterapia, citando que a fase inflamatória parece ser a mais sensível nesses indivíduos. Segundo os autores, a radiação produz efeitos agudos e tardios sobre a cicatrização, sendo a injúria tecidual resultante de dano direto e indireto ao DNA celular, decorrente da formação de radicais livres. Citam ainda que sobre os elementos celulares, nos limites da pele irradiada, parecem ser progressivos e permanentes. A análise microscópicas mostra estase e oclusão de pequenos vasos sanguíneos; os

fibroblastos sofrem alterações funcionais com a produção de colágeno deficiente que pode ser decorrente ou de uma produção insuficiente ou de um tempo para maturação mais longo.

Em 1997, SONG & CHENG, avaliaram o efeito de irradiação local e sistêmica em macrófagos de feridas. Os autores avaliaram o número de macrófagos, a função fagocitária e substâncias liberadas por essas células (fator de necrose de tumor e interleucina-1), bem como a resistência tênsil das feridas. Após 6 Gy de irradiação sistêmica a função fagocitária de macrófagos da ferida, a liberação de fator de necrose de tumor e interleucina-1, bem como o número de macrófagos da ferida estavam significativamente diminuído com 3, 5 e 8 dias após o ferimento. Após 20 Gy de irradiação local, a taxa de macrófagos foi significativamente diminuída nos dias 3, 5, 8 e 13 após o ferimento, mas a função dos macrófagos não estava diminuída. Por fim, os autores concluem que a diminuição do número e função de macrófagos da ferida representa um importante papel na cicatrização de ferida prejudicada por irradiação sistêmica.

O efeito de 1 Gy de radiação de elétrons, produzido por um feixe de 6 MeV, no processo de reparação tecidual, administrado nas bordas de feridas, imediatamente e 3 dias após a produção destas em ratos, foi avaliado por ALMEIDA, em 1997. O processo foi avaliado aos 2, 4, 7, 11, 14, 17 e 21 dias após a irradiação. A autora observou haver um retardo no processo de reparação tecidual em ambos os grupos irradiados, sendo esse retardo mais evidente

quando a irradiação ocorreu mais tardiamente. Entretanto a radiação de elétrons não impediu o processo de reparação tecidual.

PEREIRA FILHO *et al*, em 1998, avaliaram histologicamente, o efeito de raios  $\beta$  provenientes do estrôncio-90 na reparação cutânea. Foram realizadas incisões em ratos e 24 horas após os animais foram expostos a 250 cGy. Os animais receberam a mesma dose a cada 48 horas de acordo com os períodos estudados que foi 3, 7, 14 e 21 dias pós-cirúrgicos. Os autores verificaram um aumento no número de leucócitos e redução no número de fibroblastos, entretanto, a quantidade de fibras colágenas não foi alterada.

O efeito de 1 Gy de radiação de elétrons produzidos por feixe de 6 MeV no processo de reparo de feridas em ratos, só que aplicado somente na base da ferida, foi estudado por MONTEIRO, em 1999. Os animais foram irradiados imediatamente e 3 dias após a cirurgia. Foi observado também um retardo no processo de reparo mas a radiação de elétrons não impediu a reparação total.

## **2.2- Vitamina E e Radiação Ionizante**

Radioprotetores são substâncias que tem como propriedade diminuir os efeitos deletérios decorrentes da interação de radiações ionizantes com os tecidos vivos. A vitamina E corresponde a uma substância pouco estudada como radioprotetora, principalmente na reparação tecidual.

A vitamina E é encontrado em vários óleos vegetais, cereais e ovos. É solúvel em óleos fixados, álcoois e acetona e insolúvel em água. Uma unidade internacional (U.I.) equivale à atividade de 1 mg de acetato de dl-alfa-tocoferil, no qual tem a potência de 1.36 UI/mg (**REYNOLDS-1989**).

Esta vitamina foi demonstrada pela primeira vez por **EVANS & BISHOP (MARCUS E COULSTON-1996)** em 1922, quando verificaram que ratas fêmeas necessitavam de um princípio dietético então desconhecido para manter a gravidez normal. Observaram que os animais com essa deficiência ovulavam e concebiam normalmente, porém, em algum momento da gestação ocorria a morte e reabsorção dos fetos. Lesões nos testículos também foram observadas. Diante desses fatos a vitamina E foi denominada como “vitamina anti-esterelidade”.

**LONDER & MYERS**, em 1952, avaliaram o efeito radioprotetor da vitamina E, avaliando a capacidade desta vitamina em diminuir os radicais livres, em ratos submetidos a uma dose letal de radiação X corpo todo. Os animais foram divididos em 4 grupos experimentais: No primeiro grupo, foi administrado uma dose de 30 U.I. de alfa-tocoferol, intraperitonealmente um dia antes da irradiação; no segundo grupo, os animais receberam 60 U.I.; o terceiro grupo 90 U.I.; e o quarto grupo correspondia ao grupo controle, no qual os animais receberam uma dose de solução salina, intraperitonealmente, um dia antes da irradiação. O aparelho de raios X operou com 200 kVp, 15 mA, com dose de 132 rad por minuto. Os autores observaram que todos os animais do grupo controle morreram com dose total de 650 rad. Os animais que receberam um pré tratamento de

vitamina E, principalmente os que receberam 30 U.I., prolongaram sua sobrevivência, mas não a sobrevivência global. Os autores verificaram também que no grupo de animais que recebeu uma dose total de 550 rad, houve uma maior sobrevivência, 85% nos animais do grupo 1, 60% nos animais do grupo 2 e 50% nos animais do grupo 3, enquanto que apenas 25 % dos animais do grupo controle sobreviveram.

A influência da deficiência de vitamina E na progressiva alteração da fragilidade dos eritrócitos em ratos submetidos a irradiação X corpo todo, com dose de 500 rad, foi avaliada por **HOFFER & ROY**, em 1975. Um grupo de 24 ratos foi mantido com uma dieta pobre em vitamina E durante 43 dias; outro grupo de 24 animais com dieta normal. Após esse período de tempo, os animais receberam 500 rad de radiação X, com dose de 25 rad/minuto. Após a irradiação, os animais continuaram a receber suas respectivas dietas. Os animais foram sacrificados em vários tempos, sendo coletado o sangue. Um teste de hemólise espontânea foi utilizado para avaliar a fragilidade dos eritrócitos. Os animais que receberam dieta deficiente de vitamina E tiveram seus eritrócitos mais frágeis que os animais do grupo controle.

**MALICK *et al***, no ano de 1978, estudaram o efeito radioprotetor da vitamina E na sobrevivência de ratos irradiados com 800 rad de radiação gama do Cobalto - 60. Os animais foram divididos em 8 grupos, durante 30 dias, variando a concentração de vitamina E na dieta pré e pós-irradiação (30 a 60 U.I. de dl – alfa – tocoferil) e/ou no tratamento pela injeção intra-peritoneal de vitamina E (60 U.I.

de dl – alfa – tocoferil), imediatamente após a irradiação. Não houve diferença significativa entre os animais que tiveram dietas ricas em vitamina E antes da irradiação e que foram mantidos com a mesma dieta e os animais que tiveram dietas deficientes em vitamina E antes e depois da irradiação. Nos grupos que se submeteram às injeções intra-peritoneais imediatamente após a irradiação foi observada queda de mortalidade, tanto nos ratos mantidos com dieta rica, como naqueles cuja dieta foi deficiente em vitamina E. Segundo os autores o decréscimo na mortalidade devido as injeções de vitamina E pode estar associado com o aumento da resposta imune ou com o aumento da recuperação da medula óssea.

Em 1979, **KONINGS & DRIJVER**, estudaram o efeito da radiação em membranas lipídicas de ratos com deficiência de vitamina E. Para tanto, foram utilizados 2 grupos de animais: no primeiro grupo, os animais receberam alimentação normal; no segundo grupo, os animais receberam uma alimentação com deficiência de vitamina E. A irradiação X foi de corpo todo com dose de 1 Gy por minuto. Os autores observaram que os animais com deficiência de vitamina E mostraram-se mais sensíveis à irradiação, apresentando suas membranas celulares mais vulneráveis à peroxidação lipídica.

**ROSTOCK *et al.***, em 1980, avaliaram o efeito radioprotetor de altas doses de vitamina E. Para esse estudo foram utilizados 60 ratos, divididos em seis grupos, sendo que cada grupo recebeu radiação gama do Cobalto - 60 com doses de 0, 1500 rad, e 2000 rad. Trinta animais receberam 2,5% de vitamina E na dieta

durante duas semanas antes da irradiação e uma dose única de 150 mg de vitamina E foi administrada em cada animal, intraperitonealmente, 4 horas antes da irradiação. Foram comparadas as curvas histológicas dos pulmões e dos corações dos animais por 180 dias. Os autores observaram não haver diferença significativa entre os animais dos grupos que utilizaram a vitamina E no pré-tratamento e os animais dos grupos controles.

Também em 1980, **KONINGS & OOSTERLOO**, compararam os efeitos da radiação X com os produzidos pelo ozônio na peroxidação lipídica e avaliaram a relação dos anti-oxidantes presentes no processo. Para tanto, submeteram ratos a doses de radiação que variavam de 30 à 60 Gy, sendo aplicadas de 1Gy a cada minuto; ou expuseram os ratos a uma mistura de ozônio e ar com 0,9 PPM de O<sub>3</sub> durante 17 horas. Os autores constataram que a radiação de ozônio foi mais danosa em relação à peroxidação lipídica e que os anti-oxidantes diminuíram significativamente este processo.

**SARRIA & PRASAD**, em 1984, observaram o efeito do succinato de dl- $\alpha$ -tocoferil (5  $\mu$ g/ml) dissolvido em etanol (concentração de 0.25% ), em cultura de neuroblastomas e fibroblastos de ratos, utilizando a radiação gama do Cobalto-60, com dose de 400 rad. Os resultados obtidos mostraram que o succinato de dl- $\alpha$ -tocoferil inibiu o efeito da radiação gama no crescimento da cultura de neuroblastomas, mensurado pela morte e inibição de divisão celular, mas não produziu modificações significativas no efeito da radiação gama na cultura dos fibroblastos de ratos. Nesse trabalho, os autores sugerem que a ação da vitamina

E em modificar os efeitos da radiação em células tumorais talvez seja mediada, em parte, por um mecanismo anti-oxidante.

Em 1985, **SHIRAISHI *et al.***, estudaram a peroxidação de lipídios induzida pela radiação X, na membrana de células de ratos, e também os inibidores desse processo. As substâncias estudadas foram a cefarantine e a alfa-tocoferol. Os autores observaram que a vitamina E inibiu fortemente a peroxidação de lipídios nas membranas das células pela irradiação. Já a cefarantine exibiu uma fraca inibição.

**TAREN *et al.***, em 1986, avaliaram a administração profilática da vitamina E na cicatrização de feridas expostas à radiação ionizante pré-operatória. Os autores utilizaram 36 ratos, divididos em seis grupos (A, B, C, D, E e F). Foi utilizado o acetato de dl- $\alpha$ -tocoferil, dissolvido em óleo sesame injetado intraperitonealmente. Os animais dos grupos A e E sofreram irradiação pré-operatória, sendo que o grupo A não recebeu nenhuma substância, e grupo B recebeu injeções de 0,2 ml de óleo. Os ratos pertencentes aos grupos C, D e E receberam injeções de 10, 20 e 40 UI de vitamina E, em 3 doses iguais, em dias alternados, dissolvidos em 0.2 ml de óleo sesame. O grupo F correspondeu ao grupo controle, não irradiado. No sétimo dia, os ratos dos grupos A, B, C, D, e E receberam 600 rad utilizando um feixe de elétrons de 6 MeV, na linha média do dorso dos animais, sendo que a área irradiada mediu 12,5 cm por 1,0 cm, sendo o restante do corpo do animal protegido. Duas horas após esse procedimento, foram realizadas duas incisões de 5,0 cm, com 2,0 cm entre si. Os ratos foram

sacrificados após quatorze dias. A radiação reduziu significativamente a resistência à tensão das feridas, entretanto não houve relação significativa entre o ganho na resistência à tensão e a dose de vitamina E nas feridas que receberam irradiação pré-operatória. Os autores, diante disso, administraram em um novo grupo de ratos, 120 UI de vitamina E em 0,2 ml de óleo sesame e obtiveram como resultado um aumento de 95% da resistência média à tensão das feridas do controle não irradiado, sugerindo então, que a vitamina E reduz os efeitos deletérios da radiação.

Em 1993, **RANA et al.** administraram vitamina E (90 U.I.) em filhotes de galinha antes da irradiação gama do Cobalto - 60, com dose sub-letal de 2.25 Gy. Os resultados desse trabalho mostraram que a vitamina E ajuda na recuperação das injúrias causadas pela irradiação, no timo desses filhotes.

No mesmo ano, **EL-NAHAS et al.**, analisaram o efeito radioprotetor das vitaminas C e E em ratos. Os animais foram tratados, por via oral, com solução aquosa de vitamina C ou solução de vitamina E dissolvida em óleo de oliva, ambas em duas concentrações, 100 e 300 mg/Kg/dia, por 6 meses. Os animais do grupo controle foram tratados com água ou óleo de oliva. Metade dos animais foram irradiados corpo todo com dose de 400 rad por 13 segundos, 6 horas antes do sacrifício dos animais. As células da medula óssea foram aspiradas pela técnica citogênica, podendo, assim, registrar as aberrações cromossômicas e a atividade mitótica. Ambas as vitaminas mostraram-se não

mutagênicas. A vitamina C mostrou-se efetiva na radioproteção mas a vitamina E não e suprimiu a radioproteção produzida pelo óleo de oliva.

Em 1994, **SIMON et al.**, correlacionaram o efeito radioprotetor da vitamina E na radiação por laser de argônio e cobre em feridas em pele de porcos. Os animais foram divididos em três grupos: o controle, o tratamento tópico de vitamina E, sendo 18 horas antes da irradiação e o tratamento intramuscular de vitamina E, com dose de 5 mg/kg em 3 injeções dadas 24, 12, e 2 horas antes da irradiação. O tempo de cicatrização da ferida foi estatisticamente menor nos animais que receberam o tratamento prévio de vitamina E, principalmente naqueles que a receberam por via intramuscular.

**CARROLL et al.**, em 1995, verificaram alguns agentes radioprotetores na prevenção de injúrias provocadas por radiação gama no intestino de ratos. Foram utilizados 72 ratos, em 8 grupos: o grupo controle sem irradiação; o grupo controle irradiado, com dose de 40 Gy na região de abdômen; e seis grupos, que além da irradiação, receberam tratamentos de agentes radioprotetores: ribose-cisteína, WR-2721, glutamina, vitamina E, MgCl<sub>2</sub>/adenosina trifosfato, e a combinação da ribose-cisteína e glutamina. Após duas semanas da irradiação, os ratos sofreram uma ressecção do intestino e posteriormente realizaram-se anastomoses. Após uma semana, avaliaram-se as anastomoses e determinou-se a força necessária para o rompimento das mesmas. Os animais do grupo controle não irradiado tiveram as forças de rompimentos das

anastomoses maior, quando comparadas com as dos animais dos demais grupos. As anastomoses dos grupos tratados com ribose-cisteína, WR-2721, ribose-cisteína combinada com glutamina e vitamina E mostraram uma maior resistência à força nas anastomoses realizadas nos intestinos delgados.

Ainda em 1995, **FELEMOVICIUS *et al.***, estudaram a radioproteção da vitamina E em intestino grosso de ratos. Foi realizado a exteriorização dos intestinos e os segmentaram em 4 camadas, sendo que cada compartimento foi preenchido com soluções teste, 30 minutos antes da irradiação: solução salina, óleo de soja, fosfato de tocoferol (solubilizado em solução salina) e acetato de dl-alfa-tocoferil (solubilizado em óleo de soja). Os animais foram irradiados com radiação X com dose de 1100 cGy, Os animais foram sacrificados após 5 dias. os 4 segmentos foram analisados quanto a sobrevivência das criptas intestinais, altura da mucosa e a preservação das células globulares. Os autores observaram que nas três avaliações, a vitamina E, nas duas formas, promoveu uma proteção significativa nos intestinos desses animais. Os autores também administraram em outro grupo de animais uma dieta rica em vitamina E 10 dias antes da irradiação e resultados semelhantes foram observados.

**MARCUS E COULSTON**, em 1996, afirmaram que uma das mais importantes características químicas dos tocoferóis 'e de que eles são anti-oxidantes, impedindo a oxidação de constituintes essenciais, como a ubiquinona (coenzima Q). Outra característica apresentada pela vitamina E é impedir a formação de produtos tóxicos da oxidação, como os produtos de peroxidação

formados a partir de ácidos graxos insaturados. Os autores afirmaram também que um suplemento de vitamina E proporciona proteção contra diversas drogas, metais e substâncias químicas que podem iniciar a formação de radicais livres.

**GALLIGAN *et al.***, em 1997, investigaram o efeito radioprotetor de antioxidantes em linfócitos isolados. Nesse trabalho foram administrados intraperitonealmente 5 doses de vitamina C (300mg/Kg), vitamina E (400mg/Kg) ou  $\beta$ -caroteno (100mg/Kg). Após 24 horas foi removido o sangue dos animais por punção cardíaca e os linfócitos foram isolados. Essas células, então, foram irradiadas por raios X com doses de 0 a 5 Gy, utilizando 300 kVp. A avaliação foi feita pela mensuração das quebras do DNA. Os autores observaram que todos os antioxidantes aumentaram significativamente a proteção dos linfócitos irradiados “in vivo”, sendo que a vitamina C protegeu em todas as doses da irradiação utilizadas e a vitamina E e o  $\beta$ -caroteno para as doses de 3 a 5 Gy. Porém em se tratando de dietas desses antioxidantes, a vitamina C e E foram os antioxidantes mais efetivos contra injúrias no DNA induzidas por baixas doses de radiação.

**KONOPACKA *et al.***, em 1998, avaliaram o efeito radioprotetor da vitamina C, E e  $\beta$ -caroteno em injúrias do DNA em células de ratos. Essas injúrias foram mensuradas pelo teste micronuclear nos eritrócitos da medula óssea e nas células esfoliadas da bexiga em ratos. As vitaminas foram administradas por via oral, 5 dias consecutivos antes ou imediatamente depois da irradiação em várias concentrações: Vitamina C (ácido ascórbico) – 10, 50, 100, 200 e 400 mg/Kg/dia; Vitamina E (alfa-tocoferol) – 50, 100 e 200 mg/Kg/dia;  $\beta$ -caroteno – 3, 6 e 12

mg/Kg/dia. Nos animais do grupo controle foi administrada a mesma quantidade dos solventes: água, solvente da vitamina C e óleo, solvente da vitamina E e solvente do  $\beta$ -caroteno. A irradiação utilizada foi a gama, pelo Cobalto - 60, com dose de 2 Gy. Os autores observaram que o pré tratamento de vitamina E foi efetivo na proteção contra a irradiação, observando diminuição das injúrias no DNA em todas as doses, mas as diferenças significantes com o controle ocorreram nas concentrações 100-200 mg/Kg/dia de alfa-tocoferol. No pré tratamento de  $\beta$ -caroteno a dose efetiva significativa foi a de 12 mg/Kg/dia. A vitamina C mostrou-se efetiva em altas concentrações (400mg/Kg/dia), porém pouco visível. Os autores também fizeram uma associação entre vitamina C (50 mg/Kg/dia), vitamina E (200 mg/Kg/dia) e  $\beta$ -caroteno (12 mg/Kg/dia) e observaram maior efeito radioprotetor, concluindo que a associação entre vitamina C, vitamina E e  $\beta$ -caroteno pode ser realizada não somente para remover os radicais livres, mas também para aumentar a capacidade de reparo do DNA.

### **3- PROPOSIÇÃO**

Uma vez que o efeito da Vitamina E no processo de reparação tecidual de animais irradiados corpo total não foi verificado na literatura ao alcance e considerando-se a importância de pesquisar-se substâncias que minimizem os efeitos deletérios de radiações ionizantes, a presente pesquisa propõe-se a:

- **Comparar morfológica e ultra-estruturalmente, o efeito da Vitamina E no processo de reparação tecidual, em animais irradiados e não irradiados corpo total por radiação de elétrons.**

## **4- Materiais e Métodos**

### **4.1- Materiais**

- **Amostra**

Foram utilizados 60 ratos machos (*Rattus Norvegicus*, *Albinos*, *Wistar*), com idade de 60 dias e peso variando entre 200 a 250 gramas. Todos os animais foram procedentes do Biotério Central da UNICAMP. Desde a fase pré-operatória até o sacrifício, teve-se o cuidado de manter esses animais alimentados com ração balanceada e água *ad libitum*, sendo os mesmos monitorados diariamente.

- **Fases experimentais**

O experimento constitui-se das seguintes fases:

- ◆ Fase Terapêutica

⇒ solução injetável de acetato de Vitamina E (dl-alfa-tocoferil);

⇒ óleo de oliva

⇒ seringas hipodérmicas com agulhas intradérmicas

- ◆ Fase de Anestesia

⇒ solução anestésica de pentabarbital de sódio – Hypinol a 3% do Laboratório

Fantover, divisão Cristália

⇒ seringas hipodérmicas com agulhas intradérmicas

- ◆ Fase Cirúrgica

⇒ mesa cirúrgica ( tesoura reta, de ponta fina, pinça reta, pinça dente de rato, cabo de bisturi, lâminas de bisturi nº 11 e gazes esterilizadas

⇒ gabarito de plástico

- ◆ Fase de Irradiação

⇒ acelerador linear, modelo Mevatron 74, da Siemens

◆ Fase de Obtenção das peças

- ⇒ éter etílico P. A .
- ⇒ solução de cloreto de sódio
- ⇒ papel filtro
- ⇒ recipientes de vidro para armazenamento das peças
- ⇒ fixador de Lillie
- ⇒ campânula

◆ Fase de Preparação da Lâminas

- ⇒ álcool 70%
- ⇒ álcool absoluto
- ⇒ Xilol
- ⇒ Paraplasty Plus para inclusão
- ⇒ micrótomo
- ⇒ estufa
- ⇒ hematoxilina – eosina
- ⇒ azul de toluidina pH 4

## 4.2- Métodos

◆ Divisão de grupos:

Inicialmente, os animais foram divididos, aleatoriamente, em 5 grupos experimentais: **grupo controle**, **grupo irradiado**, **grupo vitamina E**, **grupo óleo**

**de oliva e grupo irradiado/vitamina E.** Cada grupo foi dividido em quatro subgrupos, com 3 animais cada, para cada dia de estudo, os quais foram identificados previamente com uma marca código. Os procedimentos realizados em cada grupo constou do seguinte:

- **Grupo Controle:** os animais pertencentes a este grupo sofreram somente o procedimento cirúrgico, não sendo administrada nenhuma substância e também não sofreram irradiação, portanto representava o grupo que serviu de parâmetro, no que diz respeito a um processo de reparação tecidual normal, sem qualquer fator adicional, seja no sentido de acelerar ou retardar o processo.
- **Grupo Irradiado:** este grupo foi caracterizado por sofrer irradiação corpo total, 3 dias após a produção da ferida, não sendo administrada nenhuma substância.
- **Grupo Vitamina E:** grupo constituído por animais que receberam vitamina E, dissolvida em óleo de oliva, 48 horas antes da produção da ferida.
- **Grupo Óleo de Oliva:** os animais pertencentes à este grupo receberam somente óleo de oliva.

- **Grupo Irradiado/Vitamina E:** este grupo foi caracterizado por animais que receberam injeção de vitamina E 48 horas anterior ao ferimento, sendo irradiados 3 dias após a produção da ferida.

Para todos os grupos, o tempo transcorrido entre a produção da ferida e o sacrifício dos animais para a obtenção das peças foi de 4, 7, 14 e 21 dias.

- ◆ **Fase Terapêutica:**

Esta fase constitui-se da administração de 1,0 ml, intraperitonealmente, de óleo de oliva no grupo de animais que recebeu somente esta substância 48 horas anterior a produção da ferida. Nos grupos de animais que receberam a Vitamina E, foram injetadas intraperitonealmente, 180 U.I. desta substância diluídas em 1,0 ml de óleo de oliva, também 48 horas antes de sofrerem o procedimento cirúrgico.

- ◆ **Anestesia:**

Todos os animais durante os procedimentos de produção da ferida e no momento de ser retirada a amostra tecidual que constituía-se do material para análise, foram anestesiados com injeções intra-peritoneais de pentobarbital de sódio, com dose de 40 mg/Kg de peso corpóreo.

- ◆ **Fase Cirúrgica:** esta fase foi caracterizada pela realização da cirurgia que consistiu da produção de uma ferida com dimensões de 2,5 x 1,5 cm, realizada na região dorsal anterior. Teve-se o cuidado de realizar a ferida sempre na mesma região e utilizando-se o gabarito de plástico citado anteriormente. Desta forma,

local e dimensão da ferida foram padronizados em todos os animais. Para a produção da ferida, as duas incisões maiores foram realizadas paralelamente à coluna vertebral. A profundidade da ferida correspondeu a 0,2 cm observando-se, após a excisão, o tecido muscular como base da ferida, derme e epiderme marginalmente (Figura 1). Este procedimento foi realizado em todos os animais de todos os grupos estudados.

◆ Fase de Irradiação:

Os animais que pertenciam aos grupos irradiados, foram introduzidos em caixas de acrílico, e desta forma, não necessitaram sofrer anestesia durante o procedimento de irradiação. Foram irradiados 3 animais por vez, sendo o feixe de radiação totalmente colimado para abranger a área onde se encontravam os animais. Utilizou-se uma dose de 6 Gy, com um feixe de elétrons cuja energia era de 6 MeV. A distância fonte-alvo foi de 100 cm e a dose manteve-se com igual intensidade até 1,0 cm de profundidade.

◆ Fase de obtenção das peças:

Após o tempo estabelecido para cada um dos grupos, os animais foram novamente anestesiados e então foram retiradas as peças para a confecção das lâminas para microscopia. A peça consistia de uma amostra, contendo uma porção de tecido normal circundando a ferida ou a cicatriz, dependendo do estágio

de reparação tecidual. Imediatamente após a remoção estas foram lavadas com solução fisiológica, secas em papel absorvente e imersas em solução fixadora de Lillie até que se realizasse a inclusão em parafina. Estas peças obrigatoriamente permaneceram neste fixador por 72 horas, no mínimo. Após esse período foram incluídas em Paraplasty Plus e em seguida levadas ao micrótomo para obtenção dos cortes histológicos de 7µm de espessura. As lâminas foram então preparadas com as seguintes colorações:

- **Coloração por Hematoxilina – Eosina (HE):** esta coloração teve como finalidade avaliar morfologicamente o processo de reparação tecidual dos grupos em estudo.
- **Reação Histoquímica pelo Azul de Toluidina:** pH 4, em concentração de 0,025%: esta técnica foi realizada segundo **LISON** (1960) e permitiu avaliar a reação entre as moléculas de glicosaminoglicanas (GAGs) e o azul de toluidina, através do Dicroísmo Linear, cuja finalidade é observar a orientação macromolecular das fibras colágenas.

Todas as lâminas foram analisadas no fotomicroscópio “Zeiss – Pol 01”.

## **5- Resultados**

Serão descritos a seguir os resultados obtidos para cada grupo estudado de acordo com a observação realizada microscopicamente. A ordem de descrição será feita de acordo com os períodos de evolução tecidual, iniciando-se com o método de coloração por hematoxilina-eosina, em seguida será avaliado o dicroísmo linear.

## **Descrição Histo-Morfológica - Coloração por Hematoxilina - Eosina**

### **4º dia de Reparação Tecidual**

#### **Grupo Controle**

A análise microscópica mostra que a área da ferida apresenta-se bastante ampla, com infiltrado de células inflamatórias, caracterizando o estágio inicial do processo de reparação. Todo este material encontra-se recoberto por uma crosta de material necrótico cuja função é proteger o tecido em desenvolvimento. (FIG. 1 e 1a).

#### **Grupo Vitamina E**

Neste grupo observa-se que a área da ferida também apresenta-se ampla, com a presença de um rico infiltrado de células inflamatórias. Há a presença da crosta de material necrótico, recobrindo o tecido em formação. (FIG. 2 e 2a )

#### **Grupo Irradiado**

A crosta de material necrótico encontra-se bastante espessa, recobrindo um tecido inflamado, entretanto a quantidade de células inflamatórias encontra-se reduzida. O tecido subjacente encontra-se totalmente desorganizado. A área

correspondente à ferida é bastante ampla, não havendo, portanto, sinais de retração do tecido. (FIG. 3 e 3a)

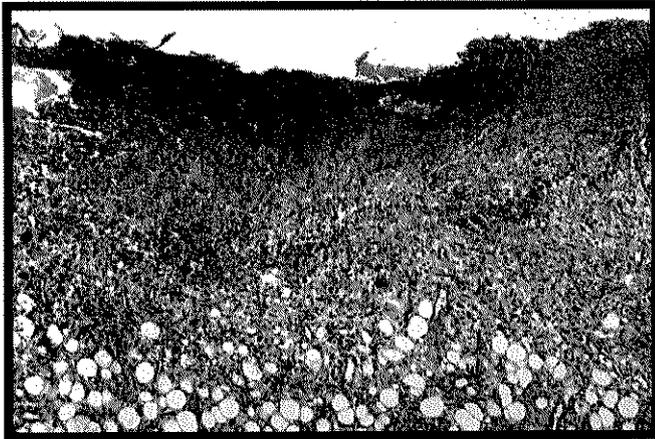
### **Grupo Vitamina E / Radiação**

Observa-se uma área de ferida ampla, com um infiltrado de células inflamatórias, característico desta fase inicial do processo de reparação tecidual. Observa-se também a presença da crosta necrótica. (FIG. 4 e 4a )

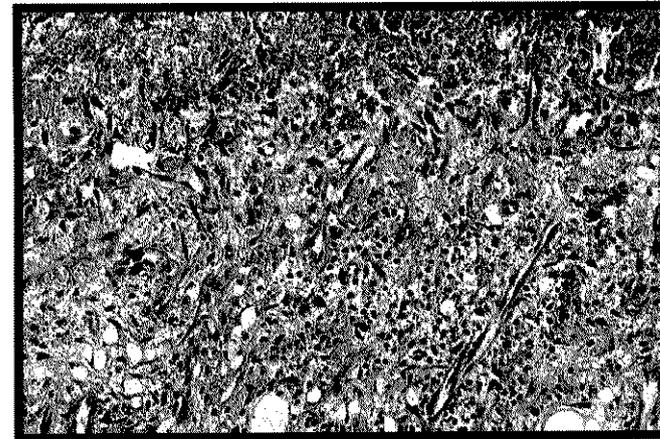
### **Grupo Óleo de Oliva**

A área da ferida apresenta-se bastante ampla, apresentando intenso infiltrado de células inflamatórias, caracterizando o estágio inicial do processo de reparação. Observa-se também a presença de uma crosta de material necrótico. (FIG. 5 e 5a)

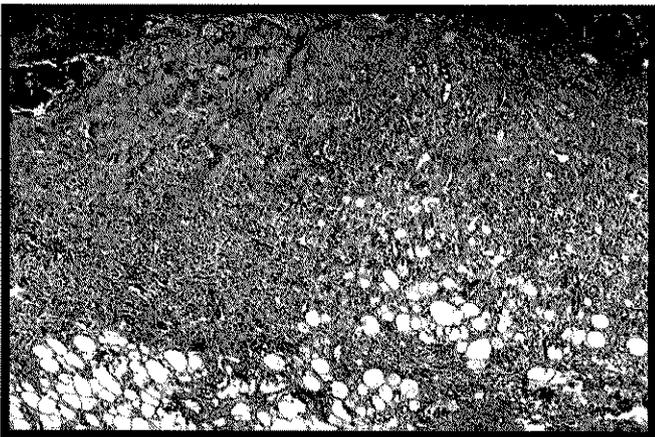
**Prancha 1**  
**Coloração por Hematoxilina-Eosina - 4º Dia**



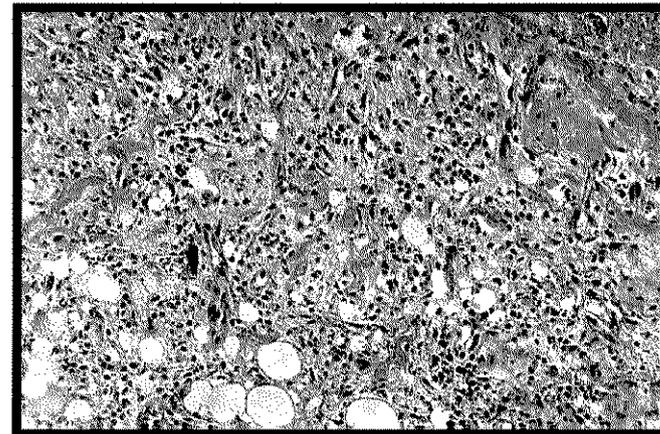
**FIGURA 1-** Grupo Controle  
Aumento original 6.3 x 1.25 x 10



**FIGURA 1a-** Grupo Controle  
Aumento original 16 x 1.25 x 10

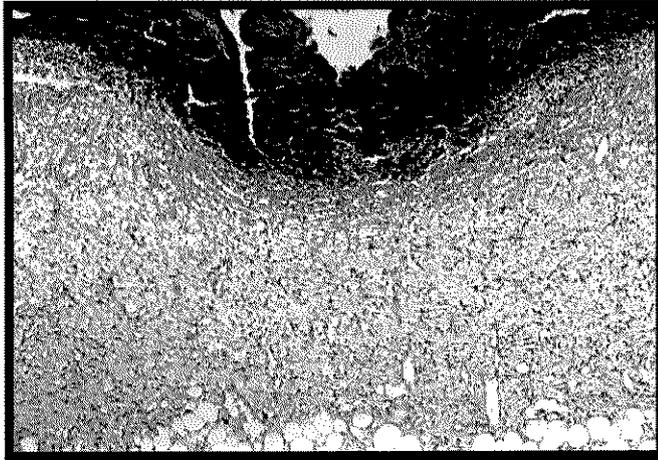


**FIGURA 2-** Grupo Vitamina E  
Aumento original 6.3 x 1.25 x 10

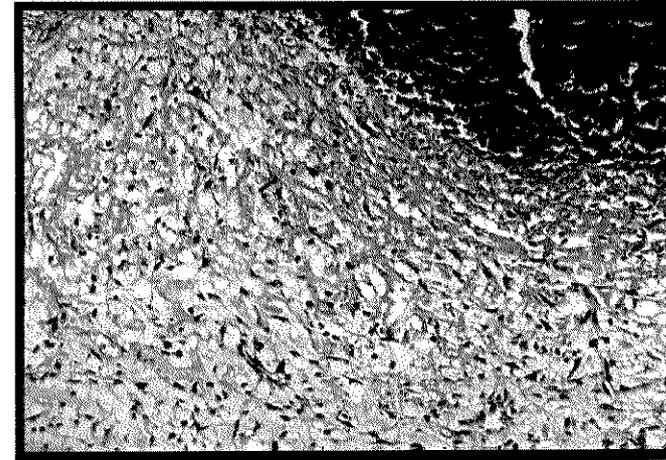


**FIGURA 2a-** Grupo Vitamina E  
Aumento original 16 x 1.25 x 10

**Prancha 2**  
**Coloração por Hematoxilina-Eosina - 4º Dia**



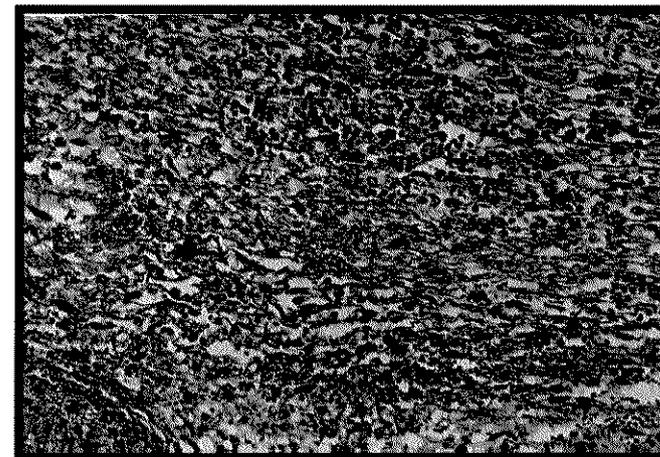
**FIGURA 3-** Grupo Irrradiado  
Aumento original 6.3 x 1.25 x 10



**FIGURA 3a-** Grupo Irrradiado  
Aumento original 16 x 1.25 x 10



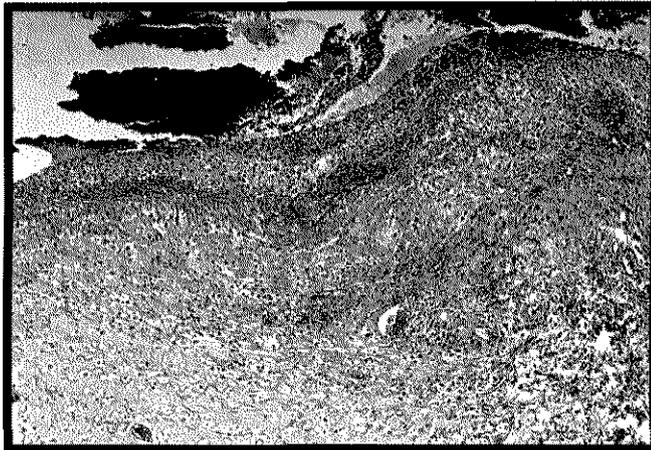
**FIGURA 4-** Grupo Vitamina E/Radiação  
Aumento original 6.3 x 1.25 x 10



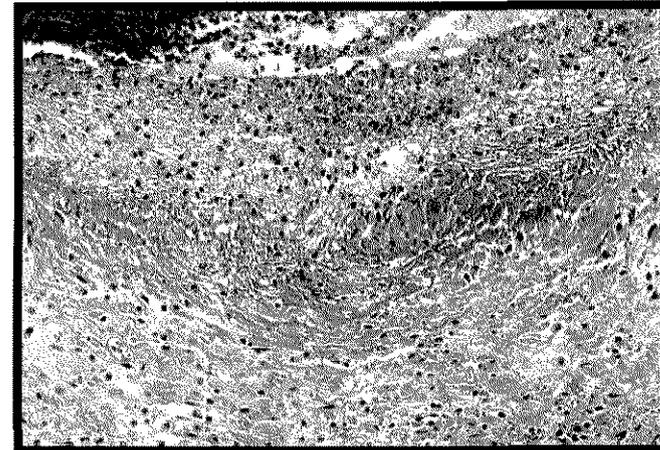
**FIGURA 4a-** Grupo Vitamina E/Radiação  
Aumento original 16 x 1.25 x 10

Prancha 3  
Coloração por Hematoxilina-Eosina - 4º Dia

43



**FIGURA 5-** Grupo G – Ferida+ Óleo Oliva  
Aumento original 6.3 x 1.25 x 10



**FIGURA 5a-** Grupo G – Ferida + Óleo Oliva  
Aumento original 16 x 1.25 x 10

## **Descrição Histo-Morfológica - Coloração por Hematoxilina -**

### **Eosina**

#### **7º dia de Reparação Tecidual**

##### **Grupo Controle**

A área da ferida mantém-se ampla, ainda com a crosta de material necrótico. Entretanto, já é possível observar-se a presença de vasos sangüíneos néo formados, alguns apresentando função. O tecido apresenta características de tecido de granulação. Embora em pequeno número, já observa-se a presença de fibras colágenas. (FIG. 6 e 6a).

##### **Grupo Vitamina E**

Neste grupo observa-se que a área da ferida mostra-se ainda ampla, com a presença da crosta de material necrótico, recobrimdo parcialmente o tecido em formação. Pode-se observar a presença de vasos néo formados e alguns funcionais. Também como o grupo controle, embora o tecido encontre-se bastante celular, observa-se a presença de fibras colágenas. (FIG. 7 e 7a).

### **Grupo Irradiado**

A área correspondente à ferida ainda apresenta-se bastante ampla, observando-se a presença da crosta de material necrótico, recobrimdo a ferida. O tecido não apresenta o aspecto característico de um tecido de granulação normal. (FIG. 8 e 8a).

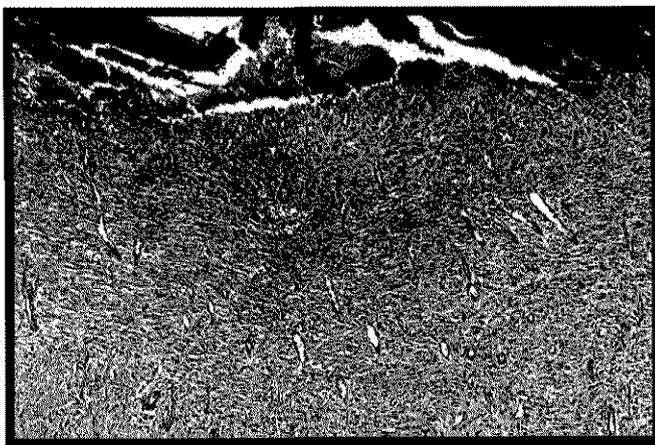
### **Grupo Vitamina E / Radiação**

Observa-se uma área de ferida também ampla, com um infiltrado de células inflamatórias. Observa-se a presença da crosta necrótica, recobrimdo um tecido bastante celular, sendo observada a presença de fibroblastos. (FIG. 9 e 9a).

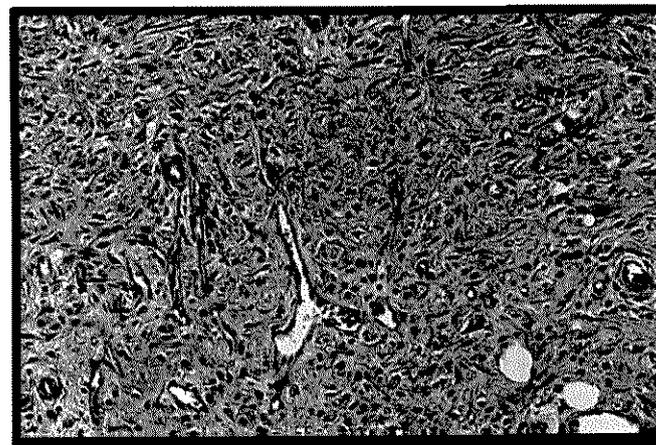
### **Grupo Óleo de Oliva**

A área da ferida apresenta-se bastante ampla, apresentando infiltrado de células inflamatórias, Observa-se ainda a presença de uma crosta de material necrótico. (FIG. 10 e 10a).

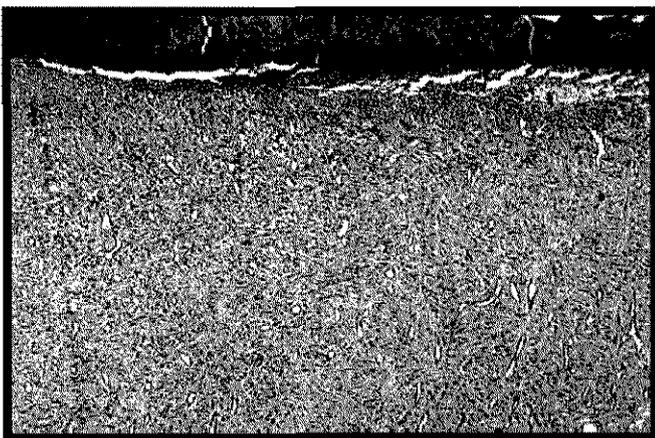
**Prancha 4**  
**Coloração por Hematoxilina-Eosina - 7º Dia**



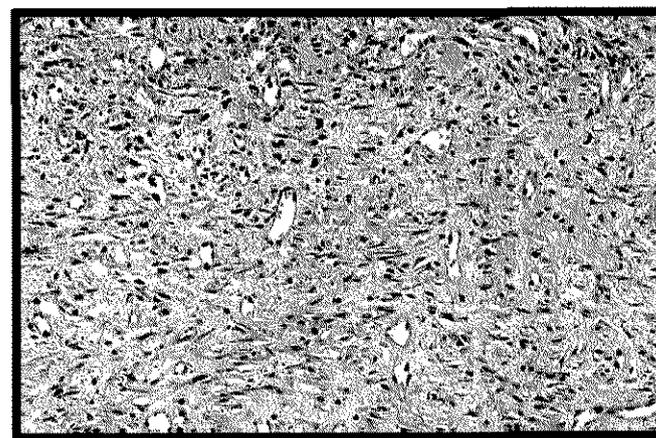
**FIGURA 6-** Grupo Controle  
Aumento original 6.3 x 1.25 x 10



**FIGURA 6a-** Grupo Controle  
Aumento original 16 x 1.25 x 10



**FIGURA 7-** Grupo Vitamina E  
Aumento original 6.3 x 1.25 x 10

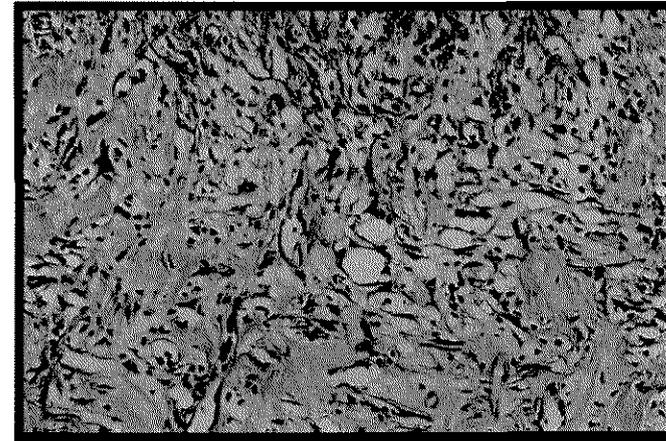


**FIGURA 7a-** Grupo Vitamina E  
Aumento original 16 x 1.25 x 10

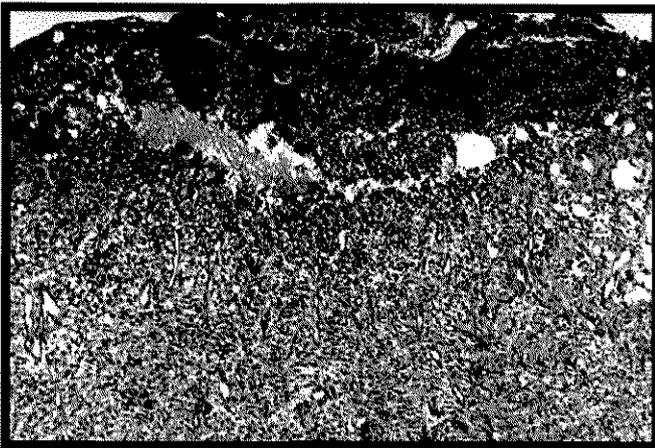
**Prancha 5**  
**Coloração por Hematoxilina-Eosina - 7º Dia**



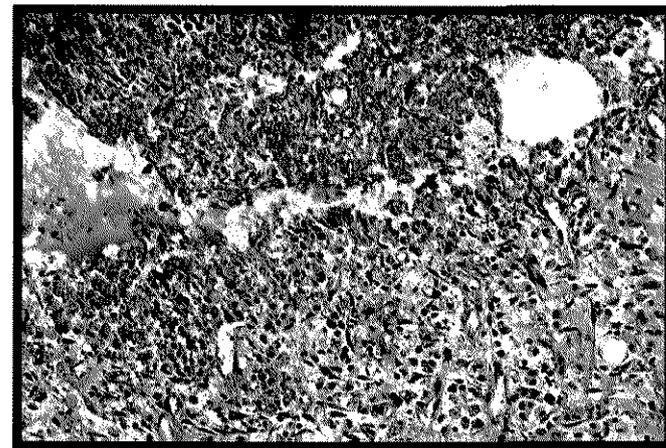
**FIGURA 8-** Grupo Irradiado  
Aumento original 6.3 x 1.25 x 10



**FIGURA 8a-** Grupo Irrradiado  
Aumento original 16 x 1.25 x 10



**FIGURA 9-** Grupo Vitamina E/Radiação  
Aumento original 6.3 x 1.25 x 10



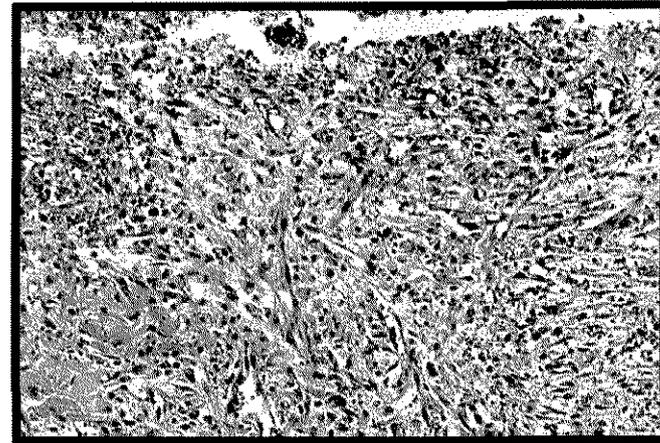
**FIGURA 9a-** Grupo Vitamina E/Radiação  
Aumento original 16 x 1.25 x 10

**Prancha 6**  
**Coloração por Hematoxilina-Eosina - 7º Dia**

48



**FIGURA 10-** Grupo Óleo de Oliva  
Aumento original 6.3 x 1.25 x 10



**FIGURA 10a-** Grupo Óleo de Oliva  
Aumento original 16 x 1.25 x 10

## **Descrição Histo-Morfológica - Coloração por Hematoxilina -**

### **Eosina**

#### **14º dia de Reparação Tecidual**

##### **Grupo Controle**

Aos 14 dias, a ferida apresenta a camada de epitélio queratinizada, espessa e com presença de invaginações. O tecido apresenta-se com pequeno número de vasos sangüíneos, menos celular e a presença de feixes de fibras colágenas. (FIG. 11 e 11a).

##### **Grupo Vitamina E**

Observa-se a presença de epitélio recobrimdo um tecido semelhante ao tecido do grupo controle. Observa-se entretanto, que o tecido apresenta-se menos celular e portanto mais fibroso. (FIG. 12 e 12 a).

##### **Grupo Irradiado**

Este grupo apresenta características marcantes de um tecido de granulação. Observa-se ainda a presença de material necrótico recobrimdo a ferida, grande número de vasos néo formados, alguns em plena função. (FIG. 13 e 13a).

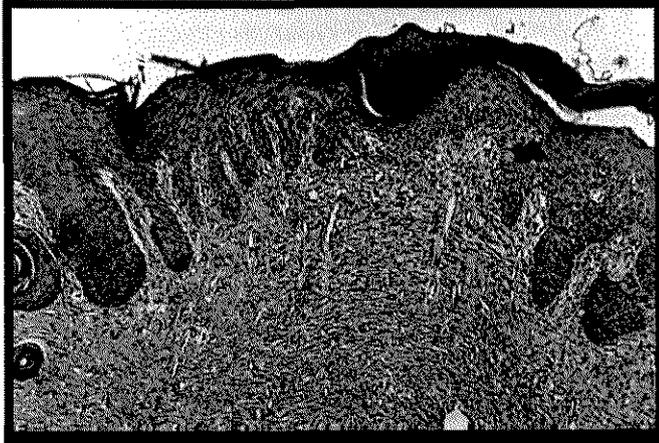
### **Grupo Vitamina E / Radiação**

Embora ainda possa ser observada a presença de parte de material necrótico, o epitélio inicia a sua migração para recobrir um tecido que ainda encontra-se bastante celular. A área da ferida apresenta-se ampla. (FIG.14 e 14a )

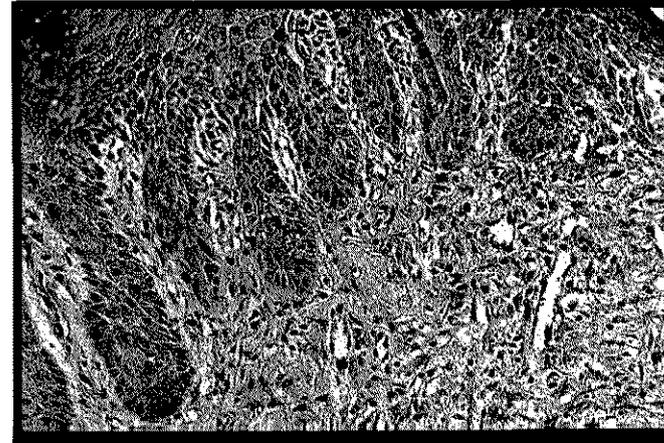
### **Grupo Óleo de Oliva**

Este grupo apresenta um retardo na formação do tecido. Pode-se observar que a porção superior da ferida ainda mostra áreas inflamadas, devido a presença de células inflamatórias. Observa-se também que existe um grande número de vasos sanguíneos, alguns deles apresentando-se funcionais. O epitélio também inicia a migração. (FIG. 15 e 15a).

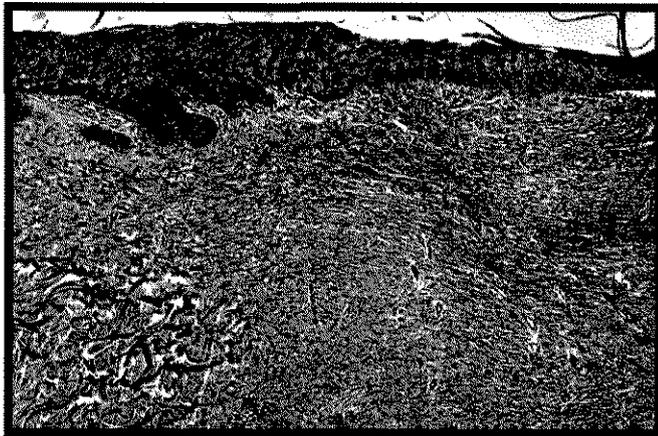
**Prancha 7**  
**Coloração por Hematoxilina-Eosina - 14º Dia**



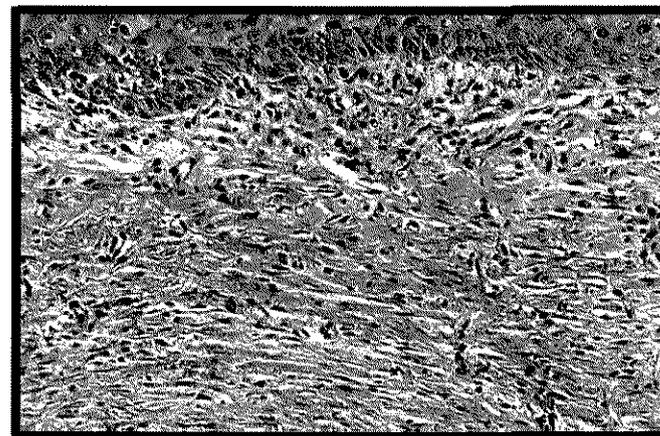
**FIGURA 11-** Grupo Controle  
Aumento original 6.3 x 1.25 x 10



**FIGURA 11a-** Grupo Controle  
Aumento original 16 x 1.25 x 10



**FIGURA 12-** Grupo Vitamina E  
Aumento original 6.3 x 1.25 x 10



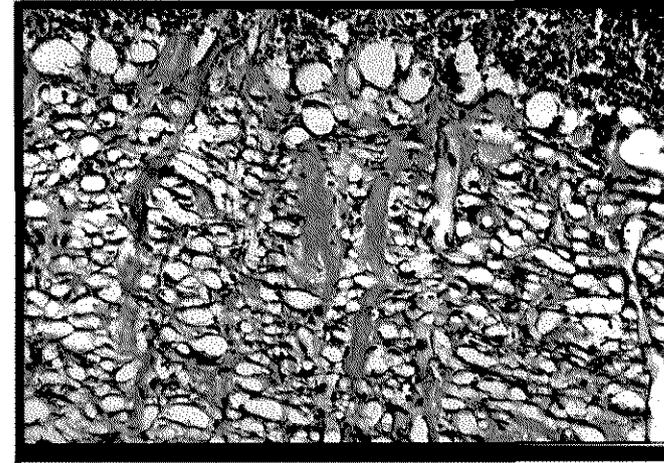
**FIGURA 12a-** Grupo Vitamina E  
Aumento original 16 x 1.25 x 10



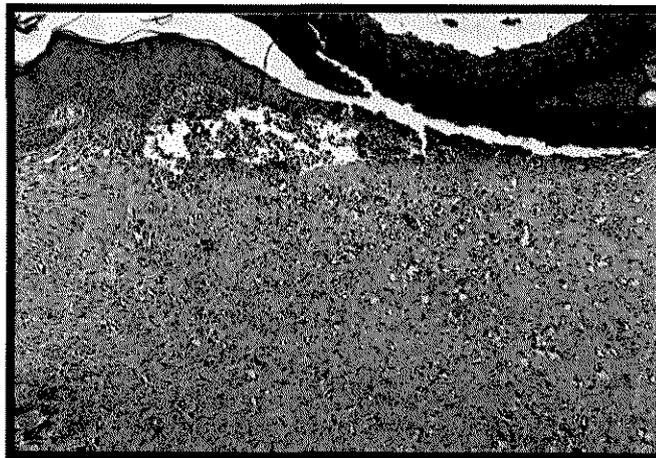
**Prancha 8**  
**Coloração por Hematoxilina-Eosina - 14º Dia**



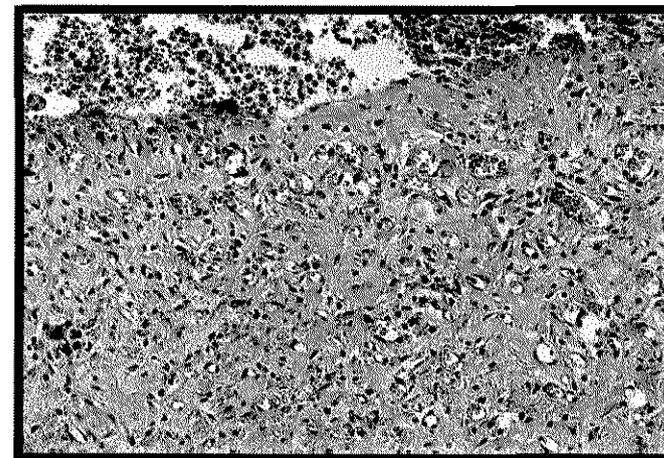
**FIGURA 13-** Grupo Irrradiado  
Aumento original 6.3 x 1.25 x 10



**FIGURA 13a-** Grupo Irrradiado  
Aumento original 16 x 1.25 x 10



**FIGURA 14-** Grupo Vitamina E/Radiação  
Aumento original 6.3 x 1.25 x 10



**FIGURA 14a-** Grupo Vitamina E/Radiação  
Aumento original 16 x 1.25 x 10

**Prancha 9**  
**Coloração por Hematoxilina-Eosina - 14º Dia**

53



**FIGURA 15-** Grupo Óleo de Oliva  
Aumento original 6.3 x 1.25 x 10



**FIGURA 15A-** Grupo Óleo de Oliva  
Aumento original 16 x 1.25 x 10

## **Descrição Histo-Morfológica - Coloração por Hematoxilina -**

### **Eosina**

#### **21º dia de Reparação Tecidual**

##### **Grupo Controle**

A ferida apresenta-se menor, observando-se uma involução do epitélio, que apresenta a mesma espessura do epitélio normal, indicando portanto que o número de vasos sanguíneos apresenta-se reduzido e o tecido encontra-se maduro, embora não totalmente. Anexos da pele também podem ser observados. Os feixes de fibras colágenas já apresentam uma disposição horizontal. (FIG. 16 e 16a).

##### **Grupo Vitamina E**

A área ferida encontra-se bastante reduzida, observando-se a presença de anexos de pele. O epitélio embora reduzido em sua espessura, quando comparado ao epitélio aos 14 dias, ainda apresenta-se mais espesso que o epitélio normal adjacente, observando-se inclusive a presença de invaginações. (FIG. 17 e 17a ).

### **Grupo Irrradiado**

O grupo irradiado apresenta-se com o epitélio, que embora não espesso, recobre um tecido rico em vasos néo formados e em plena função. Observa-se também a presença de grande número de células (fibroblastos). (FIG. 18 e 18a).

### **Grupo Vitamina E / Radiação**

Este grupo apresenta um epitélio, que embora queratinizado, mostra-se ainda espesso, recobrindo um tecido bastante celular. As fibras colágenas já se apresentam organizadas. (FIG. 19 e 19a).

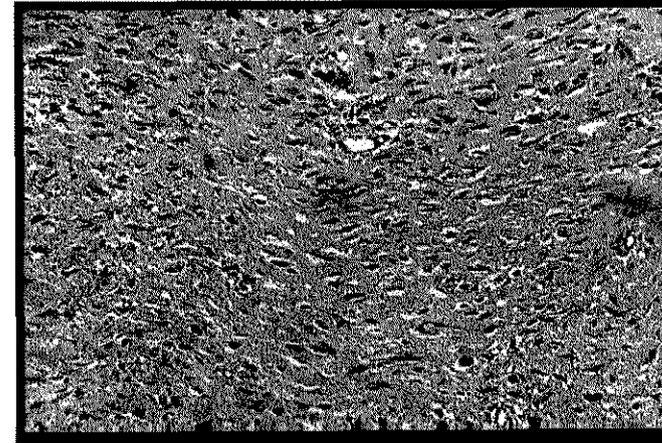
### **Grupo Óleo de Oliva**

A ferida apresenta-se bastante ampla. O epitélio não queratinizado recobre um tecido rico em células. Pode-se observar que o tecido não apresenta-se orientado. (FIG. 20 e 20a ).

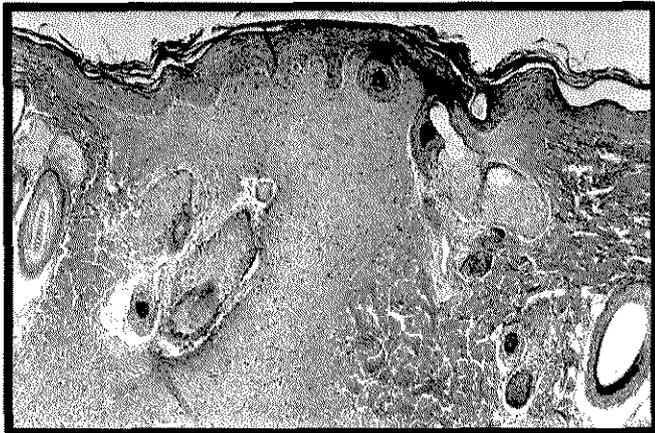
**Prancha 10**  
**Coloração por Hematoxilina-Eosina - 21º Dia**



**FIGURA 16-** Grupo Controle  
Aumento original 6.3 x 1.25 x 10



**FIGURA 16a-** Grupo Controle  
Aumento original 16 x 1.25 x 10

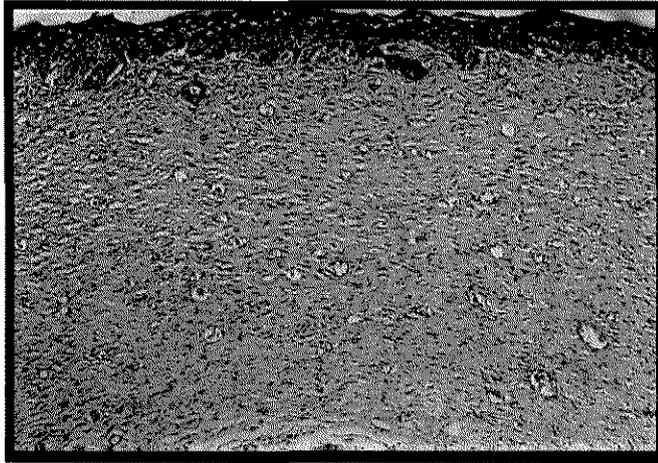


**FIGURA 17-** Grupo B - Ferida + Vit. E  
Aumento original 6.3 x 1.25 x 10

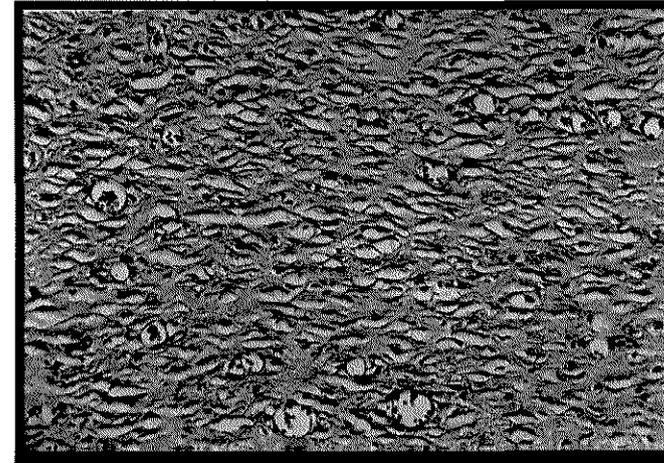


**FIGURA 17a-** Grupo B - Ferida + Vit. E  
Aumento original 16 x 1.25 x 10

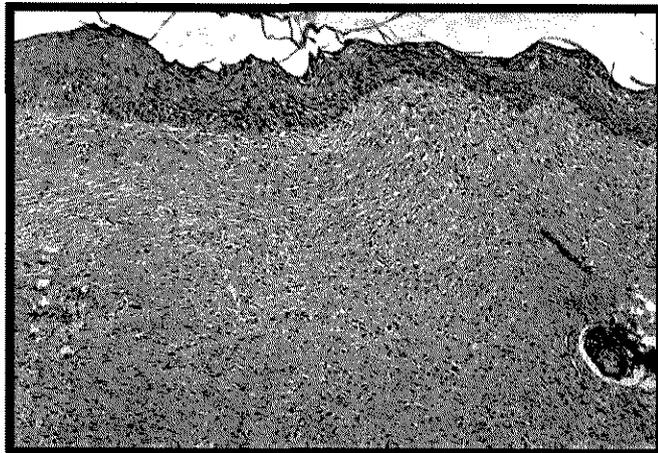
**Prancha 11**  
**Coloração por Hematoxilina-Eosina - 21º Dia**



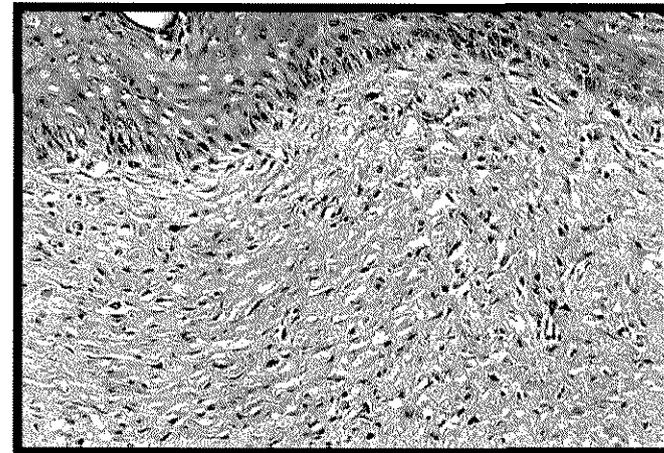
**FIGURA 18-** Grupo Irrradiado  
Aumento original 6.3 x 1.25 x 10



**FIGURA 18a-** Grupo Irrradiado  
Aumento original 16 x 1.25 x 10



**FIGURA 19-** Grupo Vitamina E/Radiação  
Aumento original 6.3 x 1.25 x 10



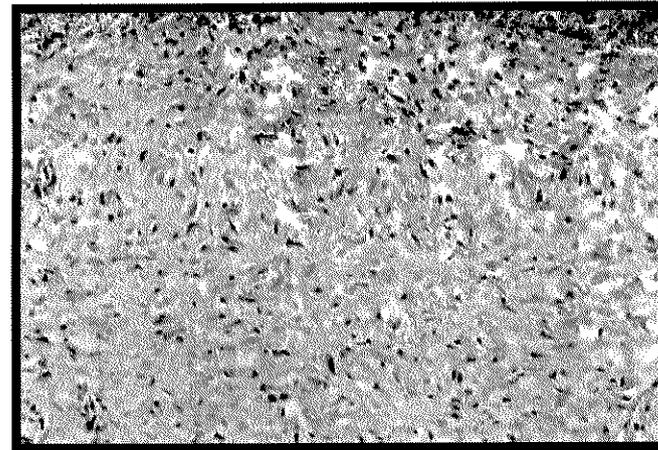
**FIGURA 19a-** Grupo Vitamina E/Radiação  
Aumento original 16 x 1.25 x 10

**Prancha 12**  
**Coloração por Hematoxilina-Eosina - 21º Dia**

58



**FIGURA 20-** Grupo Óleo de Oliva  
Aumento original 6.3 x 1.25 x 10



**FIGURA 20a-** Grupo Óleo de Oliva  
Aumento original 16 x 1.25 x 10

## **Exame do Dicroísmo Linear pelo Azul de Toluidina**

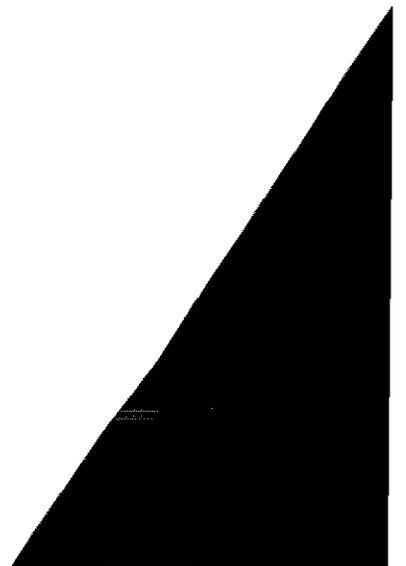
O Dicroísmo corresponde a um método baseado nas teorias de absorção e dispersão luminosa. Corresponde a uma propriedade que certos materiais têm de possuírem diferentes coeficientes de absorção para luz polarizada em diferentes direções, oferecendo colorações diversas na dependência da direção em que são observadas. De uma forma mais simples, pode-se dizer que o dicroísmo é a propriedade que uma determinada substância tem, quando observada ao microscópio de polarização, de exibir duas cores quando corada com um único corante metacromático, geralmente corantes orgânicos como o Vermelho Congo, Tionina ou Azul de Toluidina.

Na presente pesquisa, para a observação do fenômeno do dicroísmo linear nos diferentes grupos, utilizou-se o Azul de Toluidina a 0,025% e pH 4, onde normalmente as moléculas do corante se ligam às macro-moléculas de glicosaminoglicanas produzidas pelos fibroblastos, ligadas orientadamente às macromoléculas de colágeno. É aceito que a estabilidade do colágeno depende da associação entre as moléculas de glicosaminoglicanas e colágeno, sendo essa associação orientada.

Assim, o tecido corado analisado ao microscópio de polarização mostra-se azul ortocromático quando os feixes de fibras colágenas encontram-se paralelas ao plano de polarização da luz. Quando gira-se a platina do microscópio,

colocando-a paralela ao plano de polarização da luz, os feixes de fibras colágenas passam a exibir não mais uma coloração azul e sim rosa metacromática. Portanto, isso só ocorre quando o tecido apresenta organização macromolecular (FIG. 23 e 24). Quando não apresenta esta organização macromolecular, a coloração permanecerá azul ortocromático (FIG.21 e 22).

Dentre os grupos avaliados na presente pesquisa quando analisados por microscopia de polarização, pode-se observar que os Grupos Controle, Vitamina E e Grupo Vitamina E/Radiação, apresentaram dicróismo linear nas lâminas correspondentes ao 7º dia do processo de reparação tecidual. Os demais grupos, Grupo Irrradiado e Grupo Óleo de Oliva, somente apresentaram dicróismo nas lâminas correspondentes ao 14º dia do processo de reparação. Torna-se evidente que os três primeiros grupos acima descritos apresentaram uma organização macromolecular das fibras de colágeno mais cedo que os dois últimos grupos citados.



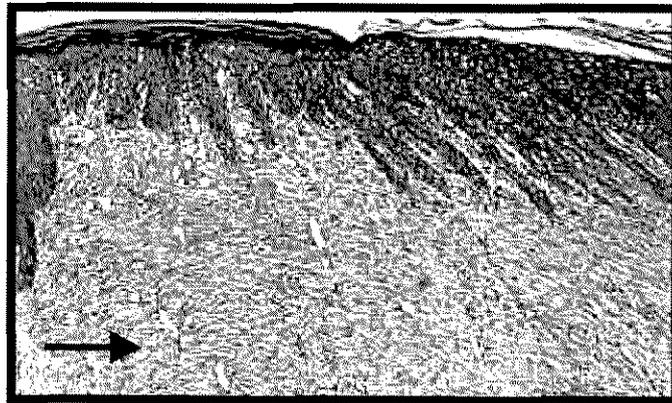
**Prancha 13**  
**Reação Histoquímica de Azul de Toluidina**



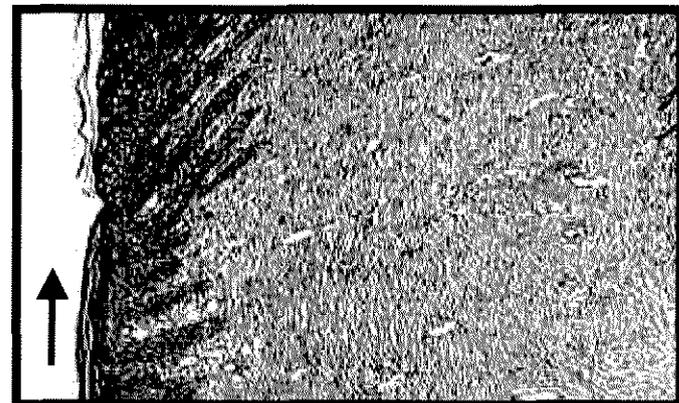
**FIGURA 21-** Incidência paralela ao Plano de polarização da luz



**FIGURA 22-** Incidência perpendicular ao Plano de polarização da luz - coloração azul ortocromática



**FIGURA 23-** Incidência paralela ao Plano de polarização da luz



**FIGURA 24-** Incidência perpendicular ao Plano de polarização da luz - coloração róseo metacromática

## **6- DISCUSSÃO**

A reparação tecidual corresponde a um processo complexo que envolve muitos mecanismos os quais estão intimamente associados. Esta íntima associação faz com que todos os fatores ligados ao processo de reparação desempenhem suas funções de forma que se um determinado elemento sofrer algum dano que venha a afetar seu funcionamento, outro elemento e por conseguinte outra etapa do processo, será também afetada. Pode-se apenas de forma didática, dividir o processo de reparo em três fases: inflamação, produção do tecido de granulação e maturação, onde ocorre a formação e remodelação da matriz. Em relação às células predominantes, na fase de inflamação, onde

predominam os fenômenos vasculares, têm-se os neutrófilos polimorfonucleares, monocitos e linfócitos. Essas células são atraídas ao local ferido mediante à liberação de algumas substâncias, processo este conhecido como quimiotaxia. Os neutrófilos, nesta fase inicial do processo de reparo tem por função “limpar” a região ferida de todos os elementos estranhos. Os monócitos se convertem à macrófagos e fagocitam as partículas patogênicas. Após esse período, tem início a formação do tecido de granulação. Esse tecido corresponde a um tipo de tecido onde há predominância de fibroblastos e angioblastos, células responsáveis pela formação de vasos sanguíneos. A presença de um grande número de vasos sanguíneos é a principal característica desse processo. Esses vasos desenvolvem-se semelhante à alças da profundidade do tecido até sua superfície, e a observação de um corte feito perpendicularmente aos vasos, quando observado macroscopicamente, é que confere o nome de tecido de granulação, pois os vasos assemelham-se à grânulos. Por fim, ocorre a produção de moléculas de glicosaminoglicanas e colágeno que após agregarem-se e com a produção dos feixes de fibras colágenas orientados formando então a cicatriz. Esta fase é caracterizada por um menor número de fibroblastos. Ressalta-se, mais uma vez, que essa divisão em fases do processo de reparo é apenas para um melhor entendimento do processo em si, visto que todas as etapas que ocorrem são interdependentes.

Esse complexo processo que ocorre para reparar um dano ao tecido, está sujeito a sofrer alterações. Existem determinadas drogas que contribuem para a sua evolução de forma mais rápida. Entretanto, existem alguns fatores que podem

interferir nesse processo, podendo-se citar como fator do próprio organismo a diabetes e como fator externo, a radiação ionizante.

O uso das radiações ionizantes tem se tornado uma constante, seja utilizando esse tipo de energia como forma de diagnóstico ou também como forma terapêutica. Entretanto, sabe-se das possíveis conseqüências que o uso incorreto ou até mesmo devido à acidentes nucleares, das radiações ionizantes, podem trazer ao ser vivo e por que não de forma mais ampla, ao ambiente. Essas conseqüências podem ser desde à morte indiscriminada de indivíduos que entram em contato com essa energia, como no caso de Goiânia, onde pessoas morreram devido ao contato direto com o Césio 137, até danos menores que podem ser decorrentes da ação deletéria da radiação ionizante, como um retardo no processo de reparação tecidual, observado até mesmo quando utilizam-se baixas doses, como observado por **BARTTON et al** (1985), **KRISHNAN et al** (1987), **ALMEIDA** (1997) e **MONTEIRO** (1999).

Diante desses fatores, a ciência sentiu necessidade de pesquisar substâncias que minimizassem a ação deletéria da radiação, substâncias estas conhecidas como Radioprotetores. Os radioprotetores podem ser químicos e biológicos. A lipofílica Vitamina E ou Tocoferol é conhecida por ser varredora de radicais livres, sendo considerada um radioprotetor biológico.

A formação de radicais livres está associada tanto ao fermento, quanto principalmente, à irradiação. A interação da radiação com a matéria produz reações que leva a formação de radicais livres e possibilitam o aparecimento de reações com a formação de substâncias como o peróxido de hidrogênio, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

**MARCUS E COULSTON**, afirmam que a Vitamina E impede a formação de produtos tóxicos da oxidação, como os produtos de peroxidação.

Os resultados obtidos nesta pesquisa, decorrentes das avaliações realizadas através de microscopia óptica, e mais especificamente, através da coloração por hematoxilina-eosina, indicam que o processo de reparação tecidual nos animais pertencentes ao grupo controle seguiu a seqüência normal esperada, visto que aos quatro dias pode-se observar que o tecido ferido já apresentava o processo de angiogênese. Em relação à população celular, observa-se que os linfócitos juntamente com os neutrófilos, embora em menor número, o que corresponde à evolução normal, são os tipos celulares presentes. Outro fator importante nesta fase avaliada, corresponde à presença da crosta, que tem como função proteger esse novo tecido em desenvolvimento. Avaliando-se o grupo de animais que sofreram o procedimento cirúrgico e receberam 180 U. I. de Vitamina E, o quadro avaliado corresponde também a esta descrição. Quando avalia-se a ferida no grupo de animais que recebeu somente o óleo, observa-se que existe um marcante infiltrado de células inflamatórias, predominantemente linfócitos, subjacente à crosta. Com isso pode-se observar que o óleo administrado nos animais pode ter atuado como um fator irritante ao processo de reparação tecidual. A finalidade de administrar-se o óleo foi devido ao fato de que para aquele grupo de animais que recebeu Vitamina E, houve necessidade de um veículo. Sendo assim, a administração somente do óleo em um grupo de animais foi necessário. Isto será comentado mais adiante. No grupo de animais irradiados, nos quais não foi administrada a Vitamina E, observa-se a presença do infiltrado

de células inflamatórias. Entretanto, esse infiltrado de células mostra-se reduzido, quando comparado à todos os grupos. **VEGESNA et al**, em 1993, observaram que animais irradiados corpo total e animais que tiveram somente metade do corpo irradiado, apresentaram uma menor quantidade de células inflamatórias em relação à animais que receberam irradiação local. Portanto, a radiação de elétrons interferiu na produção hematopoiética dos animais deste grupo, contrariamente à ação do óleo que como possível fator irritante estimulou a proliferação de células inflamatórias. Protegendo o tecido inflamado tem-se a crosta de material necrótico. A néo vascularização não ocorreu e portanto, a irradiação provavelmente contribuiu para a permanência do infiltrado inflamatório neste grupo e também agiu retardando ou impedindo a formação de vasos. Segundo **VAN DEN BRENK**, em 1959, doses de radiação X e  $\gamma$ , acima de 2.000 R impedem o crescimento de brotos capilares. Como nesta pesquisa, embora sendo radiação de elétrons, utilizou-se uma dose de 6 Gy, portanto bem inferior à dose citada, isto pode justificar a não formação dos vasos até este período avaliado. Também **REINHOLD & BUISMAN**, em 1973, observaram que doses de 1.000 rad de radiação X reduz a proliferação de vasos sanguíneos. Um volume vascular diminuído em feridas irradiadas, também foi observada por **GUIDUGLI NETO** (1987). O processo de reparo do grupo irradiado que recebeu o tratamento com Vitamina E, mostra também a presença de um infiltrado de células inflamatórias, podendo-se afirmar que este infiltrado não é tão grande quanto aquele existente nos dois últimos grupos citados. Entretanto, já existe a presença de fibroblastos, o

que diferencia esse grupo dos dois anteriores. O papel radioprotetor da Vitamina E aos 4 dias do processo de reparação tecidual, nas condições estudadas, embora não tão evidente, já indica haver uma diferença entre o grupo irradiado que recebeu Vitamina E e o grupo que sofreu apenas radiação.

Ainda sob o aspecto da coloração por hematoxilina-eosina, observa-se que aos 7 dias do processo de reparo, o grupo controle apresenta-se com a principal característica do tecido de granulação: a néo formação de grande quantidade de vasos. A função dos vasos está ativa e isso é observado também no grupo de animais que recebeu somente o tratamento com Vitamina E, embora neste grupo de animais o número de vasos seja menor. Também pode ser observada a formação de colágeno, o que coincide com os achados de **VIZIOLI**, em 1971. No grupo de animais que recebeu somente óleo, o tecido mostra-se bastante desorganizado, assemelhando-se ao grupo de animais que foi irradiado. Pode-se afirmar que a irradiação interferiu no processo de reparo. Segundo **WANG et al**, em 1994, a irradiação local com 9,6 Gy de eletrons e feixe de 4 MeV, produz desorganização de fibras colágenas, contribuindo para um retardo no processo de reparação. Nesta pesquisa, apesar da dose utilizada ter sido inferior à citada, a energia do feixe foi maior, 6 MeV, o que permite dizer que a penetração da radiação foi maior. Além disso, os animais tiveram seus corpos integralmente expostos à radiação. O grupo de animais que recebeu Vitamina E e foram irradiados, apresentou aos 7 dias, um processo de reparo intermediário entre os grupos Controle e Vitamina E e os grupos Óleo de Oliva e Irradiado. Portanto, apesar de não ser totalmente evidente o efeito radioprotetor desta vitamina E até o

presente momento, pode-se ver que o processo de reparo no grupo de animais irradiados e tratados com Vitamina E, não sofreu tanta interferência como no processo dos animais que receberam somente óleo ou foram somente irradiados.

A presença de vasos néo formados no grupo controle aos 7 dias, corresponde a um fator essencial para o desenvolvimento do epitélio, observado aos 14 dias, recobrando toda a área correspondente à ferida. Como no grupo que recebeu somente a Vitamina E, o número de vasos presentes aos 14 dias mostra-se inferior àquele observado no grupo Controle, o epitélio apresenta-se menos espesso, o que confere uma característica de um processo de reparo mais avançado neste grupo. Deve-se lembrar que o ferimento também produz radicais livres e que neste grupo, esses elementos são produzidos somente por este fator. Sendo assim, torna-se evidente que a Vitamina E competiu com esses radicais livres exercendo sua função de anti-oxidante. No grupo de animais que recebeu somente o óleo de oliva, o atraso no processo de reparação torna-se bastante evidente, pois observa-se que o tecido aos 14 dias ainda apresenta a crosta, embora o epitélio inicie sua migração, e o tecido subjacente seja rico em vasos sanguíneos. O grupo irradiado, apresenta retardo, visto que ainda não é observada migração epitelial e o tecido subjacente à crosta de material necrótico, apresenta-se bastante vascularizado com os vasos mostrando-se funcionais, aspecto este correspondente à um tecido com 7 dias de evolução. Observa-se também haver pequeno número de células responsáveis pela fibroplasia, os fibroblastos. Isto coincide com as afirmações de **MOORE**, em 1984, quando o autor afirma que uma ferida que é irradiada numa fase mais tardia do processo de

reparação, como nesse caso em que a ferida foi irradiada três dias após sua produção, o número de fibroblastos sofre um decréscimo. O grupo irradiado e tratado com Vitamina E, apresenta um tecido bastante celular e ao contrário do grupo anterior, já pode-se observar a migração do epitélio à partir das bordas da ferida. Além disso, o tecido apresenta-se mais organizado. Segundo, **LONDER & MYERS**, em 1952, a Vitamina E pode aumentar a recuperação da medula óssea.

O processo de reparação tecidual progride no grupo controle dentro dos parâmetros normais. Aos 21 dias, observa-se o epitélio com espessura reduzida, queratinizado e presença de anexos da pele. O grupo que recebeu somente o tratamento com vitamina E, apresenta um processo mais evoluído, observando-se também a presença do epitélio queratinizado e de anexos da pele, entretanto a área correspondente à ferida apresenta-se bastante reduzida em relação ao grupo Controle. Mais uma vez, ressalta-se que a Vitamina E agiu como um perfeito anti-oxidante, combatendo os radicais livres produzidos na ferida. **LONDER & MYERS**, em 1952, e **SARRIA & PRASAD**, em 1984, afirmam que a Vitamina E é um potente anti-oxidante, embora esses autores tenham avaliado o seu efeito radioprotetor. O grupo que recebeu somente óleo, sem dúvida nenhuma, foi o grupo em que o processo de reparação tecidual mostrou-se mais retardado, mesmo quando comparado ao grupo irradiado, que aos 21 dias apresenta epitélio recoberto um tecido bastante celular e vascular. Já o grupo irradiado que recebeu tratamento com Vitamina E, apesar de mostrar um processo mais retardado, quando comparado aos grupos controles e tratado somente com Vitamina E, apresenta um processo mais evoluído em comparação aos grupos que receberam

óleo de oliva e ao grupo que foi irradiado. Igualmente, o efeito anti-oxidante da Vitamina E pode ser observado no Grupo Irradiado e tratado com Vitamina E. Mesmo que o processo de reparação tecidual tenha se mostrado bastante evoluído no grupo que recebeu somente vitamina E, vale ressaltar que a quantidade de radicais livres formada nos grupos irradiados foi bem maior, pois estes foram produzidos por dois fatores: a produção da ferida e a irradiação. Portanto no grupo irradiado, a Vitamina E teve que competir com um maior número de radicais livres, o que justifica o processo de reparo ser diferente nos dois grupos tratados com Vitamina E.

Pelos resultados obtidos, observa-se que o óleo de oliva exerceu maior dano ao processo. Provavelmente isso foi decorrente de um efeito irritante, visto que o óleo foi injetado 48 horas antes da produção da ferida, interferindo na fase inflamatória inicial, observando-se que a intensa presença de células inflamatórias no local da ferida, faz com que ocorra um retardo acentuado em todo o processo. Da mesma maneira, a irradiação interferiu na população de células inflamatórias, mas de forma contrária à do óleo de oliva. Esta produziu supressão celular, retardando a progressão das fases posteriores do processo de reparo. Depressão de macrófagos foi observada por **MUSTOE et al** (1989) que utilizaram 800 rad de radiação de elétrons corpo todo, citando estes autores que essa dose causa profunda depressão da medula óssea. Também **CROMACK et al** (1993), observou essa depressão da medula óssea após irradiação com 800 rad de uma bomba de cobalto 60. Isso indica, portanto que irradiação de corpo total, como a realizada neste experimento pode causar depressão da medula óssea afetando

uma população de células que papel importante na reparação de feridas: os monócitos que posteriormente se transformam em macrófagos, células que além de exercer a tão conhecida função de fagocitose ainda são responsáveis pela estimulação de alguns tipos de células em liberarem certas substâncias que tem importante papel no processo de reparação tecidual normal. A ação anti-oxidante da Vitamina E tornou-se evidente, principalmente pela evolução do processo de reparo no grupo de animais que foi tratado com Vitamina E e não sofreu irradiação. Entretanto, quando avalia-se o efeito radioprotetor da Vitamina E, este não está associado somente ao fato desta vitamina competir com radicais livres formados, mas também por outros fatores. **HOFFER & ROY *et al***, em 1975, citam que animais que tiveram dieta deficiente em Vitamina E, apresentaram fragilidade em seus eritrócitos. Durante o processo de reparo, o metabolismo da região está aumentado, conseqüentemente, há necessidade de células que desempenhem funções altamente energéticas. A vascularização é um fator importante para o processo de reparo e com ela a plena função das células sanguíneas, as quais no presente estudo, de acordo com os autores citados acima, foram beneficiadas pela Vitamina E. No caso dos animais irradiados que receberam Vitamina E, a provável supressão foi um fator marcante, entretanto, a injeção de Vitamina E, pode, conforme citado por **MALICK *et al***, em 1978, estar associada à um aumento da resposta imune ou a um aumento da recuperação da medula óssea.

Outro fator associado à irradiação, corresponde ao processo de peroxidação. Segundo **KONINGS & DRIJVER, *et al***, 1979, deficiência de Vitamina E, torna as membranas celulares mais vulneráveis à peroxidação lipídica. A

diminuição deste processo por anti-oxidantes em animais irradiados com radiação X e ozônio, também foi observada por **KONINGS & OOSTELOO *et al***, em 1980. **SHIRAIISHI *et al***, em 1985, observaram que a Vitamina E inibiu fortemente a peroxidação de lipídios em membranas, decorrente de irradiação.

Injúria ao DNA ocorre em tecidos irradiados e segundo **GALLIGAN *et al***, em 1997, as Vitaminas C e E são anti-oxidantes bastante efetivos contra injúrias ao DNA, o que também foi observado por **KONOPACKA *et al***, em 1998. Embora este processo ainda não esteja completamente esclarecido, pode-se supor que injúrias ao DNA de células presentes no processo de reparo tenham sido evitadas pela Vitamina E, fazendo com que as novas células não apresentassem alterações morfológicas e funcionais que poderiam levar ao funcionamento deficiente das mesmas e com isso alterações na produção do novo tecido

A avaliação do processo de reparo pode se dar também através da observação da resistência do tecido formado, quando submetido à forças capazes de causarem rompimento neste tecido. O efeito da Vitamina E também foi avaliado neste sentido. **TAREN *et al***, em 1986, observaram uma resistência média à tensão de feridas de animais tratados com Vitamina E e irradiados, de 95% em relação ao grupo controle. **CARROL *et al***, em 1995, observaram que feridas de animais que receberam um tratamento com Vitamina E associada à ribose-cisteína, tiveram maior resistência à força de rompimento. Na presente pesquisa, não foi utilizado qualquer método para avaliar a resistência à tensão do tecido. Entretanto, a resistência do tecido é conferida com a organização dos feixes de fibras colágenas que dispõem-se horizontalmente e de forma orientada. Isto foi

avaliado pelo dicroísmo linear. Segundo o dicroísmo apresentado pelos tecidos dos grupos estudados, observou-se que os Grupo Controle, Vitamina E e Vitamina E/Radiação apresentaram dicroísmo nas lâminas correspondentes ao sétimo dia do processo de reparo. Isso não significa dizer que os três grupos citados tiveram a mesma evolução em relação ao dicroísmo, pois um determinado grupo pode ter apresentado dicroísmo já no quinto dia e outro grupo no sexto dia. Entretanto como os períodos de avaliação foram estabelecidos previamente, pode-se dizer que esses três grupos tiveram um processo de reparo mais semelhante entre si e diferente dos outros dois grupos, Óleo de Oliva e Irradiado, que só apresentaram dicroísmo no décimo quarto dia. Portanto os resultados coincidem com os achados dos autores acima citados em relação ao papel da Vitamina E na avaliação da resistência da ferida irradiada, embora a avaliação tenha sido de forma indireta.

Este trabalho concorda com todos os trabalhos até aqui citados quanto ao efeito radioprotetor da vitamina E, porém não está de acordo com o trabalho de **ROSTOK et al.** (1980) que observaram que não houve diferença significativa entre os animais dos grupos que receberam vitamina E no pré-tratamento e os do grupo controle. Deve-se levar em consideração que nesse trabalho o tipo de tecido analisado foi diferente deste trabalho e dos outros autores, sugerindo que a vitamina E não exerce efeito radioprotetor nas células do pulmão e coração.

Os resultados deste trabalho também não concordam com os achados de **EL-NAHAS et al.** (1993), onde observaram que a vitamina E não se mostrou efetiva na radioproteção nas aberrações cromossômicas e na atividade mitótica das células da medula óssea. Os autores também afirmaram que o óleo de oliva, o

veículo da vitamina E, promove ação radioprotetora e esta ação é suprimida pela presença da vitamina E. Neste trabalho, por outro lado, o efeito do óleo de oliva e a associação deste óleo com a radiação de eletrons promoveram um atraso na reparação tecidual das feridas produzidas, tornando-se claro, neste trabalho, que o efeito radioprotetor no processo de reparação tecidual é dada pela vitamina E e não pelo óleo de oliva. Talvez esta diferença de resultados pode ser devido à via de administração da vitamina E e do óleo de oliva, onde no trabalho de **EL-NAHAS et al.** (1993) foi por via oral e neste foi por via intraperitoneal.

Diante do exposto ficou claro o papel anti-oxidante da Vitamina E no processo de reparação tecidual, principalmente pelos resultados apresentados pelo grupo de animais que recebeu somente o tratamento com Vitamina E. O papel da Vitamina E como radioprotetor também pode ser observado, uma vez que o processo de reparação tecidual dos animais irradiados que receberam Vitamina E assemelhou-se àquele do Grupo Controle. Considerando-se que a irradiação foi realizada em corpo todo, e portanto os efeitos deletérios deste tipo de irradiação são mais danosos, pode-se ter na Vitamina E um aliado para minimizar os danos causados pela ação da radiação ionizante no processo de reparação tecidual, uma vez que não houve interferência desta substância no processo, quando avaliado em feridas normais ou irradiadas. Isto foi observado pelo fato de que os aniamis que receberam somente vitamina E e que não sofreram irradiação apresentaram um processo de reparao evoluído em relação ao grupo controle, comprovando portanto, o efeito benéfico desta substância.

## 7- CONCLUSÕES

Segundo as condições experimentais utilizadas, os resultados obtidos nesta pesquisa permitem concluir que:

- A vitamina E, ao que parece, favoreceu o processo de reparação, atuando como um anti-oxidante, uma vez que o grupo de animais tratado somente com Vitamina E, mostrou o processo de reparo mais evoluído que o grupo controle;
- O efeito radioprotetor da Vitamina E, foi comprovado, visto que os animais irradiados e tratados com Vitamina E apresentaram a evolução do processo de reparo semelhante aquela mostrada pelos animais do grupo controle.

## 8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALMEIDA, S.M. **Efeito da radiação de elétrons na reparação tecidual**. Piracicaba, 1997. 103p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campina.
2. BAKER, D.G., KROCHAK, RJ The response of the microvascular system to radiation: a review. **Cancer Invest**, New York, v.7, n.3, p.287-294, 1989.
3. BARTON, S.P. *et. al.* Detection of the effects of low dose ionozing irradiation on pidermal function. **Br j Radiol**, london, v.58, n.685, p.73-76, Jan. 1985.

4. CARROL, P.P. *et. al.* Efficacy of radioprotective agents in preventing small and bowel radiotion injury. **Dis Colon Rectum**, Philadelphia, v.38, n.7, p.716-722, July 1995.
5. CROMACK, d.t., *et. al.* Acceleration of tissue repar by transforming growth factor  $\beta$ 1: Identification of in vivo mechanism of action with radiotherapy-induced soecific healing deficits. **Surg**, v.113, n.1, p. 36-42, jan. 1993.
6. DRAKE, B.D., SCOTT, N.O. wound healing considerations in chemotherapy and radiation thepary. **Clin Plas Surg**, Philadelphia, v.22, n.1, p.31-37, jan. 1995.
7. DRÓZDZ, M. *et. al.*. Effect of irradiation of glycosaminoglycans content in rat tissue. **Arch Immunol Ther Exp (Warsz)**, Wroclaw, v. 29, n. 4. 514-519, 1981.
8. EL-NAHAS, S.M. *et. al.*. Radioprotective effect of vitamins C and E. **Mutat Res**, Amsterdam, v. 301, n. 2, p. 143-147, Feb. 1993.
9. EVANS, H. M., BISHOP, K.S. On the relationship between fertility and nutrition. II. The ovulation rhythm in the rat on inadequate nutrional regimes. **J Metab res**, Morrístow, v.1, p. 319-356, 1922.

10. FELEMOVICIUS, I. *et al.* Intestinal radioprotection by vitamin E (alpha-tocopherol)  
**Ann Surg**, Philadelphia, v.222, n.4, p. 504-510, Oct. 1995.
11. FRANKLIN, A., COULTAS, P. Some effect of radiation on the healing of transected mouse ear. **Radiat Res**, Oak brook, v. 100, n. 1, p.55-64, Oct. 1984.
12. GALLIGAN, E.S. *et al.* An investigation of the radioprotective effect of dietary antioxidants on isolated murine lymphocytes. **Biochem Soc Trans**, London, v.25, n.1, p.136, Feb. 1997.
13. GUIDUGLI NETO, J. The effect of Roentgen radiation on the capillary sprouts and superficial loops of granulation tissue I. Quantitative study of the vascular volume. **Ver Fac Odontol Univ São Paulo**, São Paulo, v.1, n.4, p.6-8, out./dez.1987.
14. HOFFER, A., ROY, M.R. Vitamin E decreases erythrocyte fragility after wholebody irradiation. **Radiat Res**, New York, v.61, n.3, p.439-443, Mar. 1975.
15. KRISHNAN, E. C. *et al.* Dose-dependent radiation effect on microvasculature and repair. **J. natl Cancer Inst**, Bethesda, v.79, n.6, p 1321-1325, Dec. 1987.

16. KONNINGS, A.W.T., DRIJVER, E.B. Radiation effects on membranes. I. Vitamin E deficiency and lipid peroxidation. **Radiat Res**, New York, v. 80, n.80, n.3, p.464-501, Dec. 1979.
17. KONNINGS, A.W., OOSTERLOO, S.K. Radiation effect on membranes. II. A comparison of the effects of X irradiation and ozone exposure with respect to the relation of antioxidant concentration and capacity for lipid peroxidation. **Radiat Res**, New York, v. 81, n.2, p.200-207, Feb. 1980.
18. KONOPACKA, M. *et al* Modifying effect of vitamins C, E and beta-carotene against gamma-ray-induced DNA damage in mouse cells. **Mutat Res**, Amsterdam, V.417, n.2/3, p.85-94, Sept. 1998.
19. LISON, I. **Histochimie et citochimie animales**: principes et méthodes. Paris: Gauthier-Villais, 1960. V.1, p.280.
20. LONDER, H.N., MYERS, C.E. Radioprotective effect of vitamin E. **Am J Clin Nutr**, New York, v.31, n.4, p.705, 1952.
21. MALICK, R.M. *et al*. Effect of vitamin E on post irradiation death in mice. **Experientia**, Basel, v.34, n.9, p.1216-1217, Sep 1978.

22. MARCUS, R. & COULSTON, A.M. Vitaminas lipossolúveis: vitaminas A, K, e E. *In*: GOODMAN, L.S., GILMAN, A.G. **As bases farmacológicas da terapêutica**, 9. Ed., Rio de Janeiro: Mc Graw-Hill, 1996. Cap.63, p.1165-1178.
23. MONTEIRO S.A.C. **Efeito da Irradiação por elétrons em deridas e em tecido de granulação**. Piracicaba, 1999. 99p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas.
24. MOORE, M.J. The effect of radiation on connective tissue. **Otolaryngol Clin Nort Am**, Philadelphia, v.17, n.2, p.389-398, May 1984.
25. MUSTOE, T.A., *et al.* Reversal of impaired wound healing in irradiated rats by platelet-derived growth factor-BB. **Am J Surg**, v.158, p.345-250, Pct. 1989.
26. PEREIRA FILHO, G.V. *et al.* Estudo histológico e morfométrico da reparação de feridas cutâneas, provocadas em ratos, submetidas a radiação beta do estrôncio-90. **Int J Oral Maxillofac Implants**, Lombard, v.13, n.5, p.620-629, 1998.
27. RANA, K. *et al.* Radioprotection of chick thymus by vitamin E. **Indian J Exp Biol**, New Delhi, v.31, n.10, p.847-849, Oct 1993.

28. REINHOLD, H.S., BUISMAN, G.H. Radiosensitivity of capillary endothelium. **Br J Radiol**, London, v.46, n.541, p.54-57, Jan. 1973.
29. REYNOLDS, J.E.F. (Ed), **MARTINDALE**: The extra pharmacopoeia. 29<sup>th</sup> ed. London: The Pharmaceutical Press, 1989, p. 1284-1285.
30. ROSTOCK, R.A. *et al.* Evaluation of high-dose vitamin E as a radioprotective agent. **Radiology**, Easton, v.136, n.3, p.763-765, Sept. 1980.
31. SARRIA, A., PRASAD, K. N. DI-alpha-tocopheryl succinate enhances the effect of  $\gamma$ -irradiation on neuroblastoma cells in culture. **Proc Soc Exp Biol Med**. New York, v.175, n.1, p.88-91, Jan.1984.
32. SHIRAISHI, N. *et al.* Radiation-induced peroxidation of lipid dissolved in organic solvent and its inhibition by alpha-tocopherol and cepharanthine. **Physiol Chem Phys Med NMR**, melville, v.17. n.3, p.243-246, 1985.
33. SIMON, G.A. *et al.* Wound healing after laser injury to skin – the effect of occlusion and vitamin E. **J Pharm Sci**, Washington, v.83, n.8, p.1101-1106, Aug. 1994.
34. SONG, S.L., CHENG, T.M. Macrophages and wound healing. **Sheng Liko Hsueh Chin Chon**, Beijing, v.28, n.3, p.265-267, July 1997.

35. TAREN, D.L. *et al.* Increasing the breaking strength of wounds exposed to preoperative irradiation using vitamin e supplementation. **In J Vitam Nutr Res**, Bern, v.57, n.2, p.133-137, Dec. 1986.
36. VAN DEN BRENK, H.A.S. The effect of ionizing radiations on capillary sprouting and vascular remodelling in the regenerating repair blastema observed in the rabbit ear chamber. **Am J Roentgen**, Springfield, v.81, n.5, p.859-884, May 1959.
37. VEGESNA, V., *et al.* The effect of local and systemic irradiation on impairment of wound healing in mice. **Radiat Res**, New York, v.135, n.3, p.431-433, Sept 1993.
38. VIZIOLI, M.R. Macromolecular organization of rat sponge-induced granulation tissue as revealed by dichroism. **ACTA Anat (Basel)**, Basel, v.80, n.10, p.73-80, Nov 1971.
39. WANG, Q, *et al.* Electron irradiation slows down wound repair in rat skin: A morphological investigation. **Br J Dermatol**, Oxford, v.130, n.5, p.551-560, May 1994.