



**FLÁVIO RICARDO MANZI**  
Cirurgião Dentista

**ESTUDO DO EFEITO RADIOPROTETOR DA  
VITAMINA E (dl-alfa-tocoferil) NA REPARAÇÃO  
TECIDUAL EM RATOS**

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

PIRACICABA  
2001



UNICAMP



**FLÁVIO RICARDO MANZI**  
Cirurgião Dentista

**ESTUDO DO EFEITO RADIOPROTETOR DA  
VITAMINA E (dl-alfa-tocoferil) NA REPARAÇÃO  
TECIDUAL EM RATOS**

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

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

CPG, 26 / 4 / 21

Assinatura do Orientador

Orientador: Prof. Dr. Frab Norberto Bóscolo.

Banca Examinadora: Prof. Dr. Gustavo Dorneles Pistóia  
Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Solange Maria de Almeida  
Prof. Dr. Frab Norberto Bóscolo

PIRACICABA  
2001

### Ficha Catalográfica

M319e Manzi, Flávio Ricardo.  
Estudo do efeito radioprotetor da vitamina E (dl-alfa-tocoferil) na reparação tecidual em ratos. / Flávio Ricardo Manzi. – Piracicaba, SP : [s.n.], 2001.  
x, 122p. : il.

Orientador : Prof. Dr. Frab Norberto Bóscolo.  
Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

I. Radiação ionizante. 2. Antioxidantes. 3. Radicais livres – Biologia. I. Bóscolo, Frab Norberto. 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 23 de Fevereiro de 2001, considerou o candidato FLÁVIO RICARDO MANZI aprovado.

1. Prof. Dr. FRAB NORBERTO BOSCOLO

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

2. Prof. Dr. GUSTAVO DORNELES PISTÓIA

Handwritten signature of Gustavo Dorneles Pistóia in cursive script, written over a horizontal line.

3. Profa. Dra. SOLANGE MARIA DE ALMEIDA

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

## Dedico este Trabalho

À **DEUS**, sempre presente em nossas vidas. “Senhor, meu amigo, me tomaste pela mão; irei sem temor até o fim do caminho” (A. Duval) e à **VIRGEM MARIA**, Mãe de Deus e nossa mãe, por interceder sempre por nós cobrindo-nos sempre com o seu manto sagrado de amor e proteção.

Aos meus pais **Carlos** e **Antonietta**, que me deram a vida e me ensinaram a vivê-la com dignidade, iluminaram os caminhos obscuros com amor, carinho e dedicação para que eu trilhasse sem medo e renunciaram aos seus sonhos para que muitas vezes pudessem realizar os meus. Se eu tivesse o dom de escolher meus pais, certamente seriam vocês. Muito obrigado por tudo.

Ao meu irmão **Tony**, pela amizade e torcida pelo meu trabalho. Saiba que eu tenho uma grande admiração por você, pois certamente o mundo seria melhor se todos tivessem o seu bom coração.

## Agradecimentos Especiais

Ao Prof. Dr. **FRAB NORBERTO BÓSCOLO**, pela dedicação na orientação deste trabalho, e pelos ensinamentos transmitidos durante todo o período de convívio. Ensinamentos tanto profissionais quanto pessoais, que me fizeram tornar um profissional com características nobres. “Ficará em minha mente e coração, imensa gratidão por seus ensinamentos e um grande carinho pela sua admirável pessoa que, humildemente, em tão pouco tempo, deixou-me exemplo de respeito, empenho e capacidade”.

À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> **SOLANGE MARIA DE ALMEIDA**, pela ajuda inestimável na realização deste trabalho e pela pessoa maravilhosa que é; exemplo profissional e pessoal que engrandece o nosso crescimento. Obrigado por tudo. São por ser muitas vezes a minha mãe, dando conselhos preciosos para lidar com os problemas que surgem, por ser a minha irmã, trabalhando junto sem a barreira aluno-professor, e por ser a minha amiga, em quem eu posso confiar.

Ao Prof. Dr. **FRANCISCO HAITER NETO**, pela disposição e paciência em nos auxiliar, ensinar e estimular para o engrandecimento profissional. Agradeço ainda pela sua amizade exemplo de caráter e competência.

Ao Prof. Dr. **MARIO ROBERTO VIZIOLI**, pelo auxílio na realização deste trabalho; e sobre tudo pelo ensinamento passado em todos os momentos.

À minha namorada, **Maria Claudia Turelli**, por estar ao meu lado nesta trajetória me apoiando, mostrando-se companheira e amiga sincera.

Aos meus irmãos de coração, **Gustavo, Claudia, Tasso, Ricardo e Ana Emília**, em quem eu posso confiar e contar em todos os momentos e que sempre poderão contar com a minha verdadeira amizade e respeito.

À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> **Glaucia Maria Bovi Ambrosano**, pelos ensinamentos transmitidos de bioestatística que engrandeceram este trabalho.

A todos os amigos de pós-graduação, **Addah, Anna Sílvia, Élcio, Fabricio, Luciane, Gisela, Karina, Marcia Bruneli, Marcinha, Mariliani, Mauro, Melissa, Osmar e Solange Monteiro**, pelos ótimos momentos passados juntos.

Aos funcionários da Radiologia e grandes amigos, **Waldeck, Raquel, Gislaine, Giselda e Fernando**, pela presteza e eficiência com que sempre nos auxiliou.

Ao técnico do biotério da FOP-UNICAMP, **Wanderlei**, pelo auxílio nas cirurgias e monitoramento dos animais, onde o convívio diário no biotério levou ao surgimento de uma grande amizade.

Às bibliotecárias **Marilene Girello e Heloísa Maria Ceccoti** pelo auxílio na elaboração das referências bibliográficas.

À **Faculdade de Odontologia de Piracicaba**, nas pessoas do seu Diretor Prof. Dr. **Antônio Wilson SallumM**, e Diretor Associado Prof. Dr. **Frab Norberto Bóscolo**, onde tive a oportunidade de dar mais um passo importante para o meu crescimento profissional.

À coordenação dos programas de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Piracicaba - UNICAMP, nas pessoas Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> **Altair Antoninha Del-Bel Cury** e Prof. Dr. **Lourenço Corre Sobrinho**, respectivamente coordenadora e sub- coordenador.

À disciplina de **Farmacologia, Histologia e Patologia da FOP-UNICAMP**, por terem aberto as portas de seus laboratórios para a realização da parte prática deste trabalho.

Ao **CAISM** – Centro de Assistência Integral e Saúde da Mulher – nas figuras de seu Diretor, Dr. **Luiz Carlos Zeferino**; Dr. **Márcio de Oliveira Cunha**, Diretor do serviço de Radioterapia.

Ao físico **José Renato de Oliveira Rocha**, do Centro de Engenharia Biomédica, pela presteza e dedicação no atendimento para a irradiação dos animais.

À **CAPES** e **CNPQ**, pela concessão da bolsa de estudo.

## Sumário

Lista de Figuras .....	01
Lista de Tabelas .....	11
Resumo .....	13
Abstract .....	15
1- Introdução.....	17
2- Revista da Literatura .....	21
2.1. Reparação tecidual e radiação ionizante .....	22
2.2. Radiação ionizante e vitamina E .....	32
3- Proposição.....	43
4- Materiais e Método .....	45
4.1. Materiais .....	45
4.2. Métodos .....	48
5- Resultados .....	55
6- Discussão .....	101
7- Conclusão.....	115
8- Referência Bibliográfica.....	117

## Lista de Figuras

<b>Coloração por Hematoxilina-Eosina .....</b>	<b>57</b>
Figura 1 – Grupo A – Ferida – Aumento original 6,3 x 1,25 x 10 .....	57
Figura 1a – Grupo A – Ferida – Aumento original 16 x 1,25 x 10 .....	57
Figura 2 – Grupo B – Ferida + Vitamina E (3-60 UI) – .....	
Aumento original 6,3 x 1,25 x 10 .....	57
Figura 2a – Grupo B – Ferida + Vitamina E (3-60 UI) – .....	
Aumento original 16 x 1,25 x 10 .....	57
Figura 3 – Grupo C – Ferida + Vitamina E (3-90 UI) – .....	
Aumento original 6,3 x 1,25 x 10 .....	58
Figura 3a – Grupo C – Ferida Vitamina E (3-90 UI) – .....	
Aumento original 16 x 1,25 x 10 .....	58
Figura 4 – Grupo D – Ferida + Irradiação – .....	
Aumento original 6,3 x 1,25 x 10 .....	58
Figura 4a – Grupo D – Ferida + Irradiação – .....	
Aumento original 16 x 1,25 x 10 .....	58
Figura 5 – Grupo E – Ferida + Vitamina E (3-60UI) + Irradiação – .....	
Aumento original 6,3 x 1,25 x 10 .....	59

Figura 5a – Grupo E – Ferida + Vitamina E (3-60UI) + Irradiação – .....	
Aumento original 16 x 1,25 x 10 .....	59
Figura 6 – Grupo F – Ferida + Vitamina E (3-90 UI) + Irradiação – .....	
Aumento original 6,3 x 1,25 x 10 .....	59
Figura 6a – Grupo F – Ferida + Vitamina E (3-90 UI) + Irradiação – .....	
Aumento original 16 x 1,25 x 10 .....	59
Figura 7 – Grupo G – Ferida + óleo(3-1ml)–Aumento original 6,3 x 1,25 x 10..	60
Figura 7a – Grupo G – Ferida + óleo(3-1ml)–Aumento original 16 x 1,25 x 10..	60
Figura 8 – Grupo H – Ferida + óleo (3-1ml) + Irradiação – .....	
Aumento original 6,3 x 1,25 x 10 .....	60
Figura 8a – Grupo H – Ferida + óleo (3-1ml) + Irradiação – .....	
Aumento original 16 x 1,25 x 10 .....	60
Figura 9 – Grupo A – Ferida – Aumento original 6,3 x 1,25 x 10 .....	62
Figura 9a – Grupo A – Ferida – Aumento original 16 x 1,25 x 10 .....	62
Figura 10 – Grupo B – Ferida + Vitamina E (3-60 UI) – .....	
Aumento original 6,3 x 1,25 x 10 .....	62
Figura 10a – Grupo B – Ferida + Vitamina E (3-60 UI) – .....	
Aumento original 16 x 1,25 x 10 .....	62
Figura 11 – Grupo C – Ferida + Vitamina E (3-90 UI) – .....	
Aumento original 6,3 x 1,25 x 10 .....	63

Figura 11a – Grupo C – Ferida Vitamina E (3-90 UI) – .....	
Aumento original 16 x 1,25 x 10 .....	63
Figura 12 – Grupo D – Ferida + Irradiação – .....	
Aumento original 6,3 x 1,25 x 10 .....	63
Figura 12a – Grupo D – Ferida + Irradiação – .....	
Aumento original 16 x 1,25 x 10 .....	63
Figura 13 – Grupo E – Ferida + Vitamina E (3-60UI) + Irradiação – .....	
Aumento original 6,3 x 1,25 x 10 .....	64
Figura 13a – Grupo E – Ferida + Vitamina E (3-60UI) + Irradiação – .....	
Aumento original 16 x 1,25 x 10 .....	64
Figura 14 – Grupo F – Ferida + Vitamina E (3-90 UI) + Irradiação – .....	
Aumento original 6,3 x 1,25 x 10 .....	64
Figura 14a – Grupo F – Ferida + Vitamina E (3-90 UI) + Irradiação – .....	
Aumento original 16 x 1,25 x 10 .....	64
Figura 15 – Grupo G – Ferida+óleo(3-1ml)–Aumento original 6,3 x 1,25 x 10..	65
Figura 15a – Grupo G – Ferida+óleo(3-1ml)–Aumento original 16 x 1,25 x 10..	65
Figura 16 – Grupo H – Ferida + óleo (3-1ml) + Irradiação – .....	
Aumento original 6,3 x 1,25 x 10 .....	65
Figura 16a – Grupo H – Ferida + óleo (3-1ml) + Irradiação – .....	
Aumento original 16 x 1,25 x 10 .....	65
Figura 17 – Grupo A – Ferida – Aumento original 6,3 x 1,25 x 10 .....	68
Figura 17a – Grupo A – Ferida – Aumento original 16 x 1,25 x 10 .....	68

Figura 18 – Grupo B – Ferida + Vitamina E (3-60 UI) – .....	
Aumento original 6,3 x 1,25 x 10 .....	68
Figura 18a – Grupo B – Ferida + Vitamina E (3-60 UI) – .....	
Aumento original 16 x 1,25 x 10 .....	68
Figura 19 – Grupo C – Ferida + Vitamina E (3-90 UI) – .....	
Aumento original 6,3 x 1,25 x 10 .....	69
Figura 19a – Grupo C – Ferida Vitamina E (3-90 UI) – .....	
Aumento original 16 x 1,25 x 10 .....	69
Figura 20 – Grupo D – Ferida + Irradiação – .....	
Aumento original 6,3 x 1,25 x 10 .....	69
Figura 20a – Grupo D – Ferida + Irradiação – .....	
Aumento original 16 x 1,25 x 10 .....	69
Figura 21 – Grupo E – Ferida + Vitamina E (3-60UI) + Irradiação – .....	
Aumento original 6,3 x 1,25 x 10 .....	70
Figura 21a – Grupo E – Ferida + Vitamina E (3-60UI) + Irradiação – .....	
Aumento original 16 x 1,25 x 10 .....	70
Figura 22 – Grupo F – Ferida + Vitamina E (3-90UI) + Irradiação – .....	
Aumento original 6,3 x 1,25 x 10 .....	70
Figura 22a – Grupo F – Ferida + Vitamina E (3-90 UI) + Irradiação – .....	
Aumento original 16 x 1,25 x 10 .....	70
Figura 23 – Grupo G – Ferida+óleo(3-1ml)–Aumento original 6,3 x 1,25 x 10..	71
Figura 23a – Grupo G – Ferida+óleo(3-1ml)–Aumento original 16 x 1,25 x 10..	71

Figura 24 – Grupo H – Ferida + óleo (3-1ml) + Irradiação – .....	
Aumento original 6,3 x 1,25 x 10 .....	71
Figura 24a – Grupo H – Ferida + óleo (3-1ml) + Irradiação – .....	
Aumento original 16 x 1,25 x 10 .....	71
Figura 25 – Grupo A – Ferida – Aumento original 6,3 x 1,25 x 10 .....	73
Figura 25a – Grupo A – Ferida – Aumento original 16 x 1,25 x 10 .....	73
Figura 26 – Grupo B – Ferida + Vitamina E (3-60 UI) – .....	
Aumento original 6,3 x 1,25 x 10 .....	73
Figura 26a – Grupo B – Ferida + Vitamina E (3-60 UI) – .....	
Aumento original 16 x 1,25 x 10 .....	73
Figura 27 – Grupo C – Ferida + Vitamina E (3-90 UI) – .....	
Aumento original 6,3 x 1,25 x 10 .....	74
Figura 27a – Grupo C – Ferida Vitamina E (3-90 UI) – .....	
Aumento original 16 x 1,25 x 10 .....	74
Figura 28 – Grupo D – Ferida + Irradiação – .....	
Aumento original 6,3 x 1,25 x 10 .....	74
Figura 28a – Grupo D – Ferida + Irradiação – .....	
Aumento original 16 x 1,25 x 10 .....	74
Figura 29 – Grupo E – Ferida + Vitamina E (3-60UI) + Irradiação – .....	
Aumento original 6,3 x 1,25 x 10 .....	75
Figura 29a – Grupo E – Ferida + Vitamina E (3-60UI) + Irradiação – .....	
Aumento original 16 x 1,25 x 10 .....	75

Figura 30 – Grupo F – Ferida + Vitamina E (3-90 UI) + Irradiação – .....	
Aumento original 6,3 x 1,25 x 10 .....	75
Figura 30a – Grupo F – Ferida + Vitamina E (3-90 UI) + Irradiação – .....	
Aumento original 16 x 1,25 x 10 .....	75
Figura 31 – Grupo G – Ferida+óleo(3-1ml)–Aumento original 6,3 x 1,25 x 10...	76
Figura 31a – Grupo G – Ferida+óleo(3-1ml)–Aumento original 16 x 1,25 x 10..	76
Figura 32 – Grupo H – Ferida + óleo (3-1ml) + Irradiação – .....	
Aumento original 6,3 x 1,25 x 10 .....	76
Figura 32a – Grupo H – Ferida + óleo (3-1ml) + Irradiação – .....	
Aumento original 16 x 1,25 x 10 .....	76
<b>Coloração por Picrosirius .....</b>	<b>80</b>
Figura 33 – Grupo A – Ferida – Aumento original 16 x 1,25 x 10 .....	80
Figura 34 – Grupo B – Ferida + Vitamina E (3-60 UI) – .....	
Aumento original 16 x 1,25 x 10 .....	80
Figura 35 – Grupo C – Ferida + Vitamina E (3-90 UI) – .....	
Aumento original 16 x 1,25 x 10 .....	80
Figura 36 – Grupo D – Ferida + Irradiação – .....	
Aumento original 16 x 1,25 x 10 .....	80
Figura 37 – Grupo E – Ferida + Vitamina E (3-60UI) + Irradiação – .....	
Aumento original 16 x 1,25 x 10 .....	81
Figura 38 – Grupo F – Ferida + Vitamina E (3-90 UI) + Irradiação – .....	
Aumento original 16 x 1,25 x 10 .....	81

Figura 39 – Grupo G – Ferida+óleo(3-1ml)–Aumento original 16 x 1,25 x 10....	81
Figura 40 – Grupo H – Ferida + óleo (3-1ml) + Irradiação – .....	
Aumento original 16 x 1,25 x 10 .....	81
Figura 41 – Grupo A – Ferida – Aumento original 16 x 1,25 x 10 .....	82
Figura 42 – Grupo B – Ferida + Vitamina E (3-60 UI) – .....	
Aumento original 16 x 1,25 x 10 .....	82
Figura 43 – Grupo C – Ferida + Vitamina E (3-90 UI) – .....	
Aumento original 16 x 1,25 x 10 .....	82
Figura 44 – Grupo D – Ferida + Irradiação – .....	
Aumento original 16 x 1,25 x 10 .....	82
Figura 45 – Grupo E – Ferida + Vitamina E (3-60UI) + Irradiação – .....	
Aumento original 16 x 1,25 x 10 .....	83
Figura 46 – Grupo F – Ferida + Vitamina E (3-90 UI) + Irradiação – .....	
Aumento original 16 x 1,25 x 10 .....	83
Figura 47 – Grupo G – Ferida+óleo(3-1ml)–Aumento original 16 x 1,25 x 10....	83
Figura 48 – Grupo H – Ferida + óleo (3-1ml) + Irradiação – .....	
Aumento original 16 x 1,25 x 10 .....	83
Figura 49 – Grupo A – Ferida – Aumento original 16 x 1,25 x 10 .....	84
Figura 50 – Grupo B – Ferida + Vitamina E (3-60 UI) – .....	
Aumento original 16 x 1,25 x 10 .....	84
Figura 51 – Grupo C – Ferida + Vitamina E (3-90 UI) – .....	
Aumento original 16 x 1,25 x 10 .....	84

Figura 52 – Grupo D – Ferida + Irradiação – .....	
Aumento original 16 x 1,25 x 10 .....	84
Figura 53 – Grupo E – Ferida + Vitamina E (3-60UI) + Irradiação – .....	
Aumento original 16 x 1,25 x 10 .....	85
Figura 54 – Grupo F – Ferida + Vitamina E (3-90 UI) + Irradiação – .....	
Aumento original 16 x 1,25 x 10 .....	85
Figura 55 – Grupo G – Ferida+óleo(3-1ml)– Aumento original 16 x 1,25 x 10...85	
Figura 56 – Grupo H – Ferida + óleo (3-1ml) + Irradiação – .....	
Aumento original 16 x 1,25 x 10 .....	85
Figura 57 – Grupo A – Ferida – Aumento original 16 x 1,25 x 10 .....	86
Figura 58 – Grupo B – Ferida + Vitamina E (3-60 UI) – .....	
Aumento original 16 x 1,25 x 10 .....	86
Figura 59 – Grupo C – Ferida + Vitamina E (3-90 UI) – .....	
Aumento original 16 x 1,25 x 10 .....	86
Figura 60 – Grupo D – Ferida + Irradiação – .....	
Aumento original 16 x 1,25 x 10 .....	86
Figura 61 – Grupo E – Ferida + Vitamina E (3-60UI) + Irradiação – .....	
Aumento original 16 x 1,25 x 10 .....	87
Figura 62 – Grupo F – Ferida + Vitamina E (3-90 UI) + Irradiação – .....	
Aumento original 16 x 1,25 x 10 .....	87
Figura 63 – Grupo G – Ferida+óleo(3-1ml)– Aumento original 16 x 1,25 x 10...87	

Figura 64 – Grupo H – Ferida + óleo (3-1ml) + Irradiação – .....	
Aumento original 16 x 1,25 x 10 .....	87
<b>Reação Histoquímica do Azul de Toluidina .....</b>	<b>90</b>
Figura 65 – Incidência paralela ao Plano de polarização da luz .....	90
Figura 66 – Incidência perpendicular ao Plano de polarização da luz .....	
Coloração azul ortocromática.....	90
Figura 67 – Incidência paralela ao Plano de polarização da luz .....	90
Figura 68 – Incidência perpendicular ao Plano de polarização da luz .....	
Coloração róseo metacromática.....	90
Figura 69 – Gráfico das médias das áreas birrefringentes em função do grupo.....	
no 4º dia de reparação tecidual .....	93
Figura 70 – Gráfico das médias das áreas birrefringentes em função do grupo.....	
no 7º dia de reparação tecidual .....	95
Figura 71 – Gráfico das médias das áreas birrefringentes em função do grupo.....	
no 14º dia de reparação tecidual .....	97
Figura 72 – Gráfico das médias das áreas birrefringentes em função do grupo.....	
no 21º dia de reparação tecidual .....	99
Figura 73 – Gráfico das médias das áreas birrefringentes em função do tempo.....	
para os diferentes grupos .....	100

## Lista de Tabelas

Tabela 1 – Procedimentos realizados em cada grupo.....	49
Tabela 2 – Médias e desvios padrão das áreas birrefringentes (pixel <sup>2</sup> ) .....	
no 4º dia de reparação tecidual .....	92
Tabela 3 – Médias e desvios padrão das áreas birrefringentes (pixel <sup>2</sup> ) .....	
no 7º dia de reparação tecidual .....	94
Tabela 4 – Médias e desvios padrão das áreas birrefringentes (pixel <sup>2</sup> ) .....	
no 14º dia de reparação tecidual .....	96
Tabela 5 – Médias e desvios padrão das áreas birrefringentes (pixel <sup>2</sup> ) .....	
no 21º dia de reparação tecidual .....	98

## **Resumo**

Sendo já descrito na literatura, o efeito deletério da radiação ionizante nos tecidos vivo, propõe-se com este trabalho avaliar a ação da vitamina E como radioprotetor no processo de reparação tecidual em ratos, que sofreram um procedimento cirúrgico, onde foi realizada uma ferida na região dorsal anterior. Os animais foram divididos em 8 grupos: grupo C (controle) – realização da ferida, grupo VE60 – pré tratamento com vitamina E (60 UI) e realização da ferida, grupo VE90 – pré tratamento com vitamina E (90 UI) por via intraperitonal e realização da ferida, grupo IRR – ferida e irradiação de suas bordas 3 dias após à cirurgia, grupo VE60IRR – pré tratamento com vitamina E (60 UI), realização da ferida e irradiação de suas bordas 3 dias após à cirurgia, grupo VE90IRR – pré tratamento

com vitamina E (90 UI), realização da ferida e irradiação de suas bordas 3 dias após à cirurgia, grupo OOL – pré tratamento com óleo de oliva e realização da ferida e grupo OOLIRR – pré tratamento óleo de oliva, realização da ferida e irradiação das bordas 3 dias após à cirurgia. Os dias de obtenção das peças para análise foram 4, 7, 14 e 21 dias após à produção das feridas. A ação radioprotetora da vitamina E foi avaliada pelos seguintes métodos: coloração por hematoxilina-eosina para análise morfológica do tecido de granulação, coloração por picrosirius para avaliar, quantitativamente e quantitativamente a birrefringência dos feixes de colágeno e reação histoquímica do azul de toluidina para observação do dicróismo linear apresentado pelos tecidos organizados . A análise dos resultados obtidos mostrou que 6 Gy de radiação de elétrons com um feixe de 6 MeV, causou um retardo no processo de reparação tecidual e a vitamina E foi efetiva como radioprotetora nas duas doses estudadas, apresentando resultados semelhantes aos animais do grupo controle.

## **Abstract**

The deleterious effect of the radiation in the normal tissues has been already described in the literature. The purpose of this work was to evaluate the action of the vitamin E as radioprotector in the process of tissue reparation in rats, that were submitted to a surgical procedure, in which a wound was performed in the fore dorsal area. The animals were divided in 8 groups: group C (controls) - performance of the wound, group VE60 - previous treatment with vitamin E (60 UI) and performance of the wound, group VE90 - previous treatment with vitamin E (90 UI) and performance of the wound, group IRR - wound and irradiation of its borders 3 days after the surgery, group VE60IRR- previous treatment with vitamin E (60 UI), performance of the wound and irradiation of its borders 3 days after the

surgery, group VE90IRR - previous treatment with vitamin E (90 UI), performance of the wound and irradiation of its borders 3 days after the surgery, group OOL - previous treatment with olive oil and performance of the wound and group OOLIRR - previous treatment with olive oil, performance of the wound and irradiation of the borders 3 days after the surgery. The pieces for analysis were obtaining at 4, 7, 14 and 21 days after the surgical procedures. The radioprotection effect of the vitamin E was evaluated by the following methods: staining by hematoxylin-eosin in order to evaluating granulation tissue, staining by picrosirius to evaluate, quantity and quality the birefringence of the collagen bunches and staining by toluidin in order to observation of the linear dicroism presented by the organized tissues. The results showed that 6 Gy of electron irradiation with a beam of 6 MeV, caused a retard in the process of tissue repair and the vitamin E was effective as a radioprotector in the two studied doses, showing similar results in the animals of the group control.

## **1 - Introdução**

Logo após a descoberta dos raios X pelo Professor Röntgen, em novembro de 1895, Emil H. Grubbé, fabricante de tubos a vácuo, foi acometido por uma dermatite localizada em sua mão. Suspeitou-se, então, que a causa dessa dermatite fosse uma exposição excessiva à radiação X. À medida que outros acidentes que produziram danos biológicos foram ocorrendo, pesquisas foram desenvolvidas, a fim de se tentar diminuir os efeitos deletérios provocados não só pela radiação X mas também por outros tipos de radiações ionizantes.

Atualmente, muito já foi feito para minimizar as possíveis injúrias que podem sofrer os pacientes, quando as radiações ionizantes são utilizadas, seja com finalidade terapêutica ou diagnóstica, tais como: a calibração correta dos aparelhos, a filtração da radiação de maior comprimento de ondas, a colimação do feixe central de radiação por meio do diafragma de chumbo, a utilização de

cilindros abertos, o uso de filmes rápidos e a utilização de aventais plumbíferos para a proteção de órgãos sensíveis à radiação ionizante.

Quando a radiação ionizante é utilizada com finalidade terapêutica em pacientes portadores de certos tipos de neoplasias, existe uma preocupação devido à alta porcentagem do aparecimento de complicações maiores, como é o caso da radioterapia na região abdominal e pélvica, na qual mais de 17% dos pacientes desenvolvem grandes áreas de necrose em tecido adjacente à lesão (**BUBRICK et al.**, em **1992**). Segundo **BUBRICK et al.**(**1992**) e **CARROLL et al.** (**1995**) os pacientes que são submetidos à radioterapia, como no tratamento de neoplasias, 5% necessitam de cirurgias para remoção de injúrias causadas por tal tratamento.

Em relação aos pacientes que obrigatoriamente têm que passar por tratamentos radioterápicos, existe uma preocupação por parte dos profissionais em diminuir os efeitos deletérios das radiações ionizantes. Pode-se citar, a crescente utilização dos Aceleradores Lineares, que produzem feixes de elétrons altamente colimados e devido ao fato de ser possível determinar-se a energia do feixe de radiação, torna-se fácil controlar a profundidade de penetração do mesmo. Associada a esses fatores, existem certas substâncias que também diminuem a ação danosa das radiações ionizantes nos tecidos vivos, conhecidas como Radioprotetores

Um dos fatores que contribuem para os danos causados pela radiação é o fato de que no momento em que a radiação ionizante é absorvido pelos tecidos

vivos ocorrem, nas células, reações físico-químicas com produção de radicais livres. O efeito prejudicial da radiação pode ser devido ao início da peroxidação de lipídios por esses radicais livres, a qual ocorre principalmente dentro da membrana celular com alta concentração de ácidos graxos poli-insaturados. Como as membranas microsomais e mitocondriais apresentam uma grande quantidade desses ácidos, elas são susceptíveis à peroxidação lipídica, que tem como uma das conseqüências a perda da integridade dessas membranas e a diminuição no funcionamento celular. Os radioprotetores têm a propriedade de proteger o tecido vivo ou pelo menos diminuir os danos a ele causados pela radiação. Sua ação é decorrente da ligação química entre essas substâncias e os radicais livres produzidos pela radiação, impedindo esses efeitos danosos.

A vitamina E, em particular, está sendo estudada pelos seus possíveis efeitos radioprotetores. Existem ainda controvérsias sobre seu papel. Vários autores (**HOFFER & ROY, 1975** e **SARRIA & PRASSAD, 1984**) mostraram que a vitamina E, uma substância antioxidante, protege os tecidos normais *in vitro* e *in vivo* frente à radiação, entretanto, outros autores (**EL-NAHAS et al., 1993**) afirmam que a mesma vitamina E se mostra ineficiente na radioproteção de tecidos normais e tumorais.

Como se vê, os efeitos da vitamina E, principalmente no que tange à sua ação radioprotetora, ainda são discutíveis.

## **2- Revista da Literatura**

Para facilitar o entendimento deste capítulo, este foi subdividido em 2 itens:

1- Reparação tecidual e radiação ionizante;

2- Radiação ionizante e vitamina E.

## **2.1- Reparação tecidual e radiação ionizante**

A reparação tecidual é um processo que o organismo vivo se utiliza para restaurar um tecido lesado. Porém nem sempre este novo tecido apresentará as mesmas características do tecido substituído. Assim, a reparação tecidual pode ocorrer por dois processos: a regeneração, no qual o tecido forma-se a partir de células do parênquima, semelhantes às lesadas e a cicatrização, onde o tecido lesado é substituído por tecido conjuntivo fibroso novo formado, resultando a cicatriz.

A cicatrização é um processo que pode ser dividido didaticamente em 3 fases distintas, visto que não há separação de uma fase para outra. A primeira fase, inflamação, é caracterizada pela hemostase, ocorrendo após a produção da ferida, com presença de plaquetas e formação de fibrina. Há a liberação de mediadores químicos que induz a migração de leucócitos, principalmente neutrófilos polimorfonucleares. Os monócitos, que posteriormente se diferenciarão em macrófagos, também estão presentes além dos granulócitos, responsáveis pela retirada do tecido necrótico. A segunda fase é a proliferativa, caracterizada pela presença dos fibroblastos que surgem de células em repouso dos tecidos adjacentes, provavelmente em resposta a mediadores químicos, com função de produzir fibras e matriz extracelular. Esta fase compreende também a nova formação vascular, caracterizando a formação do tecido de granulação. E

por fim, a fase de maturação, que corresponde à formação do tecido conjuntivo fibroso, onde teremos uma diminuição dos fibroblastos e o aumento de fibras, principalmente fibras colágenas, em uma matriz extracelular de proteoglicanas, cuja principal molécula é uma glicosaminoglicana (GAG), formando então a cicatriz.

Vários fatores têm sido citados como prejudiciais ao processo de reparação tecidual, como a radiação ionizante. Muitos autores realizaram pesquisas para observar e verificar as influências das radiações ionizantes no processo de reparação tecidual.

**POHLE, RITCHIE & WRIGHT** em **1931**, realizaram um estudo para observar a influência do comprimento de onda dos raios X na reação biológica. Para isso, os animais foram irradiados com feixes de 100 e 140 kVp, com uma dose de 1000 R. O primeiro grupo de animais foi irradiado em uma região pré demarcada e após 1, 3, 7, 10, 14, 21 e 30 dias foram feitas incisões que se estenderam à pele não irradiada, para servirem de controle, até a área irradiada. O segundo grupo, foi submetido à cirurgia 24 e 48 horas antes da irradiação. Metade dos animais foram sacrificados após 7 dias da produção da ferida e a outra metade após a completa cicatrização macroscópica. Os resultados mostraram que a irradiação pré operatória, não interferiu no processo da cicatrização. No entanto, quando a irradiação foi pós cirúrgica, houve um retardo no processo de cicatrização, principalmente no grupo 24 horas. Os autores

também verificaram que não havia influência do comprimento de onda dos raios X na reação biológica.

**STEIN, BRADY & RAVENTOS**, em **1957**, preocupados com o desenvolvimento de osteorradionecrose em pacientes submetidos à radioterapia na região de cabeça e pescoço, avaliaram os efeitos da radiação na cicatrização de feridas de extrações dentais em ratos, em intervalos que variaram de 1 a 20 dias após à cirurgia. A irradiação foi realizada pela colocação de uma cápsula de radônio, lateralmente à região do alvéolo livre. Os autores observaram que a cicatrização alveolar foi mais pobre e lenta naqueles ratos que tiveram menor tempo transcorrido entre a colocação do radônio e a extração dental.

**GRILLO**, em **1963**, realizou um trabalho para verificar a origem dos fibroblastos, pois até então havia muita controvérsias. Nesse trabalho, utilizou a timidina tritiada como forma de controlar as células em proliferação e os produtos destas divisões celulares. Foi utilizado um grupo de cobaias, que sofreram irradiação em três tempos diferentes: uma cobaia, teve seu dorso irradiado, e 20 minutos depois, foi produzida uma ferida nesta região; no segundo animal, foi produzida a ferida, e 20 minutos após, a mesma foi irradiada, e na terceira cobaia, o período de tempo entre a incisão e a irradiação foi de 28 horas. Cinco dias após a injúria, foi injetado em cada animal, timidina tritiada, intraperitonealmente, e decorridos 45 minutos, os animais foram sacrificados. As cobaias deste grupo foram utilizadas para estudo autorradiográfico. Em um segundo grupo, as incisões não sofreram irradiação, e os animais foram sacrificados aos 20 minutos, 6, 18, e

28 horas após a produção da ferida. Estes animais foram utilizados para estudo histológico. O pesquisador utilizou ainda outro grupo de animais irradiados 20 minutos após a incisão, que foram sacrificados; 6, 18 e 28 horas após a mesma. Antes da divisão celular há formação de DNA, e a timidina tritiada incorpora-se a este; os resultados da pesquisa demonstraram haver uma grande ligação da timidina tritiada com os fibroblastos do tecido de granulação, tanto no leito aberto da ferida, como também na sua área marginal. Desta forma, a principal conclusão do autor foi que os fibroblastos presentes no processo de cura e reparo de feridas, tem sua origem principalmente do tecido conjuntivo das bordas da lesão.

Em 1970, **DOTTO et al.**, realizaram um trabalho quantitativo sobre a resposta vascular em feridas irradiadas produzidas em ratos, utilizando-se de uma dose de 6.000 rads de radiação X. Os animais foram separados em 3 grupos e estes foram expostos à irradiação em três tempos diferentes. O primeiro grupo foi irradiado imediatamente após a realização da ferida; o segundo grupo foi irradiado 3 dias após a produção da ferida e o terceiro grupo foi exposto à radiação 6 dias após. A resposta inflamatória foi analisada 7, 14, 21, 35, 60 e 75 dias após a confecção da ferida. Nesse trabalho foi observado que em todos os grupos estudados, nos estágios iniciais da reparação tecidual havia poucos vasos néo formados e que o comportamento do tecido variou de acordo com o momento da irradiação. Entretanto, a vascularização manteve-se maior nos 3 grupos irradiados, em todos os tempos de exposição aos raios X, sendo que o máximo

valor de vascularização para os dois primeiros grupos foi aos 14 dias, e para o terceiro grupo, ao 7º dia.

Em **1971**, **VIZIOLI**, estudou a organização macromolecular do tecido de granulação, induzido por esponjas implantadas subcutaneamente em ratos. Posteriormente à implantação das esponjas, os animais foram sacrificados após 3, 5, 7, 10, 13, 16, 21 e 28 dias. O dicróismo, realizando a reação histoquímica do azul de toluidina pH 4, revelou que a associação macromolecular entre as glicosaminoglicanas e o colágeno iniciou-se por volta do 7º dia de desenvolvimento.

**MOORE**, em **1984**, observando que na maioria dos casos de tratamento de tumores na região de cabeça e pescoço havia combinação das terapias cirúrgicas e radioterápicas, estudou o efeito da radiação ionizante no tecido conjuntivo e nos vasos sangüíneos. O autor descreveu que no período agudo da reparação tecidual, as maiores alterações ocorrem na fina vasculatura, principalmente a dilatação capilar e que quanto maior a dose de irradiação mais edemaciadas se tornam as células do endotélio, obstruindo alguns capilares. No período crônico, segundo o autor, é observada uma progressiva obliteração e diminuição no número de capilares. Observou ainda, que na fase inicial, há uma redução no número de células inflamatórias, enquanto que numa fase mais tardia, onde o tecido de granulação está presente, observa-se uma diminuição do número de vasos neo formados e fibroblastos, o que resultou em atraso na formação e maturação do colágeno, apresentando uma arquitetura anormal. Tais efeitos não

são observados com doses inferiores a 300 rads, afirmando haver uma dose-dependência dos efeitos e que alterações morfológicas e bioquímicas na ferida, embora mínimas, começam a ser percebidos com doses de 1000 rads.

**GUIDUGLI NETO**, em **1987**, estudou o efeito de altas doses da radiação X, 2000 R, em tecidos de granulação com 6 dias de formação, em ratos. Realizou-se feridas circulares de 1 cm de diâmetro, e para a proteção do resto do corpo dos animais usou-se proteção de chumbo com abertura de 2 cm de diâmetro. Outros animais foram utilizados como grupo controle. Os tecidos foram coletados e analisados nos períodos de 0,5, 3, 6, 12 horas e 3, 7, 15 e 30 dias após a realização das feridas. Foram contados os pontos que correspondiam aos vasos superficiais, incluindo as alças e os brotos capilares, sendo observada diminuição na quantidade de vasos na porção superficial. O autor concluiu que a hipervascularização não ocorreu, sugerindo que tal achado era devido ao crescimento dos vasos profundos.

Em **1988**, **RUDOLPH et al.** verificaram a proliferação de fibroblasto em tecido irradiado de 4 pacientes que sofreram tratamento radioterápico. As amostras do tecido foram obtidas da pele normal, a fim de comparar com feridas produzidas, levando em consideração as unidades proliferativas epidermais e a diminuição na vascularização devido à obstrução de pequenos vasos. Os resultados obtidos evidenciaram que os fibroblastos provenientes da pele irradiada, sem ferida, tiveram crescimento lento em relação ao grupo controle, e

em um dos pacientes, onde as doses de radiação foram menos penetrantes, os fibroblastos apresentaram um crescimento semelhante ao do grupo controle.

**RAVELLI et al.**, em **1990**, utilizaram doses de 1.25 Sv e 1.75 Sv em 2 grupos de ratos, imediatamente após a exodontia dos incisivos superiores. Os animais foram sacrificados após 3, 7, 14 e 28 dias. Foi verificado atraso na reparação alveolar e na proliferação epitelial da mucosa gengival nos dois grupos, sendo mais evidente nos animais que receberam 1.75 Sv.

Os resultados das microcirurgias vasculares realizadas após a colocação de retalhos cirúrgicos, em cirurgias reconstrutivas, são duvidosos quando a área receptora é previamente irradiada. Em **1992**, **AITASALO et al.**, estudaram a cicatrização entre retalhos de pele de microvasculatura livre, onde foram criadas anastomoses sobre superfícies receptoras irradiadas e não irradiadas. Utilizaram ratos que tiveram suas virilhas irradiadas com uma dose única de 20 Gy. Sete dias após a irradiação, realizou-se uma ferida padrão no centro da região. Um retalho de pele não irradiado foi sobreposto sobre a região irradiada. A cicatrização desta interface da pele irradiada e retalho transferido foi avaliada. Os autores concluíram não haver diferenças na capacidade da reparação de retalhos de pele na microcirurgia vascular entre áreas receptoras irradiadas ou não irradiadas.

**BERNSTEIN et al.**, em **1993**, realizaram uma revisão de literatura sobre a ação da radiação ionizante na pele, com parâmetro a resistência da ferida ao rompimento. Após duas semanas as feridas ganham 30% de sua resistência

original, enquanto aquelas que receberam uma dose de 18 Gy de radiação X, antes da realização da ferida, tiveram redução de 50% na resistência. Os autores também relataram que houve uma diminuição da síntese de colágeno nas feridas irradiadas, recuperando-se 2 semanas depois. Ressaltaram que a radiação é prejudicial, devido o efeito tóxico nos fibroblastos, que são responsáveis pela deposição e maturação do colágeno na ferida.

**WANG et al.**, em **1994**, observaram o efeito da radiação de elétrons no processo de reparação de feridas em pele de ratos. Para tanto, foi utilizado um feixe de elétrons de 4 MeV, com profundidade de 3 mm, com uma dose única de 9,6 Gy. Após 7 dias da irradiação, realizou-se uma incisão de 20 mm de comprimento, na área irradiada. O sacrifício dos animais foi após 1, 3, 7 e 14 dias da produção das incisões. As amostras foram analisadas por microscopia eletrônica de varredura e por microscopia de luz. Os autores observaram que até o 7º dia houve um atraso na formação do tecido de granulação, que se restabeleceu por volta do 14º dia.

**DRAKE & SCOTT**, em **1995**, fizeram várias afirmações sobre o efeito da quimioterapia e radioterapia na cicatrização de feridas, alertando que quando a radioterapia é realizada no período imediatamente antes ou após o procedimento cirúrgico, aumentam as complicações nas lesões, ocorrendo uma alteração permanente nos fibroblastos, com uma produção deficiente de colágeno e resposta celular inadequada. Os autores sugerem que os tratamentos de quimioterapia e radioterapia devem ser realizados após este período crítico.

Em **1997**, **ALMEIDA** avaliou morfológica e ultra-estruturalmente o efeito de baixas doses de radiação de elétrons no processo de reparação tecidual em ratos e comparou os possíveis efeitos produzidos pela radiação, quando esta foi realizada imediatamente e três dias após a abertura da ferida, com o processo de reparação tecidual normal. Para a realização do trabalho, os animais foram submetidos a um procedimento cirúrgico, onde produziu-se uma ferida retangular, medindo 2,3 cm por 1,4 cm, na sua região dorsal anterior. As feridas, bem como o restante do corpo do animal, foram protegidos no momento da irradiação, sendo exposta somente uma região correspondente a 1,0 cm lateralmente a cada borda da ferida. Um grupo de animais foi submetido à radiação imediatamente após a abertura da ferida. Outro grupo sofreu irradiação três dias após a injúria. Os animais foram sacrificados aos 2, 4, 7, 11, 14, 17 e 21 dias após o procedimento cirúrgico para o primeiro grupo. Para o segundo grupo, os animais foram sacrificados aos 5, 7, 10, 14, 17, 20 e 24 dias, também após a abertura das feridas. O material de cada grupo foi comparado com grupos controles correspondentes, nos quais não foi realizada a irradiação. A reparação tecidual foi avaliada pela autora, pelos seguintes métodos: coloração pela hematoxilina-eosina, que possibilitou avaliar a morfologia do tecido de granulação; reação histoquímica de metacromasia pelo azul de toluidina pH 4,0, podendo avaliar-se deste modo a síntese de glicosaminoglicanas e por fim impregnação argêntica, onde a autora observou a síntese de colágeno, através da microscopia de polarização (birrefringência). Os resultados demonstraram que 1,0 Gy de radiação

de elétrons com um feixe de 6 MeV, causou um retardo no processo de reparação tecidual, quando aplicado imediatamente e três dias após a abertura da ferida, sendo que quando comparados os dois grupos irradiados, para os dias 7, 14 e 17, o efeito da reparação tecidual foi mais acentuado no grupo que sofreu irradiação três dias após a abertura da ferida.

**MONTEIRO**, em **1999**, com a finalidade de estudar o efeito da irradiação por elétrons em tecido de reparação, utilizou-se de 75 ratos, divididos em 3 grupos. Foram realizadas feridas excisionais medindo 2 cm x 1 cm. O grupo controle foi analisado nos tempos: 2, 4, 5, 7, 10, 11, 14, 17, 20, 21 e 24 dias. O grupo ferida irradiada imediatamente após a cirurgia foi analisado nos tempos 2, 4, 7, 11, 14, 17 e 21 dias. O grupo tecido de granulação, irradiado 3 dias após a remoção do tecido, foi analisado nos tempos 5, 7, 10, 14, 17, 20 e 24 dias. O feixe de elétrons foi produzido por um acelerador linear Mevatron 74, com 6MeV de energia, com dose de 1Gy . Os resultados mostraram atraso na reparação dos tecidos irradiados imediatamente após a cirurgia e no 3º dia da gênese tecidual, sobretudo naqueles irradiados no 3º dia de formação. Ao final do período experimental, a autora observou que todos os tecidos apresentavam características bastante semelhantes, indicando atraso transitório.

## **2.2- Radiação ionizante e vitamina E**

O estudo de substâncias radioprotetoras, tem por finalidade diminuir os efeitos deletérios das radiações ionizantes a nível celular. A vitamina E, por ser uma substância pouco estudada como radioprotetora, principalmente na reparação tecidual, e os poucos estudos apresentam resultados bastante divergentes, foi a substância escolhida para a verificação de seu desempenho como radioprotetor na cicatrização de ferida induzida.

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

Segundo **MARCUS & COULSTON**, em **1996**, a vitamina E foi demonstrada pela primeira vez por **EVANS & BISHOP**, em **1922**, verificando que ratas fêmeas necessitavam de um princípio dietético com vitamina E 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 em testículos também foram observadas. Diante desses fatos a vitamina E foi denominada como “vitamina antiesterilidade”.

**EVANS et al**, em **1936**, isolaram a vitamina E a partir do óleo de germe de trigo. Oito tocoferóis de ocorrência natural com atividade de vitamina E são atualmente conhecidos. O alfa-tocoferol (5, 7, 8 – trimetilcolol) é considerado o mais importante, pois representa cerca de 90% dos tocoferóis em tecidos animais.

**LONDER & MYERS**, em **1952**, avaliaram a habilidade da vitamina E, em diminuir os radicais livres, protegendo contra o efeito de uma dose letal de radiação X corpo todo em ratos. Os animais foram divididos em 4 grupos: 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. e o terceiro grupo 90 U.I.. 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 rads por minuto. Os autores observaram que todos os animais do grupo controle morreram com dose total de 650 rads. 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 nos animais que receberam uma dose total de 550 rads 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.

**HOFFER & ROY**, em **1975**, investigaram 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 rads. Um grupo de 24 ratos foram mantidos com uma dieta pobre em vitamina E durante 43 dias e outro grupo de 24 animais com dieta normal. Após esse período de tempo, os animais receberam 500 rads de radiação X, com dose de 25 rads/minuto. Depois da irradiação os animais continuaram a receber suas respectivas dietas. Os animais foram sacrificados em vários tempos e seu sangue coletado. Um teste de hemólise espontânea foi utilizado para avaliar a fragilidade dos eritrócitos, verificando que os animais que tiveram falta de vitamina E em suas dietas tinham 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 submetidos à irradiação de 800 Rad de radiação gama do  $^{60}\text{Co}$ . 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 intraperitoneal de vitamina E (60 U.I. de dl – alfa – tocoferil), imediatamente após a irradiação. Os resultados mostraram que não houve diferença significativa entre os animais que tiveram dietas ricas em vitamina E antes da irradiação e subseqüentemente mantida com a mesma dieta e os animais que tiveram dietas deficientes em vitamina E antes e depois da irradiação. Foi verificado a queda da mortalidade nos grupos que se submeteram às injeções intraperitoneais imediatamente após a irradiação, tanto nos ratos mantidos com dieta rica ou quanto naqueles cuja dieta foi deficiente em vitamina E. Os autores sugerem que este decréscimo na mortalidade com as

injeções de vitamina E talvez esteja associado com o aumento da resposta imune ou com o aumento da recuperação da medula óssea.

No mesmo ano, **KAGERUD et al.** estudaram a influência do tocoferol, em doses intramusculares (5 mg / 100 g) nos efeitos da radiação X em dois tumores transplantados. Os autores verificaram que houve um aumento dos efeitos de regressão dos tumores irradiados associados com o tocoferol.

Em **1979, KONINGS & DRIJVER**, estudaram o efeito da radiação nas membranas lipídicas em ratos com deficiência de vitamina E. Foi utilizado 2 grupos de animais, no primeiro grupo, os animais receberam alimentação normal, enquanto os animais do segundo grupo 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 apresentaram-se mais sensíveis à irradiação, nos quais as membranas celulares tornaram-se mais vulneráveis à peroxidação lipídica.

**ROSTOCK et al.**, em **1980**, avaliaram altas dose de vitamina E como agente radioprotetor. Foi dividido 60 ratos em seis grupos, sendo que cada grupo recebeu radiação gama do  $^{60}\text{Co}$  com doses de 0 rad, 1500 rads, e 2000 rads. Trinta animais receberam 2.5% de vitamina E na dieta por duas semanas antes da irradiação e foi administrado uma dose única de 150 mg de vitamina E, por via intraperitoneal, 4 horas antes da irradiação, em cada animal. Os pesquisadores compararam as curvas histológicas dos pulmões e dos corações dos animais por 180 dias. Os autores observaram que não houve diferença significativa entre os

animais dos grupos que utilizaram a vitamina E no pré-tratamento e os dos grupos controles.

Neste mesmo ano, **KONINGS & OOSTERLOO**, compararam os efeitos da radiação X e de ozônio, com dose de 17 horas com concentração 0.9 e 1 Gy por minuto, respectivamente, na peroxidação lipídica e a relação dos antioxidantes presente nesse processo. Os autores afirmaram que a radiação de ozônio foi mais danosa, no que diz a respeito da peroxidação lipídica e que os antioxidantes diminuem significativamente esse 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  $^{60}\text{Co}$ . Os resultados obtidos mostraram que o succinato de dl- $\alpha$ -tocoferil aumentou o efeito da inibição 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**, **SHIRAIISHI et al.**, estudaram a peroxidação da membrana lipídica de células de ratos, induzida pela radiação X, e inibidores desse processo. As substância estudadas foram a cefarantine e alfa-tocoferol. Os autores

observaram que a vitamina E inibia fortemente a peroxidação das membranas pela irradiação. Entretanto, a cefarantine exibiu uma fraca inibição.

**TAREN et al.**, em **1986**, pesquisaram 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 para as injeções intraperitoneais. Os animais dos grupos A e B sofreram irradiações pré-operatórias, sendo que o grupo A não recebeu nenhuma substância, e o grupo B recebeu injeções de 0.2 ml de óleo sesame. Os ratos dos grupos C, D e E receberam as injeções, em 3 doses iguais em dias alternados, de 10, 20, e 40 UI de vitamina E, respectivamente, dissolvidos em 0.2 ml de óleo sesame. O grupo F foi o grupo controle não irradiado. No sétimo dia, os ratos dos grupos A, B, C, D, e E receberam, sob anestesia, uma dose de 600 rads utilizando um feixe de elétrons de 6 MeV, ao longo da linha média do dorso do animal, sendo que a área irradiada mediu 12.5 cm por 1.0 cm, e o restante do corpo do animal foi protegido por um avental de chumbo. Após duas horas desse procedimento, realizaram, sob anestesia, duas incisões de 5.0 cm, com 2.0 cm entre si. Após quatorze dias, os ratos foram sacrificados. Observou-se que a radiação reduziu significativamente a resistência à tensão das feridas cirúrgicas; 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 da resistência média à tensão das feridas para 95% 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  $^{60}\text{Co}$ , 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 rads 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. A irradiação ocorreu no dia seguinte. 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 resecção 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. O 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. Realizaram-se 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 & COULSTON**, em **1996**, afirmaram que uma das mais importantes características químicas dos tocoferóis é de que eles são antioxidante, impedindo a oxidação de constituintes essenciais, como a ubiquinona (coenzima Q), ou impede a formação de produtos tóxicos da oxidação, como os produtos de peroxidação formados a partir de ácidos graxos insaturados. Afirmam 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 antioxidante 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 injurias foram mensuradas pelo teste micronuclear nos eritrócitos da medula óssea e nas células da bexiga esfoliadas 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  $^{60}\text{Co}$ , 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 ocorreu 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 a associação destes compostos pode ser realizada não somente para remover os radicais livres mas também para aumentar a capacidade de reparo do DNA.

### **3- Proposição**

Propõe-se com este trabalho avaliar o efeito radioprotetor da vitamina E no processo de reparação tecidual, verificando:

- O desenvolvimento morfológico do tecido de granulação e as possíveis alterações ultra-estruturais na síntese de colágeno e das moléculas de glicosaminoglicanos no referido tecido.

## **4- Materiais e Métodos**

### **4.1 - Materiais**

Para a realização deste trabalho, foram utilizados 160 ratos machos (*Rattus Norvegicus, Albinus, Wistar*), com idade aproximada de 60 dias, pesando entre 200 a 250 gramas, procedentes do Biotério Central da UNICAMP. Todos os animais foram mantidos desde a fase pré-operatória até o sacrifício, em gaiolas apropriadas, com temperatura e umidade controladas, bem como, ração balanceada padrão e água *ad libitum*, diariamente.

Os procedimentos experimentais consistiram de 6 fases distintas:  
Fase 1: Terapêutica; Fase 2: Anestesia; Fase 3: Cirúrgica; Fase 4: Irradiação;

Fase 5: Obtenção das peças e Fase 6: Preparação das lâminas para microscopia óptica. Para a realização destas fases, foram utilizados os seguintes materiais:

### **Fase 1: Terapêutica**

- Solução injetável de acetato de dl – alfa – tocoferil;
- Óleo de oliva;
- Seringas hipodérmicas para insulina com agulhas intradérmicas;

### **Fase 2: Anestesia**

- Solução anestésica injetável de pentobarbital de sódio, Hypinol a 3%®, do Laboratório Fantoveter, divisão Cristália;
- Seringas hipodérmicas para insulina com agulhas intradérmicas;

### **Fase 3: Cirúrgica**

- Mesa cirúrgica, contendo tesoura reta de ponta fina, pinça reta, pinça dente de rato, cabo de bisturi, lâminas de bisturi nº 11 e gaze esterilizadas;
- Gabarito de plástico - retângulo de 2,5 cm x 1,5 cm;

### **Fase 4: Irradiação**

- Acelerador linear, modelo Mevatron 74, da Siemens;

- ➔ Lâmina de chumbo de 4 mm de espessura;

### **Fase 5: Obtenção das peças**

- ➔ Éter etílico P.A.;
- ➔ Solução de cloreto de sódio;
- ➔ Papel filtro;
- ➔ Recipientes de vidro para o armazenamento das peças;
- ➔ Fixador de Lillie;
- ➔ Campânula;

### **Fase 6: Preparação das lâminas para a microscopia óptica**

- ➔ Álcool 70%;
- ➔ Álcool absoluto;
- ➔ Xilol;
- ➔ Paraplasty Plus para inclusão;
- ➔ Micrótomo;
- ➔ Estufa;
- ➔ Hematoxilina – Eosina ;
- ➔ Picrosirius;
- ➔ Azul de toluidina pH 4;

## **4.2- Métodos**

A amostra foi dividida, de forma aleatória, em 8 grupos (**C**, **VE60**, **VE90**, **IRR**, **VE60IRR**, **VE90IRR**, **OOL** e **OLLIRR**). Cada animal foi identificado com uma marca código, utilizando-se um pincel atômico. Os animais do grupo **C** sofreram apenas a cirurgia. Na fase 1, os ratos do grupo **VE60** receberam 3 doses de injeções intraperitoneais de acetato de dl-alfa-tocoferil (vitamina E), com 60 U.I. em cada dose, dissolvidas em 1 ml de óleo de oliva, com intervalo de 48 horas e no sétimo dia foram submetidos à cirurgia. Os animais do grupo **VE90** diferenciaram-se em relação aos animais do grupo **VE60** apenas em relação à dose de vitamina E, nos quais foram administradas 90 U.I.. Os animais do grupo **IRR** não receberam tratamento prévio com vitamina E, porém 3 dias após a cirurgia, sofreram irradiação. Os animais do grupo **VE60IRR** foram também submetidos a 3 doses intraperitoneais de vitamina E com doses e procedimentos idênticos aos do grupo **VE60**, inclusive no que diz respeito à realização da cirurgia, porém, 3 dias após a cirurgia, as bordas de suas feridas foram irradiadas. Os ratos do grupo **VE90IRR** diferenciaram-se dos animais do grupo anterior pela dosagem de vitamina E, que foi de 90 U.I. cada injeção. Foram administrados nos animais do grupo **OOL** 3 injeções de 1 ml de óleo de oliva com intervalo de 48 horas e no sétimo dia foi realizada a ferida. Finalizando, os animais do grupo **OOLIRR** tiveram o mesmo tratamento dos animais do grupo **OOLIRR**, porém após 3 dias da cirurgia, tiveram as bordas de suas feridas irradiadas.

Para melhor entendimento dos grupos experimentais, segue-se abaixo a TAB. 1 onde estão resumidos os procedimentos realizados em cada grupo:

**TABELA 1**

Procedimentos realizados em cada grupo.

<b>Grupos</b>	<b>Procedimentos</b>
A	Ferida
B	Ferida + Vitamina E (3 doses de 60 U.I.)
C	Ferida + Vitamina E (3 doses de 90 U.I.)
D	Ferida + Irradiação
E	Ferida + Vitamina E (3 doses de 60 U.I.) + Irradiação
F	Ferida + Vitamina E (3 doses de 90 U.I.) + Irradiação
G	Ferida + óleo de oliva (3 doses de 1 ml)
H	Ferida + óleo de oliva + Irradiação (3 doses de 1 ml)

Para todos os grupos estudados, o tempo transcorrido, da cirurgia à obtenção das peças foram de 4, 7, 14 e 21 dias.

Na fase 2, os animais foram anestesiados por injeção intraperitoneal de pentobarbital de sódio, com dose de 40 mg/Kg de peso corpóreo. A tricotomia foi realizada em uma grande área da região dorsal, manualmente, a fim de evitar-se a irritação química e mecânica na pele dos animais.

Na fase 3, para a produção da ferida foram realizadas quatro incisões, que unidas entre si, possibilitavam uma retirada de tecido dérmico de 2,5 cm x 1,5 cm na região dorsal anterior de cada animal, com distância de aproximadamente 10mm à direita da espinha dorsal. As incisões de maiores extensões, foram feitas paralelas a esta. A profundidade de cada incisão atingiu aproximadamente 2mm, tendo como base da ferida o tecido muscular e a presença da derme e epiderme nas bordas da mesma. As feridas foram realizadas sempre na mesma região, para promover uniformidade da amostra.

Após 3 dias do procedimento cirúrgico foi dado início à fase 4, a de irradiação. Os animais foram protegidos, de forma que ficasse somente exposta uma área ao redor das bordas da ferida de 10mm, sendo a ferida também protegida, com uma lâmina de chumbo de 4,0 mm de espessura. A irradiação foi realizada com um feixe de elétrons, com distância alvo-fonte de 100 cm; com dose única de 6 Gy, que se manteve com a mesma intensidade até 10 mm de profundidade.

Após o tempo previamente estabelecido para a reparação tecidual, os animais foram sacrificados com éter etílico, para a remoção das peças (fase 5). Cada peça cirúrgica era constituída por uma porção de tecido, contendo a ferida ou cicatriz no centro, circundada por tecido normal. As incisões para a retirada dessas peças, foram realizadas sempre na mesma profundidade daquelas produzidas na confecção das feridas. Após removidas, as peças foram devidamente lavadas com solução fisiológica, secas em papel absorvente e

mantidas em recipiente com solução fixadora de Lillie até à inclusão. Nesta solução, as peças permaneceram no mínimo 72 horas.

Na fase 6, as peças fixadas foram incluídas em Paraplasty Plus, segundo a técnica de rotina do Laboratório de Histologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba – UNICAMP, e levadas ao micrótomo, no qual se obteve cortes de 7µm de espessura. Uma vez montadas as lâminas, os cortes foram divididos em 3 lotes, para os seguintes procedimentos:

#### **α- Coloração por Hematoxilina - Eosina (HE):**

Com esta coloração foram observadas as características histológicas da maturação do tecido, desde o período inicial (4º dia) até o final (21º dia). Avaliou-se, também, a dimensão das feridas e a presença do infiltrado inflamatório. Nos períodos subsequentes, foi observado o padrão de fechamento (epitelização) das feridas nos vários tratamentos e com a evolução da reparação, a morfologia do tecido de granulação e a maturação das fibras colágenas.

**b- Exame da birrefringência por meio da coloração de Picrosirius:**

O segundo lote de lâminas foi submetido ao exame da birrefringência por meio da coloração de Picrosirius. A técnica de coloração foi realizada de acordo com a rotina de laboratório, onde esta permitiu avaliar, qualitativamente e quantitativamente, a birrefringência intrínseca (própria) dos feixes de colágeno, em microscopia de polarização.

**c- Reação histoquímica do azul de toluidina:**

O último lote de lâminas foi submetido à reação histoquímica de metacromasia com azul de toluidina pH 4, em concentração de 0,025% de acordo com a técnica de **LISON (1960)**. Esta técnica permite a observação das moléculas de glicosaminoglicanas que reagem com o azul de toluidina.

**Avaliação histométrica da birrefringência de fibras colágenas**

Para a avaliação quantitativa do desenvolvimento dos feixes de fibras colágenas, utilizou-se o microscópio óptico de polarização (Zeiss Axiolab – ZEISS – Alemanha) com lente objetiva em aumento de 40X e com uma microcâmera (Microcâmera Sony CCD IRIS / RGB COLOR – Japão) acoplada ao microscópio sendo esta responsável pela digitalização das imagens histológicas

transmitidas para o computador. Para cada animal foram avaliadas 3 lâminas, em cada período de todos os grupos, sendo que em cada lâmina corada com Picrosirius, havia 2 cortes transversais da ferida.

Com auxílio de um programa analisador de imagens histológicas (KS 400 2.0 – Kontron Electronics, Munique, Alemanha) foram realizadas 5 medidas de áreas (em pixels<sup>2</sup>), escolhidas aleatoriamente, dos feixes que apresentavam birrefringência em cada lâmina. Essas medidas foram obtidas por meio da diferença de coloração detectada pelo programa analisador, onde as medidas foram realizadas no tecido de granulação logo abaixo do epitélio em proliferação (nos períodos de 4 e 7 dias) e abaixo do epitélio imaturo (nos períodos mais avançados – 14 e 21 dias), sempre evitando áreas de tecido adiposo. A partir da execução das medidas, obteve-se a média em cada tratamento pela análise estatística.

## **5- Resultados**

Neste capítulo serão descritos os resultados obtidos pelas análises microscópicas do material coletado.

### **1- Descrição morfológica: Coloração por Hematoxilina-Eosina**

Para que a leitura não se torne exaustiva, optou-se em unir as descrições dos grupos que apresentam características semelhantes

**4º dia de reparação tecidual**

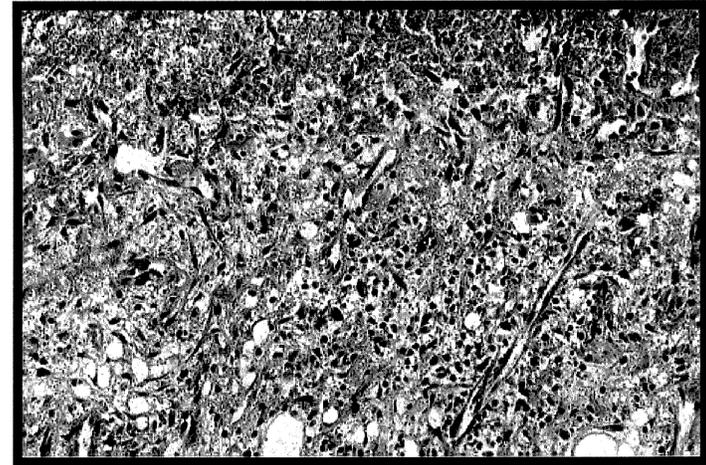
*GRUPOS C, VE60, VE90, VE60IRR e VE90IRR-* A área da ferida, que apresentava-se extensa, encontrava-se coberta por uma crosta de material necrótico que serve como proteção para o tecido de granulação incipiente, tendo como célula inflamatória predominante o linfócito. Este tecido de granulação apresentava-se com poucos fibroblastos, muitas células redondas, início de néo formação vascular e com formação de fibras incipientes, sendo que nos grupos **VE60** e **VE90** este tecido apresentava, aparentemente, um processo de reparo mais adiantado do que os demais grupos. (FIG. 1, 1a, 2, 2a, 3, 3a, 5, 5a, 6 e 6a).

*GRUPOS IRR, OOL e OOLIRR-* A área da ferida nos animais destes grupos apresentava-se mais extensa que nos grupos citados anteriormente, bem como a espessura da crosta. O tecido de granulação ainda estava ausente em várias regiões da ferida e nas regiões que estava presente, a quantidade de células e fibras também era menor do que nos grupos supra citados, sugerindo um tecido altamente desorganizado (FIG. 4, 4a, 7, 7a, 8 e 8a).

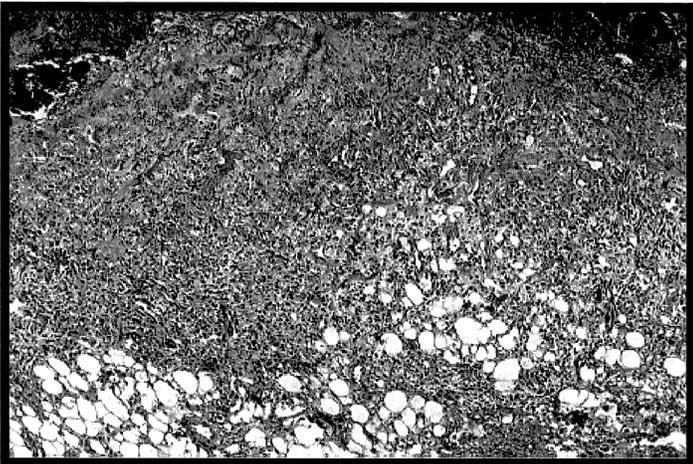
## Coloração por Hematoxilina-Eosina - 4º Dia



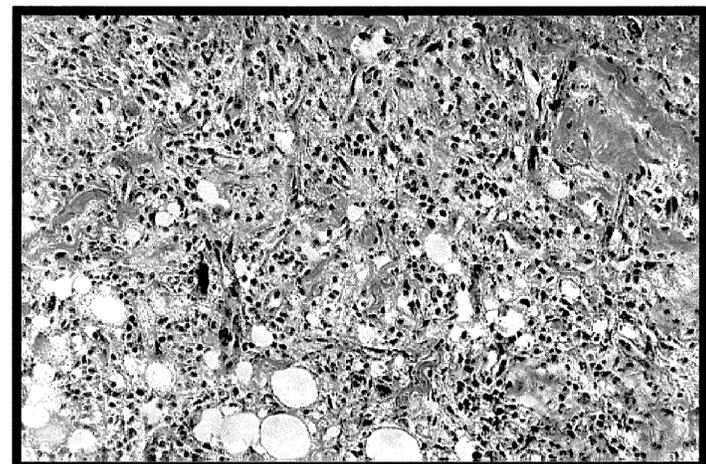
**FIGURA 1-** Grupo A - Ferida  
Aumento original 6.3 x 1.25 x 10



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



**FIGURA 2-** Grupo B - Ferida + Vit. E (3-60UI)  
Aumento original 6.3 x 1.25 x 10

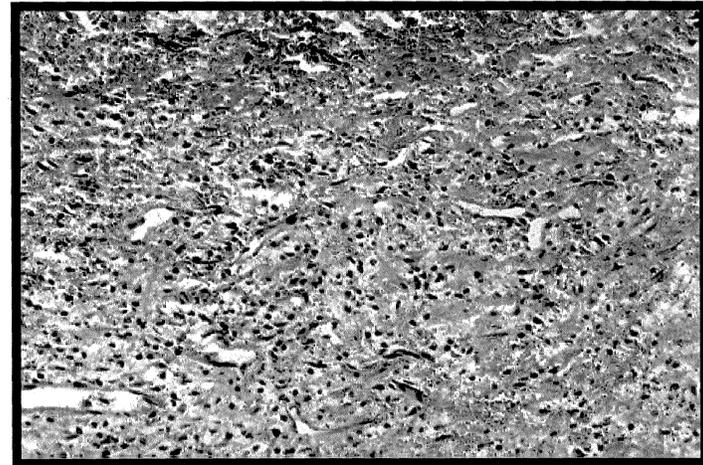


**FIGURA 2a-** Grupo B - Ferida + Vit. E (3-60UI)  
Aumento original 16 x 1.25 x 10

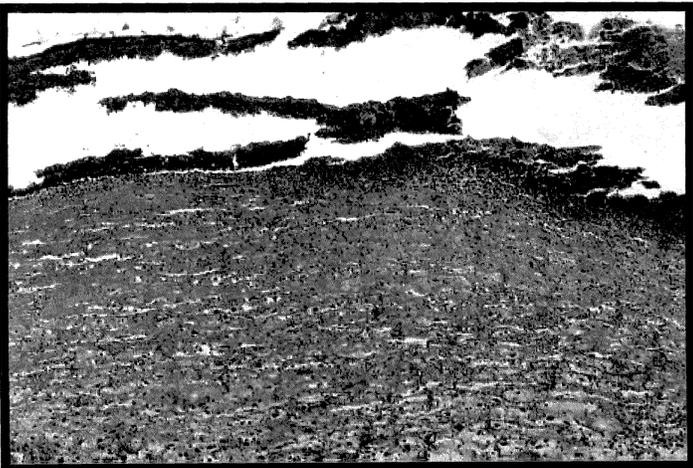
## Coloração por Hematoxilina-Eosina - 4º Dia



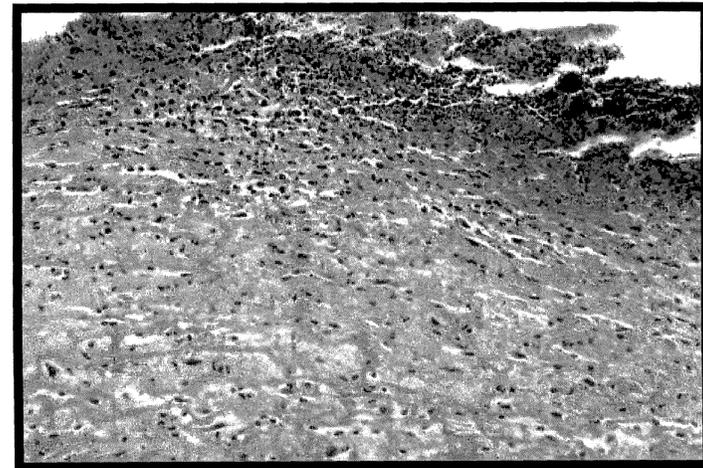
**FIGURA 3-** Grupo C – Ferida + Vit. E (3-90UI)  
Aumento original 6.3 x 1.25 x 10



**FIGURA 3a-** Grupo C – Ferida + Vit. E (3-90UI)  
Aumento original 16 x 1.25 x 10

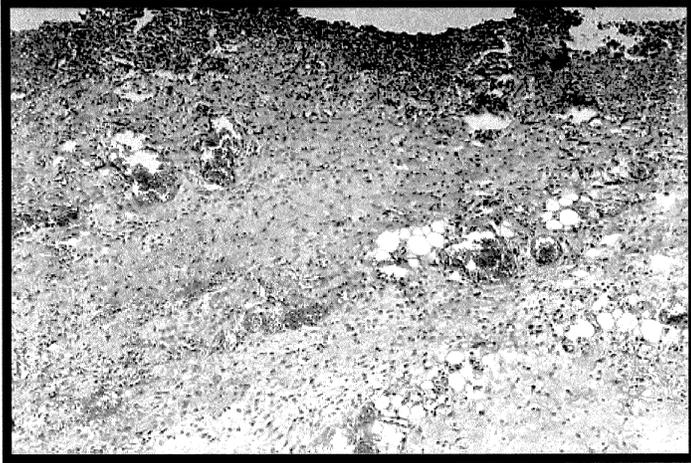


**FIGURA 4-** Grupo D - Ferida + Irradiação  
Aumento original 6.3 x 1.25 x 10



**FIGURA 4a-** Grupo D - Ferida + Irradiação  
Aumento original 16 x 1.25 x 10

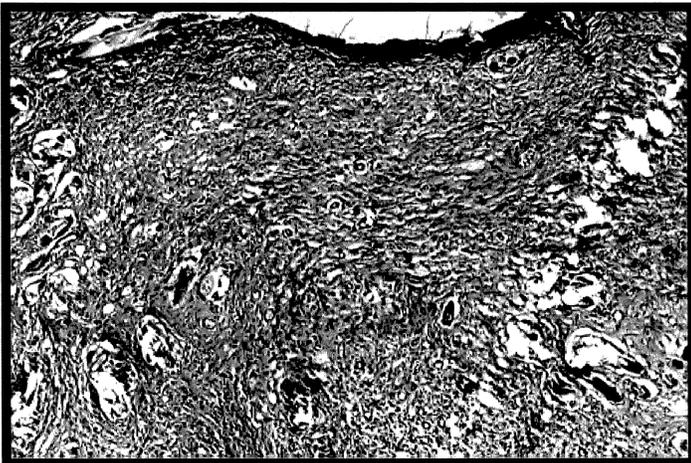
## Coloração por Hematoxilina-Eosina - 4º Dia



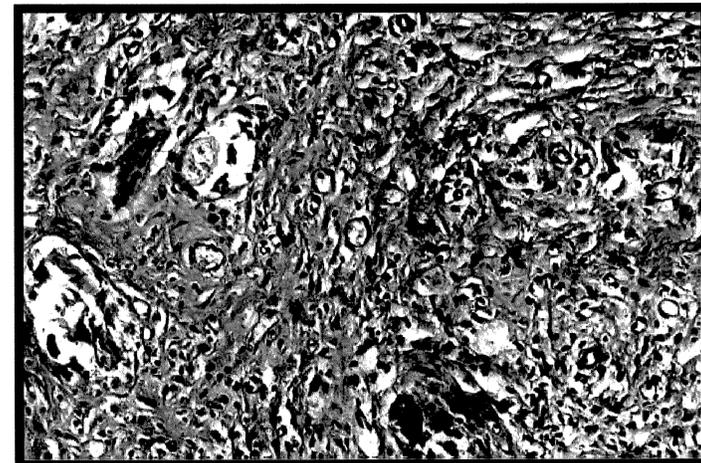
**FIGURA 5-** Grupo E – Ferida + Vit. E (3-60UI) + Irrad.  
Aumento original 6.3 x 1.25 x 10



**FIGURA 5a-** Grupo E – Ferida + Vit. E (3-60UI) + Irrad.  
Aumento original 16 x 1.25 x 10

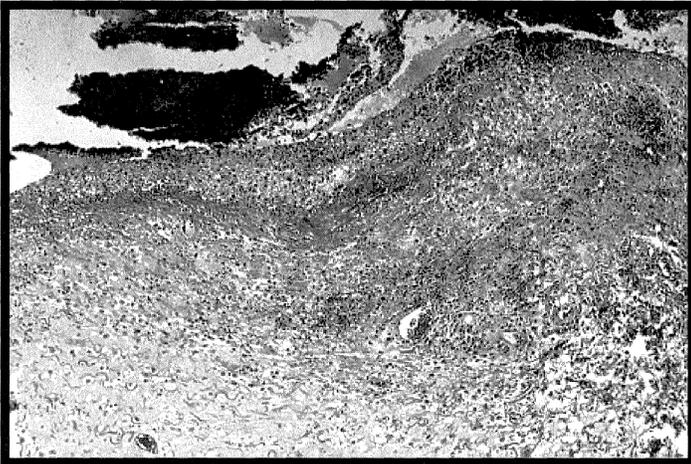


**FIGURA 6-** Grupo F - Ferida + Vit. E (3-90UI) + Irrad.  
Aumento original 6.3 x 1.25 x 10

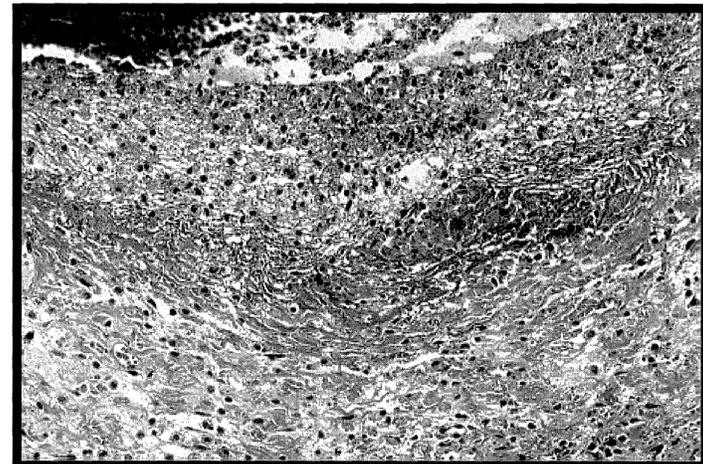


**FIGURA 6a-** Grupo F - Ferida + Vit. E (3-90UI) + Irrad.  
Aumento original 16 x 1.25 x 10

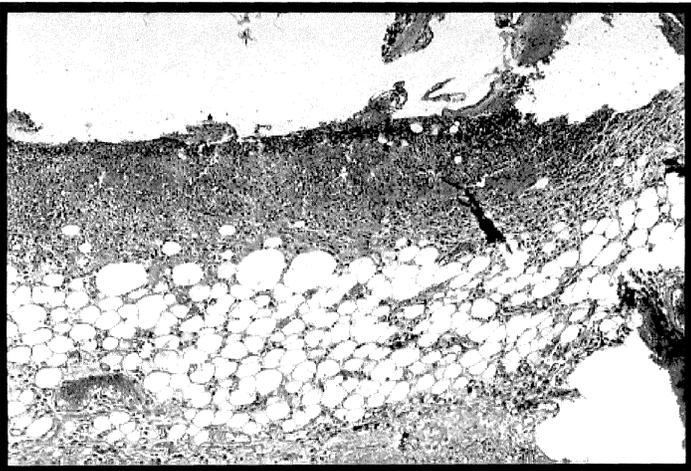
## Coloração por Hematoxilina-Eosina - 4º Dia



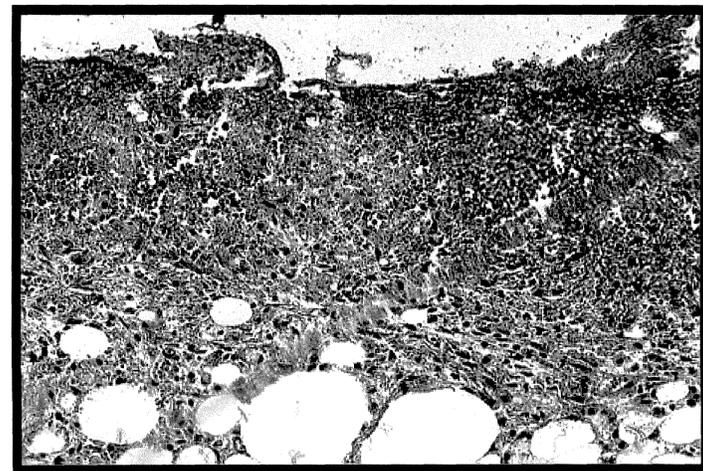
**FIGURA 7-** Grupo G – Ferida+ Óleo (3-1ml)  
Aumento original 6.3 x 1.25 x 10



**FIGURA 7a-** Grupo G – Ferida + Óleo (3-1ml)  
Aumento original 16 x 1.25 x 10



**FIGURA 8-** Grupo H - Ferida + Óleo (3-1ml)+ Irrad.  
Aumento original 6.3 x 1.25 x 10



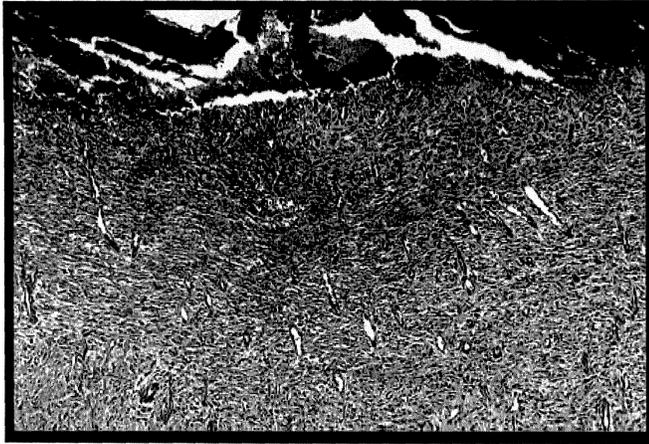
**FIGURA 8a-** Grupo H - Ferida + Óleo (3-1ml)+ Irrad.  
Aumento original 16 x 1.25 x 10

7º dia de reparação tecidual

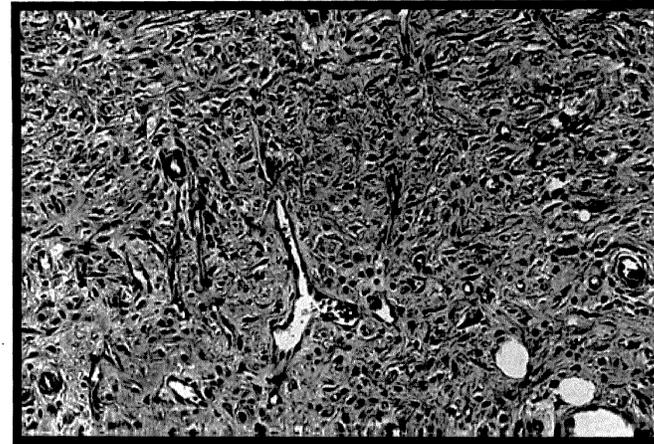
**GRUPOS C, VE60, VE90, VE60IRR e VE90IRR** - Observou-se que a área da ferida teve uma redução, apresentando-se ainda recoberta pela crosta superficial, porém sem a presença de tecido necrótico abaixo desta crosta. A ferida apresentava-se com tecido de granulação típico, ou seja, vasos neo formados organizados, grande número de fibroblastos e presença de fibras, com diminuição das células redondas. O tecido de granulação dos grupos **VE60** e **VE90** apresentava-se mais organizado. O epitélio ainda se encontrava ausente (FIG. 9, 9a, 10, 10a, 11, 11a, 13, 13a, 14 e 14a).

**GRUPOS IRR, OOL e OOLIRR**- A área da ferida também encontrava-se reduzida mas apresentava-se mais extensa quando comparada com a área dos grupos acima citados. Como nos grupos supracitados, a crosta ainda encontrava-se presente e o tecido necrótico abaixo desta também estava ausente. O tecido de granulação apresentava-se com neo formação vascular, entretanto, com menor número de vasos. Foi observado grande número de fibroblastos, com o tecido apresentando poucas fibras e as células redondas ainda em grande número. O epitélio também encontrava-se ausente nesta fase da reparação tecidual (FIG. 12, 12a, 15, 15a, 16 e 16a).

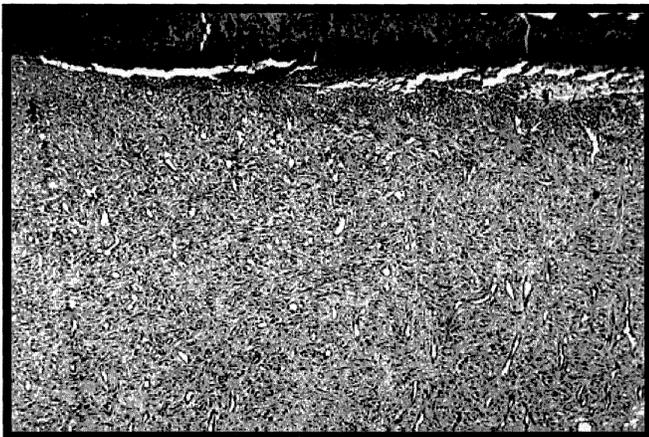
## Coloração por Hematoxilina-Eosina - 7º Dia



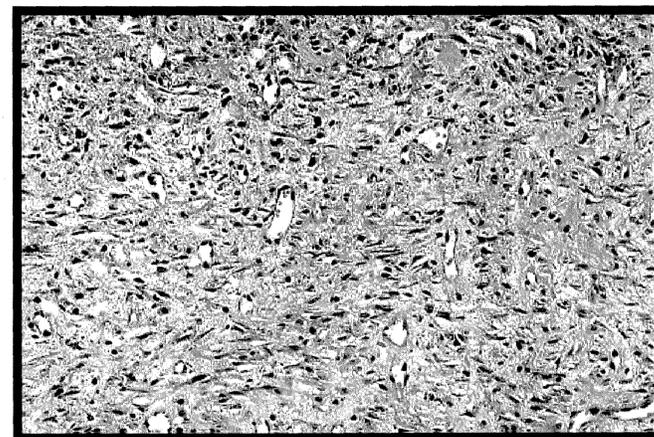
**FIGURA 9-** Grupo A - Ferida  
Aumento original 6.3 x 1.25 x 10



**FIGURA 9a-** Grupo A - Ferida  
Aumento original 16 x 1.25 x 10

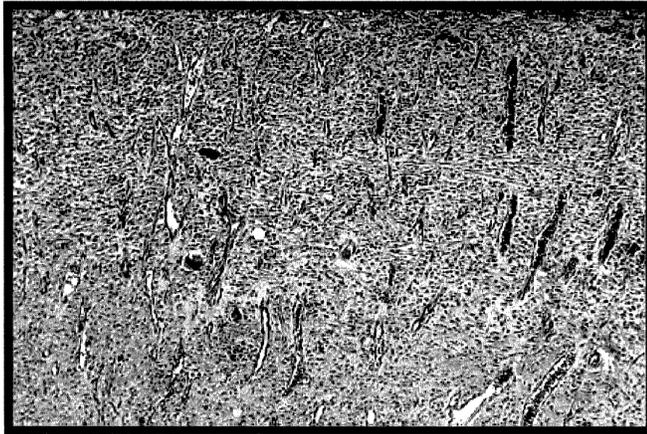


**FIGURA 10-** Grupo B - Ferida + Vit. E (3-60UI)  
Aumento original 6.3 x 1.25 x 10



**FIGURA 10a-** Grupo B - Ferida + Vit. E (3-60UI)  
Aumento original 16 x 1.25 x 10

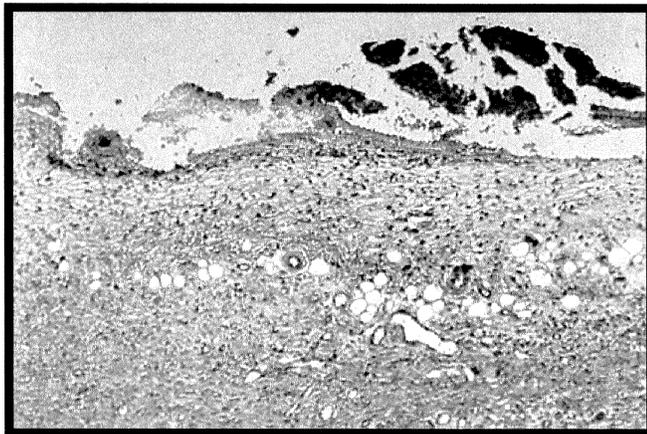
## Coloração por Hematoxilina-Eosina - 7º Dia



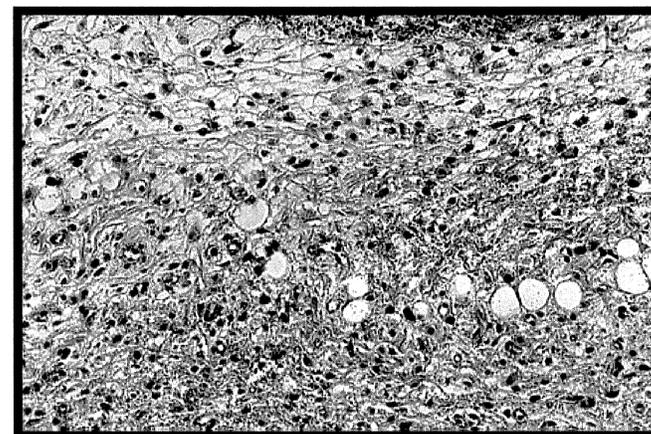
**FIGURA 11-** Grupo C – Ferida + Vit. E (3-90UI)  
Aumento original 6.3 x 1.25 x 10



**FIGURA 11a-** Grupo C – Ferida + Vit. E (3-90UI)  
Aumento original 16 x 1.25 x 10

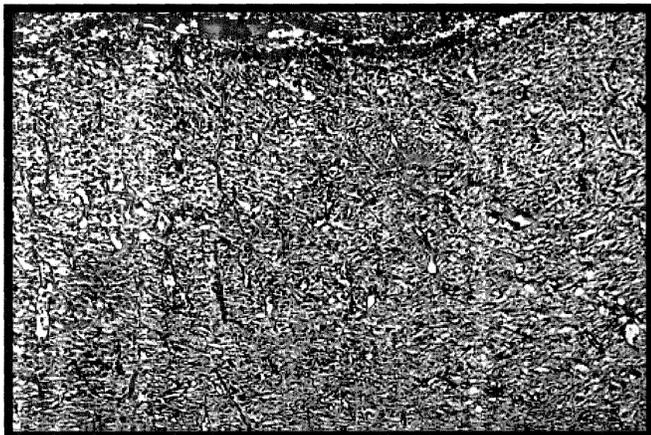


**FIGURA 12-** Grupo D - Ferida + Irradiação  
Aumento original 6.3 x 1.25 x 10



**FIGURA 12a-** Grupo D - Ferida + Irradiação  
Aumento original 16 x 1.25 x 10

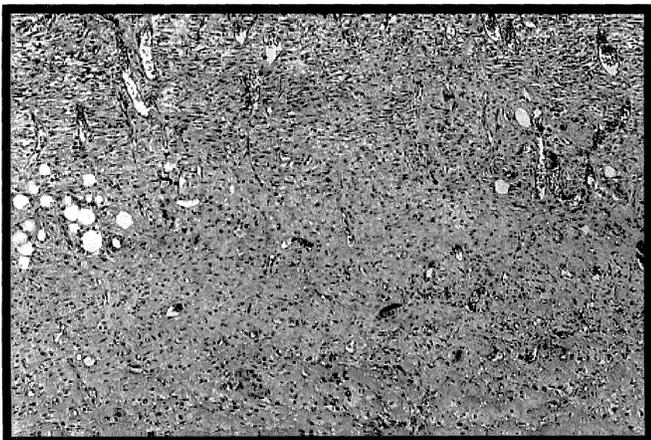
## Coloração por Hematoxilina-Eosina - 7º Dia



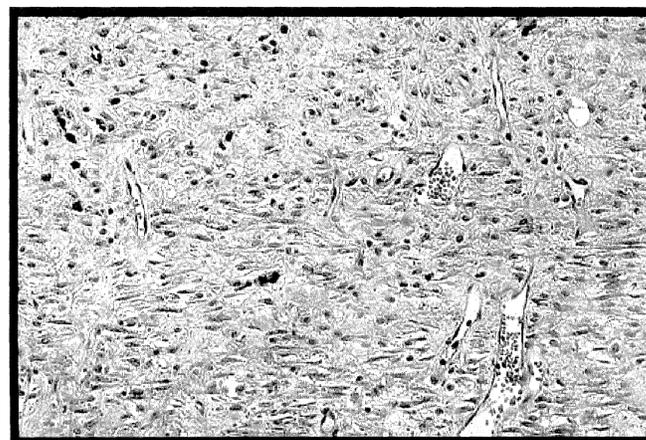
**FIGURA 13-** Grupo E – Ferida + Vit. E (3-60UI) + Irrad.  
Aumento original 6.3 x 1.25 x 10



**FIGURA 13a-** Grupo E – Ferida + Vit. E (3 -60UI) + Irrad.  
Aumento original 16 x 1.25 x 10



**FIGURA 14-** Grupo F - Ferida + Vit. E (3-90UI) + Irrad.  
Aumento original 6.3 x 1.25 x 10

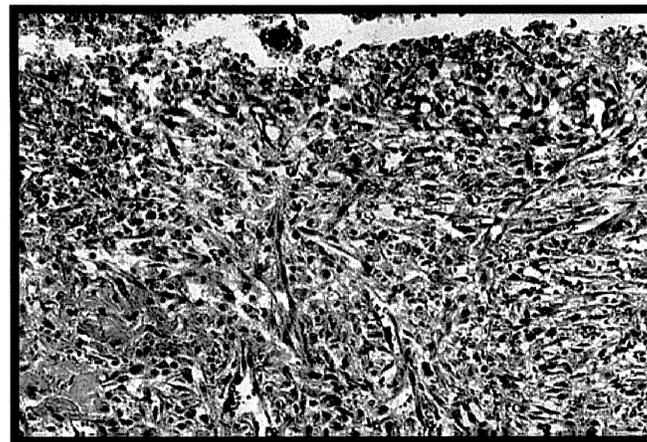


**FIGURA 14a-** Grupo F - Ferida + Vit. E (3-90UI) + Irrad.  
Aumento original 16 x 1.25 x 10

## Coloração por Hematoxilina-Eosina - 7º Dia



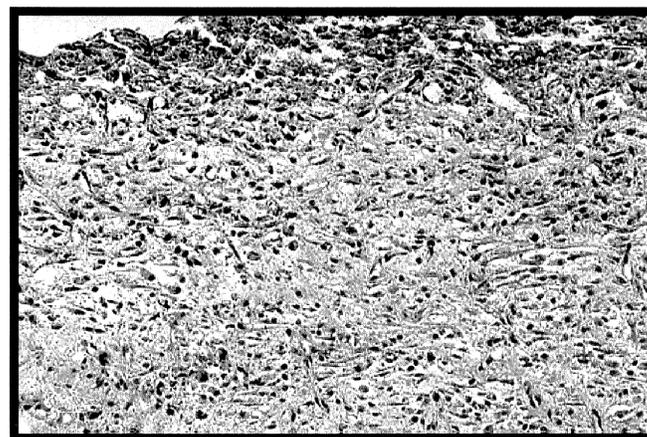
**FIGURA 15-** Grupo G – Ferida+ Óleo (3-1ml)  
Aumento original 6.3 x 1.25 x 10



**FIGURA 15a-** Grupo G – Ferida + Óleo (3-1ml)  
Aumento original 16 x 1.25 x 10



**FIGURA 16-** Grupo H - Ferida + Óleo (3-1ml) + Irrad.  
Aumento original 6.3 x 1.25 x 10



**FIGURA 16a-** Grupo H - Ferida + Óleo (3-1ml) + Irrad.  
Aumento original 16 x 1.25 x 10

**14° dia de reparação tecidual**

**GRUPOS C, VE60, VE90, VE60IRR e VE90IRR** - A ferida encontrava-se bastante contraída e a crosta não estava mais presente. O tecido de granulação se apresentava maduro, onde havia grande quantidade de fibras colágenas em forma de feixes, vasos sanguíneos funcionais e diminuição no número de fibroblastos. O epitélio estava presente recobrando toda a ferida, apresentando-se espesso e com criptas com grandes projeções para o tecido conjuntivo, porém nos grupos **VE60** e **VE90** este epitélio apresentava-se mais delgado (FIG. 17, 17a, 18, 18a, 19, 19a, 21, 21a, 22 e 22a).

**GRUPO OOL** - O tamanho da ferida estava semelhante ao dos grupos citados anteriormente, porém com resquícios de crosta. No que se refere ao tecido de granulação, este apresentava-se bastante celular, ou seja, o número de fibroblastos ainda era elevado, quando comparado aos outros grupos. A formação do epitélio também se encontrava atrasada, visto que este iniciava sua migração (FIG. 23 e 23a).

**GRUPO IRR** - O tamanho da ferida ainda encontrava-se grande, e já não apresentava a crosta. O tecido de granulação apresentava-se mais atrasado em relação aos grupos anteriormente citados, ou seja, mais celular e

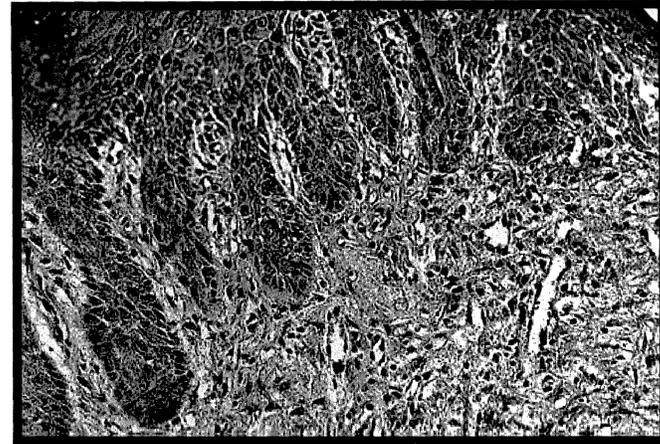
menos fibroso, embora os vasos sanguíneos já indicassem funcionamento. O epitélio já recobria toda a ferida (FIG. 20 e 20a).

*GRUPO OOLIRR* - Este foi o grupo que apresentava o processo de reparo mais atrasado, pois a ferida apresentava-se extensa e o epitélio ainda ausente. O tecido de granulação se mostrava bastante semelhante a do grupo D, ou seja, poucas fibras colágenas e muitos fibroblastos (FIG. 24 e 24a).

## Coloração por Hematoxilina-Eosina - 14º Dia



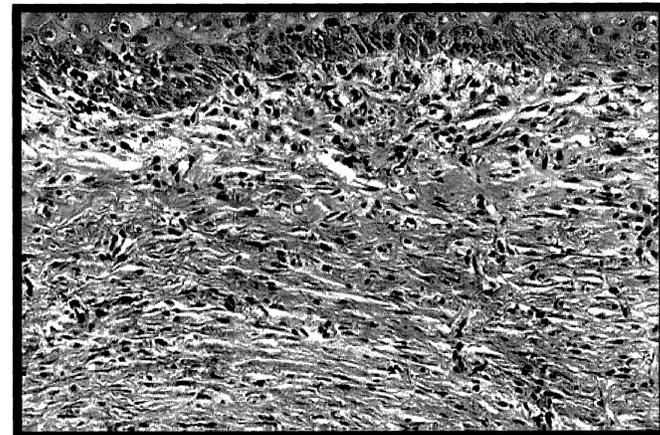
**FIGURA 17-** Grupo A - Ferida  
Aumento original 6.3 x 1.25 x 10



**FIGURA 17a-** Grupo A - Ferida  
Aumento original 16 x 1.25 x 10

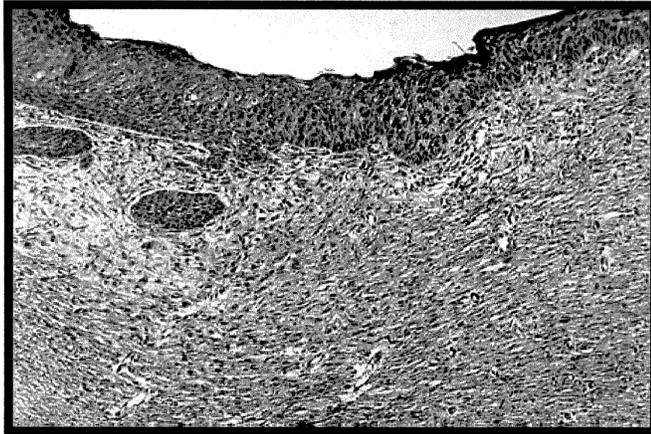


**FIGURA 18-** Grupo B - Ferida + Vit. E (3-60UI)  
Aumento original 6.3 x 1.25 x 10

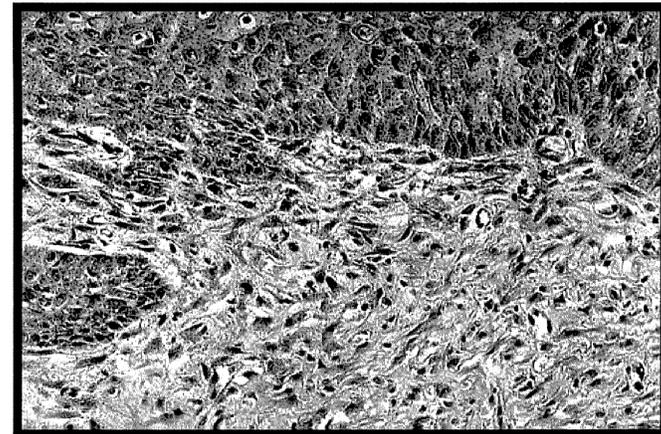


**FIGURA 18a-** Grupo B - Ferida + Vit. E (3-60UI)  
Aumento original 16 x 1.25 x 10

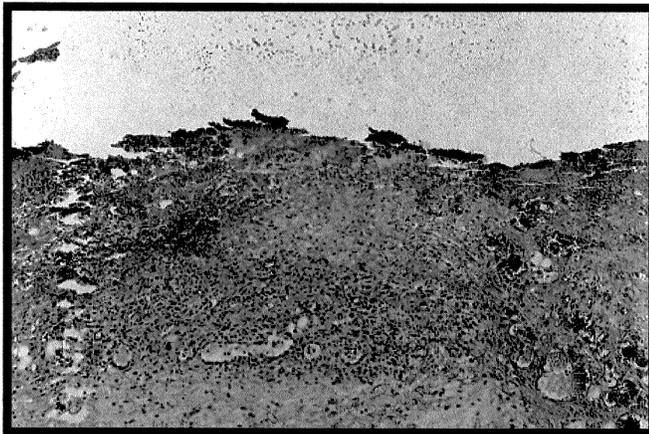
## Coloração por Hematoxilina-Eosina - 14º Dia



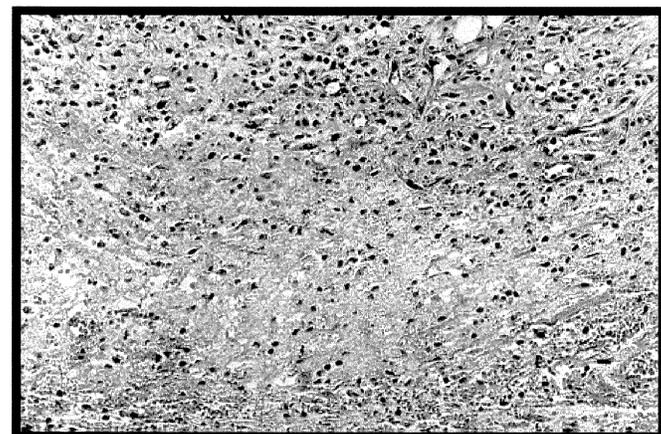
**FIGURA 19-** Grupo C – Ferida + Vit. E (3-90UI)  
Aumento original 6.3 x 1.25 x 10



**FIGURA 19a-** Grupo C – Ferida + Vit. E (3-90UI)  
Aumento original 16 x 1.25 x 10

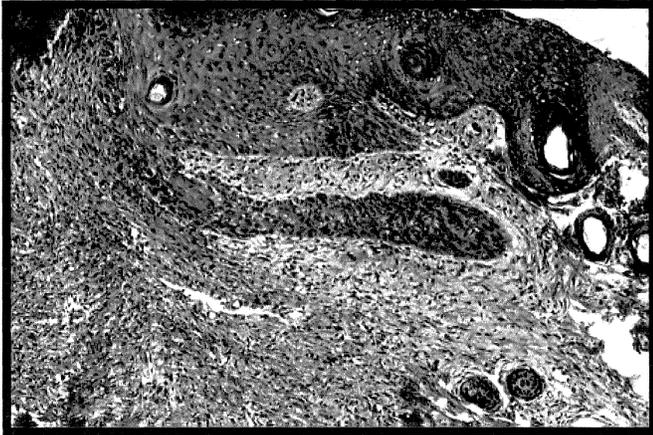


**FIGURA 20-** Grupo D - Ferida + Irradiação  
Aumento original 6.3 x 1.25 x 10

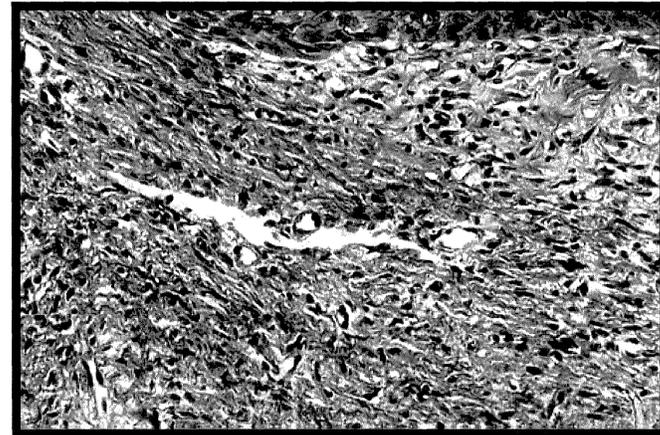


**FIGURA 20a-** Grupo D - Ferida + Irradiação  
Aumento original 16 x 1.25 x 10

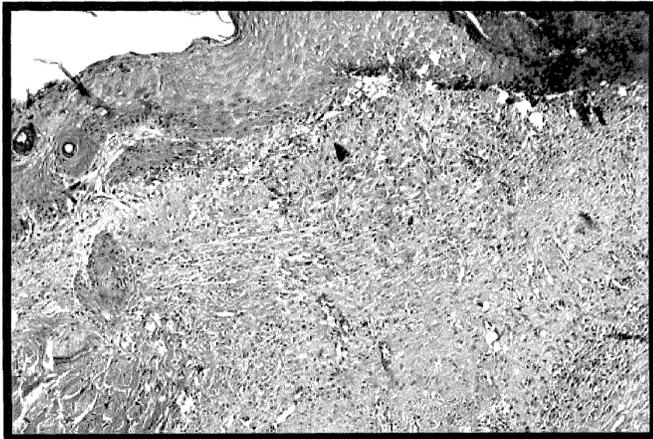
## Coloração por Hematoxilina-Eosina - 14° Dia



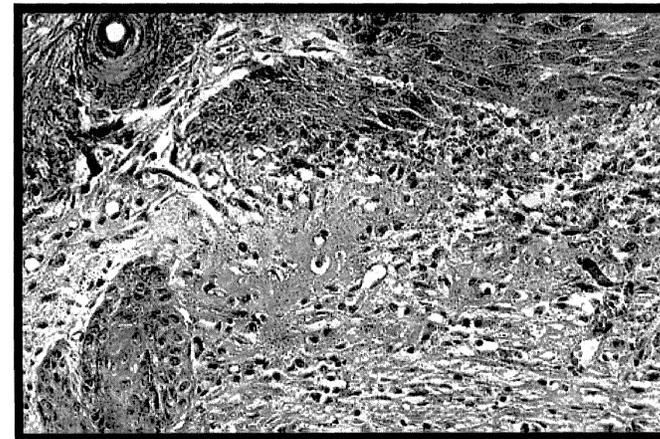
**FIGURA 21-** Grupo E – Ferida + Vit. E (3-60UI) + Irrad.  
Aumento original 6.3 x 1.25 x 10



**FIGURA 21a-** Grupo E – Ferida + Vit. E (3-60UI) + Irrad.  
Aumento original 16 x 1.25 x 10



**FIGURA 22-** Grupo F - Ferida + Vit. E (3-90UI) + Irrad.  
Aumento original 6.3 x 1.25 x 10



**FIGURA 22a-** Grupo F - Ferida + Vit. E (3-90UI) + Irrad.  
Aumento original 16 x 1.25 x 10

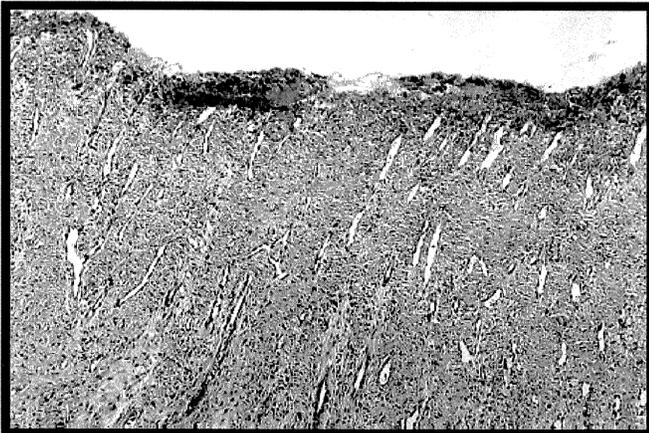
## Coloração por Hematoxilina-Eosina - 14º Dia



**FIGURA 23-** Grupo G – Ferida+ Óleo (3-1ml)  
Aumento original 6.3 x 1.25 x 10



**FIGURA 23A-** Grupo G – Ferida + Óleo (3-1ml)  
Aumento original 16 x 1.25 x 10



**FIGURA 24-** Grupo H - Ferida + Óleo (3-1ml) + Irrad.  
Aumento original 6.3 x 1.25 x 10



**FIGURA 24A-** Grupo H - Ferida + Óleo (3-1ml) + Irrad.  
Aumento original 16 x 1.25 x 10

21º dia de reparação tecidual

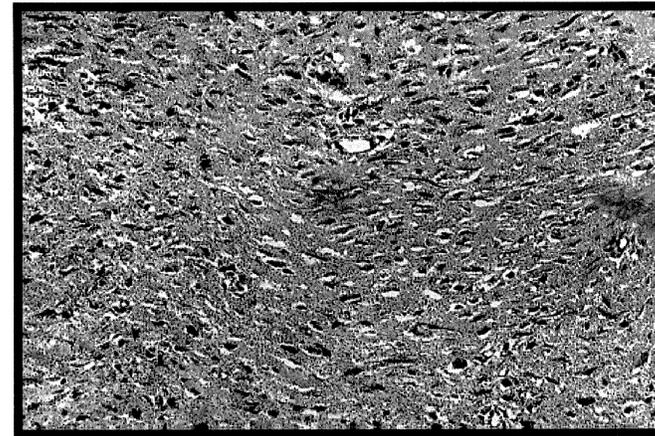
*GRUPOS C, VE60, VE90, VE60IRR e VE90IRR* O epitélio, que recobre toda a ferida, encontrava-se maduro, ou seja, pouco espesso, sem grandes projeções de criptas para o tecido conjuntivo adjacente, mostrando-se queratinizado. Pode-se observar alguns anexos da pele, como glândulas sebáceas e folículos pilosos. O tecido apresentava-se fibroso, com um grande número de feixes de fibras colágenas e poucos fibroblastos. Pode-se afirmar que este tecido, com tais características, é uma cicatriz (FIG. 25, 25a, 26, 26a, 27, 27a, 29, 29a, 30 e 30a).

*GRUPOS IRR, OOL e OOLIRR* - As feridas apresentavam-se menos contraídas que nos grupos já citados. O epitélio já recobria toda a ferida, mas não apresenta-se maduro, pois não são observados anexos da pele e apresentando-se pouco queratinizado. O tecido de granulação também mostrava-se maduro, porém mais celular e menos fibroso, quando comparado com os demais grupos. (FIG. 28, 28a, 31, 31a, 32 e 32a).

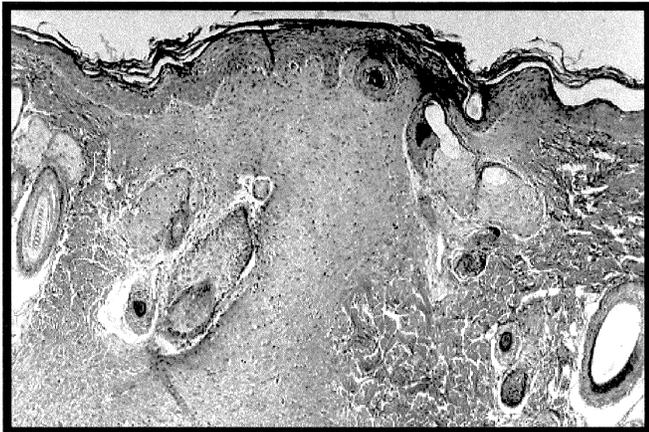
## Coloração por Hematoxilina-Eosina - 21º Dia



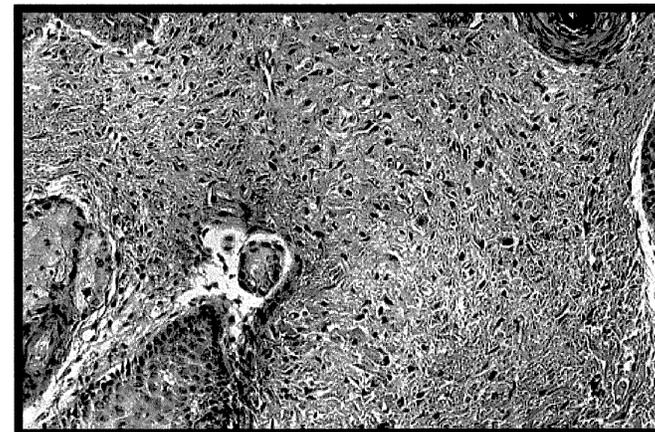
**FIGURA 25-** Grupo A - Ferida  
Aumento original 6.3 x 1.25 x 10



**FIGURA 25a-** Grupo A - Ferida  
Aumento original 16 x 1.25 x 10

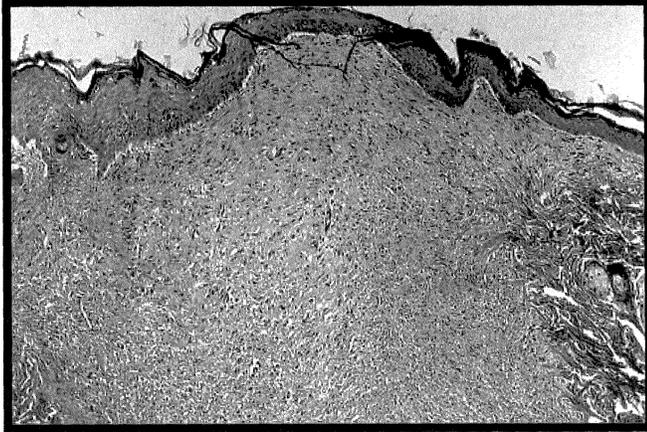


**FIGURA 26-** Grupo B - Ferida + Vit. E (3-60UI)  
Aumento original 6.3 x 1.25 x 10

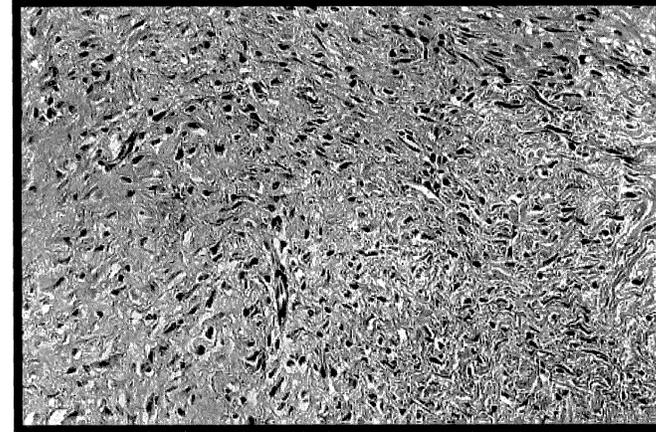


**FIGURA 26a-** Grupo B - Ferida + Vit. E (3-60UI)  
Aumento original 16 x 1.25 x 10

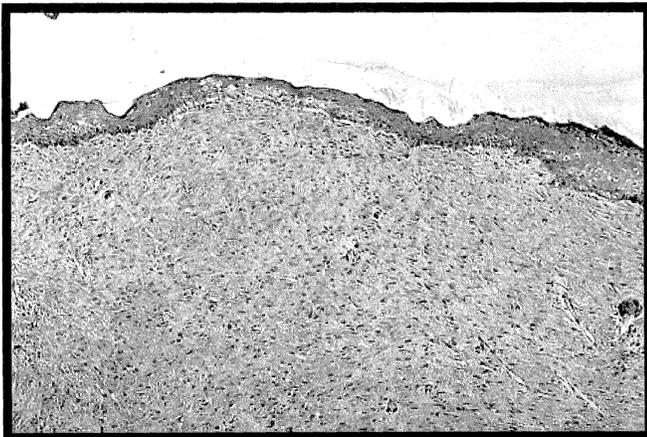
## Coloração por Hematoxilina-Eosina - 21º Dia



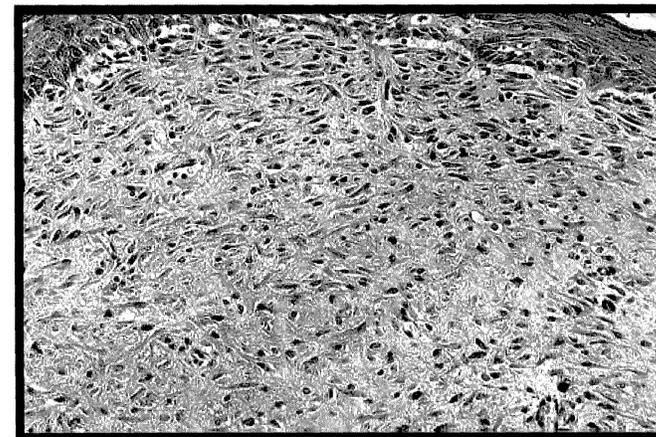
**FIGURA 27-** Grupo C – Ferida + Vit. E (3-90UI)  
Aumento original 6.3 x 1.25 x 10



**FIGURA 27a-** Grupo C – Ferida + Vit. E (3-90UI)  
Aumento original 16 x 1.25 x 10



**FIGURA 28-** Grupo D - Ferida + Irradiação  
Aumento original 6.3 x 1.25 x 10

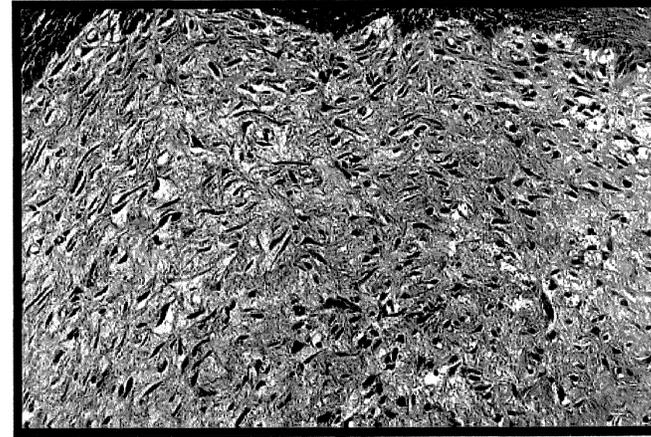


**FIGURA 28a-** Grupo D - Ferida + Irradiação  
Aumento original 16 x 1.25 x 10

## Coloração por Hematoxilina-Eosina - 21º Dia



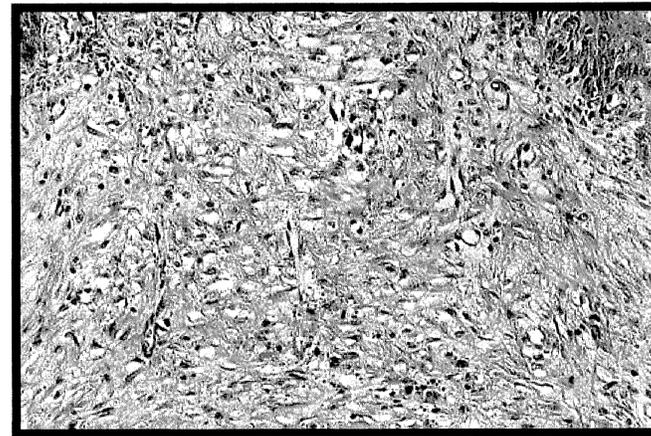
**FIGURA 29-** Grupo E – Ferida + Vit. E (3-60UI) + Irrad.  
Aumento original 6.3 x 1.25 x 10



**FIGURA 29a-** Grupo E – Ferida + Vit. E (3-60UI) + Irrad.  
Aumento original 16 x 1.25 x 10



**FIGURA 30-** Grupo F - Ferida + Vit. E (3-90UI) + Irrad.  
Aumento original 6.3 x 1.25 x 10

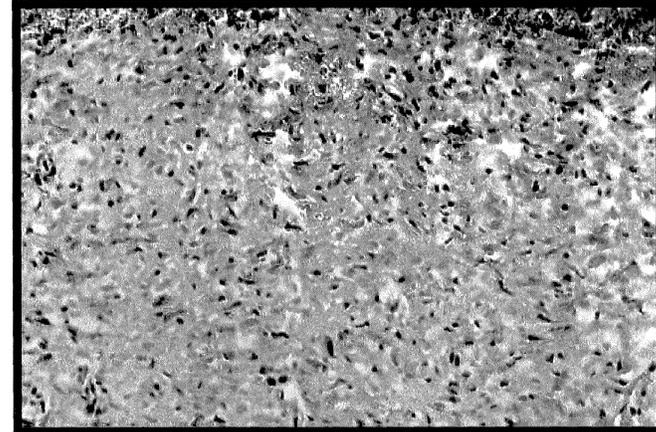


**FIGURA 30a-** Grupo F - Ferida + Vit. E (3-90UI) + Irrad.  
Aumento original 16 x 1.25 x 10

## Coloração por Hematoxilina-Eosina - 21º Dia



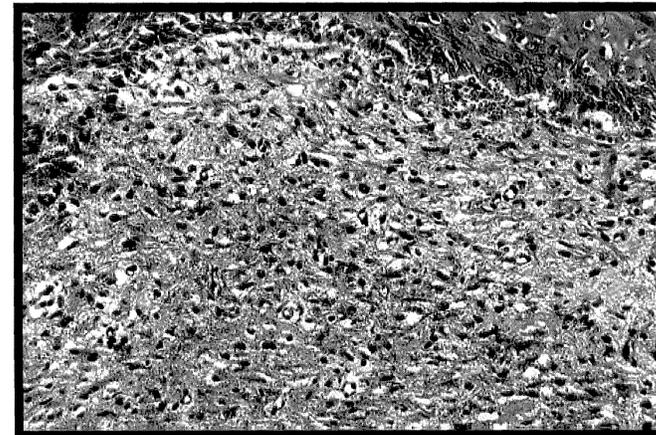
**FIGURA 31-** Grupo G – Ferida+ Óleo (3-1ml)  
Aumento original 6.3 x 1.25 x 10



**FIGURA 31a-** Grupo G – Ferida + Óleo (3-1ml)  
Aumento original 16 x 1.25 x 10



**FIGURA 32-** Grupo H - Ferida + Óleo (3-1ml) + Irrad.  
Aumento original 6.3 x 1.25 x 10



**FIGURA 32a-** Grupo H - Ferida + Óleo (3-1ml) + Irrad.  
Aumento original 16 x 1.25 x 10

## **2- Avaliação qualitativa da birrefringência de fibras colágenas**

### **- coloração de Picrosirius.**

A birrefringência dos feixes de colágeno no tecido em desenvolvimento dos diferentes grupos pesquisados foi examinada através de cortes histológicos submetidos à coloração de picrosirius. O objetivo desta técnica, segundo **JUNQUEIRA et al.** (1985), é observar a orientação das moléculas de colágeno, pelo aumento de sua birrefringência.

Pode-se observar que, pelo exame sob luz polarizada, o brilho dos feixes de colágeno, que expressa seu grau de orientação macromolecular, se torna mais intenso quanto mais numerosos e mais maduros eles estejam.

### **4º dia de reparação tecidual**

Observa-se a presença de uma pequena quantidade de feixes de fibras colágenas birrefringentes, sendo estas ainda bastante delgadas e com brilho pouco intenso, caracterizando-se ainda como feixes de fibras imaturas. Comparando-se os grupos, foi observado que o tecido de granulação pertencente aos grupos **VE60** e **VE90** (FIG. 34 e 35) apresentavam maior quantidade de feixes de fibras colágenas birrefringentes e em maior quantidade do que os demais. Os feixes de fibras colágenas no tecido de reparação dos grupos **C**, **VE60IRR** e

**VE90IRR** (FIG. 33, 37 e 38) apresentaram-se com menor brilho e em menor quantidade quando comparado aos grupos supra citados, porém maior em relação aos grupo **D**, **G** e **H** (FIG. 36, 39 e 40), os quais apresentaram áreas raras de brilho provenientes do feixe de fibras colágenas.

#### 7º dia de reparação tecidual

Verificou-se a evolução da formação dos feixes de fibras colágenas, tendo um brilho mais característico e com espessura maior desses feixes, observando-se uma tendência marcante de maior formação de fibras nos grupos **C**, **VE60**, **VE90**, **VE60IRR** e **VE90IRR** (FIG. 41, 42, 43, 45 e 46) e em menor quantidade e intensidade os grupos **IRR**, **OOL** e **OOLIRR** (FIG 44, 47 e 48).

#### 14º dia de reparação tecidual

Os feixes de fibras encontravam-se num estágio avançado de maturação, com feixes de fibras colágenas bastante espessos e com brilho intenso, próximo do padrão normal. Os padrões encontrados neste período são semelhantes ao encontrado no 7º dia, ou seja, à birrefringência dos feixes de fibras dos grupos **C**, **VE60**, **VE90**, **VE60IRR** e **VE90IRR** (FIG. 49, 50, 51, 53 e 54) apresentavam-se em maior quantidade e brilho mais intenso do que a dos grupos **IRR**, **OOL** e **OOLIRR** (FIG. 52, 55 e 56).

**21º dia de reparação tecidual**

No período final de avaliação, os feixes de fibras encontravam-se maduros nos grupos **C**, **VE60**, **VE90**, **VE60IRR** e **VE90IRR** (FIG. 57, 58, 59, 61 e 62), onde o brilho era bastante intenso. Já nos grupos **IRR**, **OOL** e **OOLIRR** (FIG. 60, 63 e 64), os feixes de fibras ainda apresentavam-se atrasados em relação aos demais grupos, onde o brilho era menos intenso e a quantidade de áreas de birrefringência era menos numerosa.

## Coloração por Picrosirius - 4º Dia



**FIGURA 33-** Grupo A - Ferida  
Aumento original 16 x 1.25 x 10



**FIGURA 34-** Grupo B - Ferida + Vit. E (3-60UI)  
Aumento original 16 x 1.25 x 10



**FIGURA 35-** Grupo C - Ferida + Vit. E (3-90UI)  
Aumento original 16 x 1.25 x 10



**FIGURA 36-** Grupo D - Ferida + Irradiação  
Aumento original 16 x 1.25 x 10

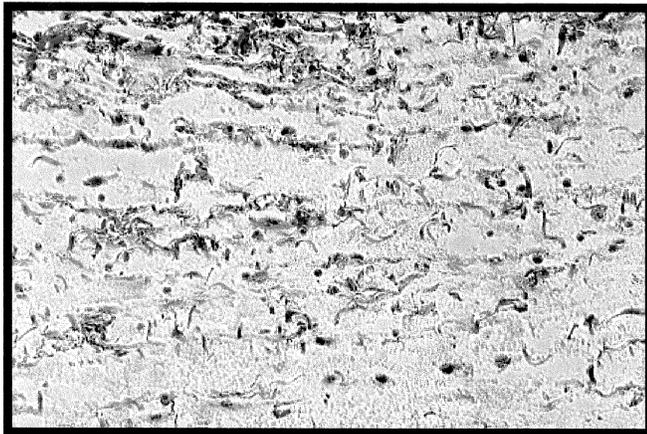
## Coloração por Picrosirius - 4° Dia



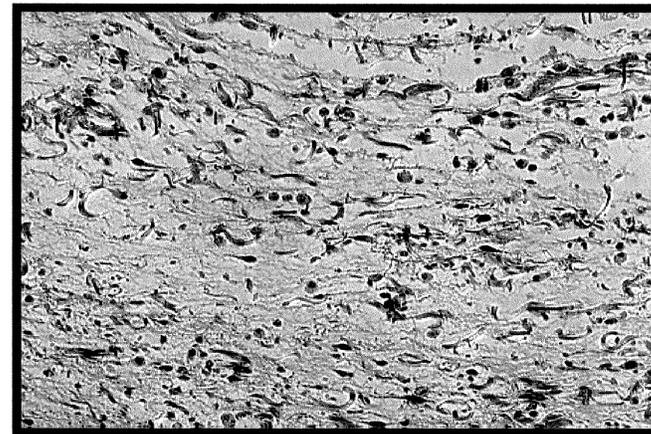
**FIGURA 37-** Grupo E – Ferida + Vit. E (3-60UI) + Irrad.  
Aumento original 16 x 1.25 x 10



**FIGURA 38-** Grupo F - Ferida + Vit. E (3-90UI) + Irrad.  
Aumento original 16 x 1.25 x 10



**FIGURA 39-** Grupo G – Ferida + Óleo (3-1ml)  
Aumento original 16 x 1.25 x 10

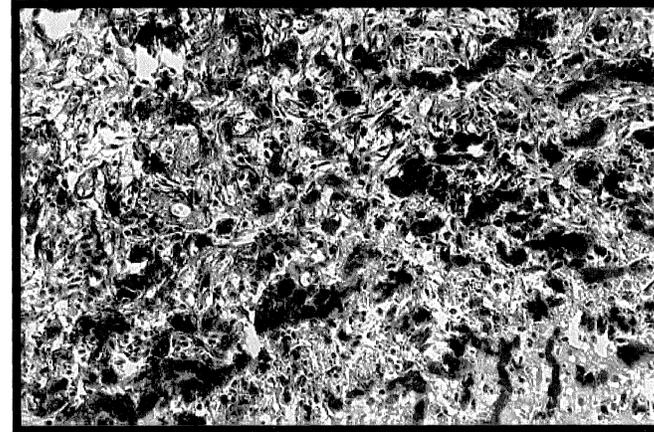


**FIGURA 40-** Grupo H - Ferida + Óleo (3-1ml) + Irrad.  
Aumento original 16 x 1.25 x 10

## Coloração por Picrosirius - 7º Dia



**FIGURA 41-** Grupo A - Ferida  
Aumento original 16 x 1.25 x 10



**FIGURA 42-** Grupo B - Ferida + Vit. E (3-60UI)  
Aumento original 16 x 1.25 x 10



**FIGURA 43-** Grupo C - Ferida + Vit. E (3-90UI)  
Aumento original 16 x 1.25 x 10



**FIGURA 44-** Grupo D - Ferida + Irradiação  
Aumento original 16 x 1.25 x 10

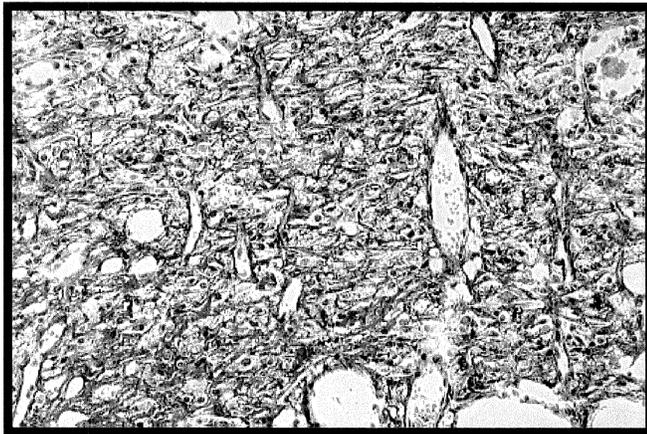
## Coloração por Picrosirius - 7º Dia



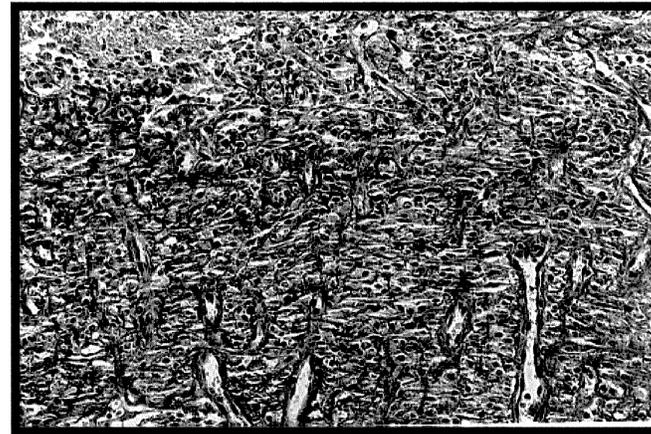
**FIGURA 45-** Grupo E – Ferida + Vit. E (3-60UI) + Irrad.  
Aumento original 16 x 1.25 x 10



**FIGURA 46-** Grupo F - Ferida + Vit. E (3-90UI) + Irrad.  
Aumento original 16 x 1.25 x 10

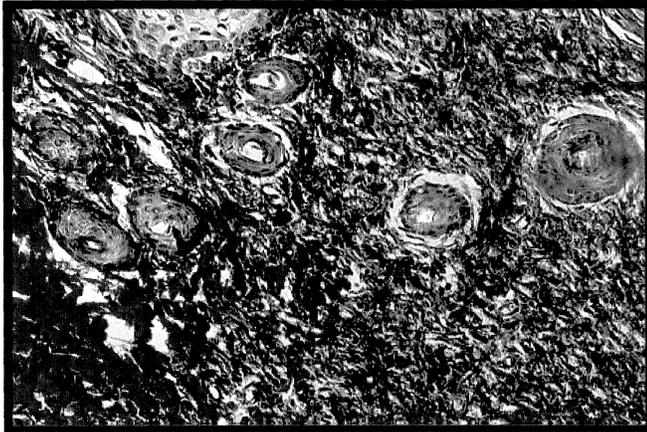


**FIGURA 47-** Grupo G – Ferida + Óleo (3-1ml)  
Aumento original 16 x 1.25 x 10

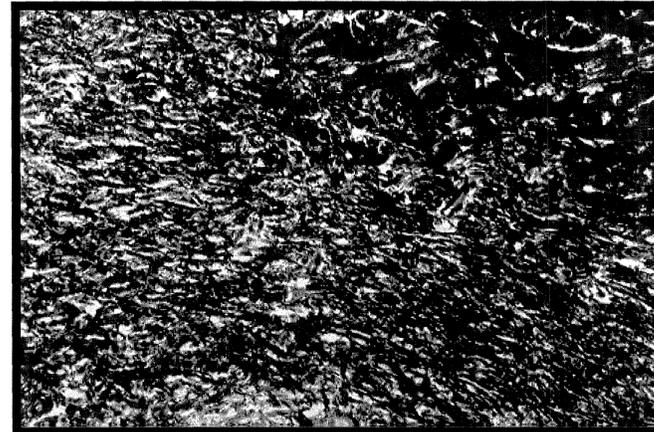


**FIGURA 48-** Grupo H - Ferida + Óleo (3-1ml) + Irrad.  
Aumento original 16 x 1.25 x 10

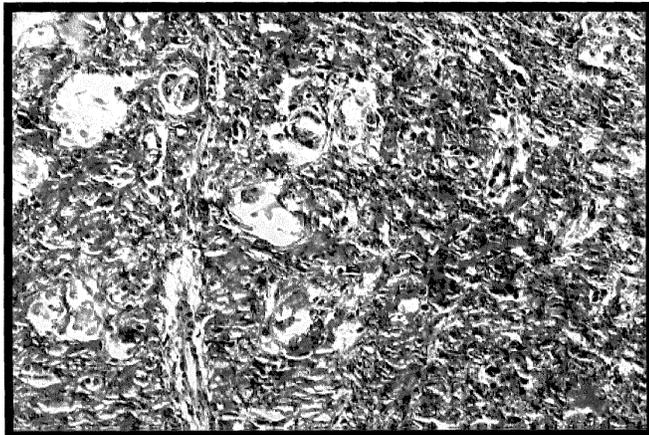
## Coloração por Picrosirius - 14º Dia



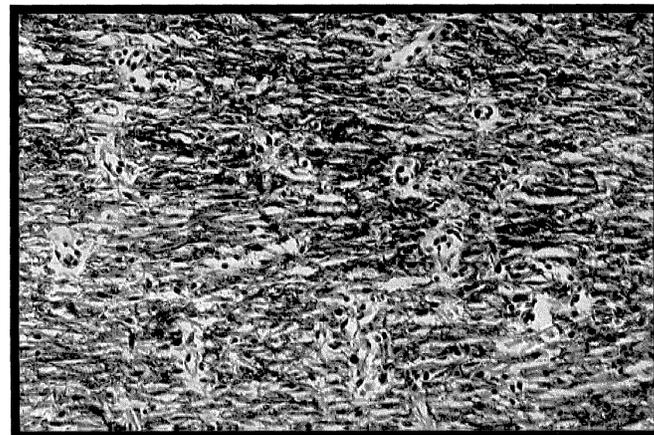
**FIGURA 49-** Grupo A - Ferida  
Aumento original 16 x 1.25 x 10



**FIGURA 50-** Grupo B - Ferida + Vit. E (3-60UI)  
Aumento original 16 x 1.25 x 10

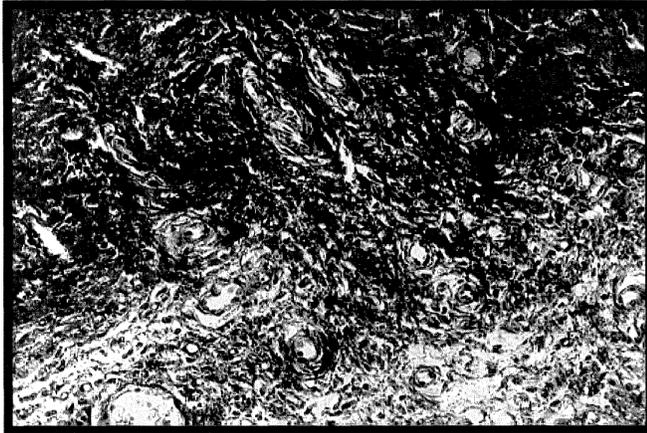


**FIGURA 51-** Grupo C - Ferida + Vit. E (3-90UI)  
Aumento original 16 x 1.25 x 10

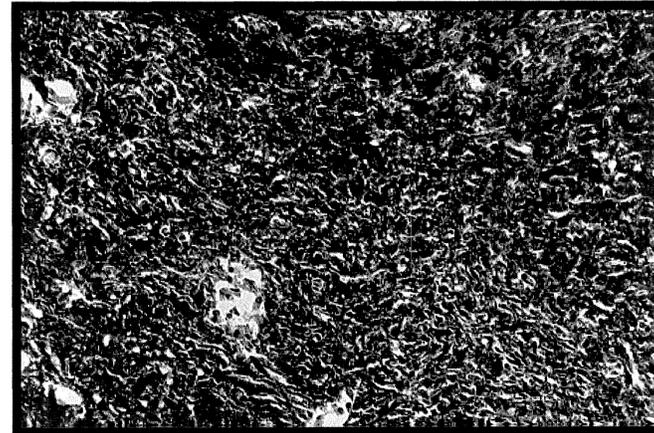


**FIGURA 52-** Grupo D - Ferida + Irradiação  
Aumento original 16 x 1.25 x 10

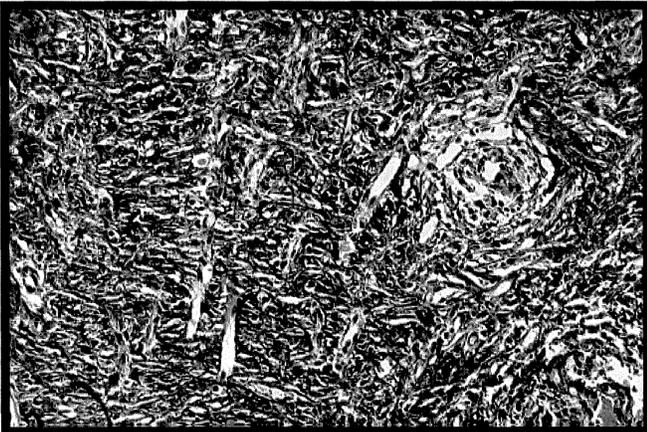
## Coloração por Picrosirius - 14º Dia



**FIGURA 53-** Grupo E – Ferida + Vit. E (3-60UI) + Irrad.  
Aumento original 16 x 1.25 x 10



**FIGURA 54-** Grupo F - Ferida + Vit. E (3-90UI) + Irrad.  
Aumento original 16 x 1.25 x 10

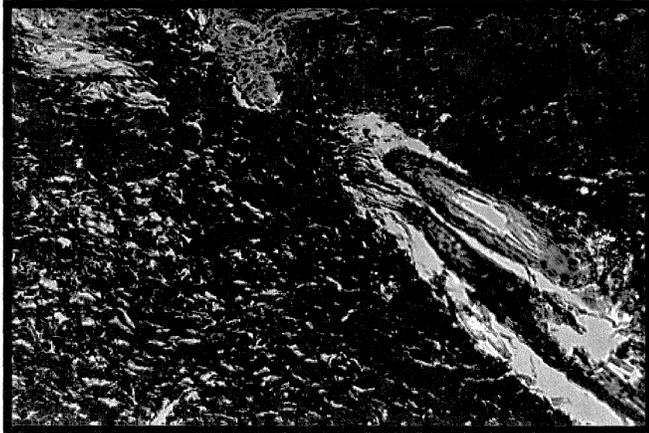


**FIGURA 55-** Grupo G – Ferida + Óleo (3-1ml)  
Aumento original 16 x 1.25 x 10

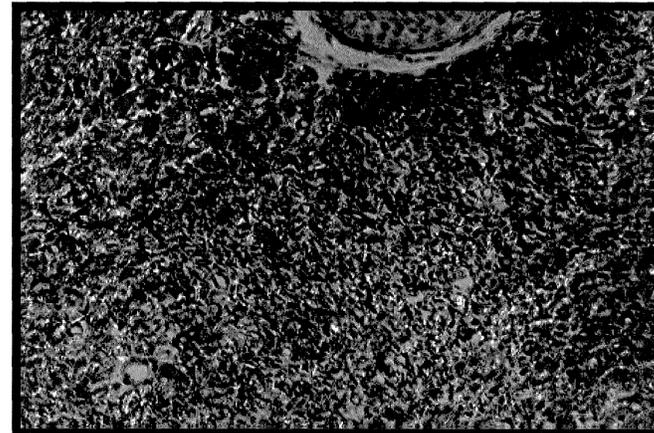


**FIGURA 56-** Grupo H - Ferida + Óleo (3-1ml) + Irrad.  
Aumento original 16 x 1.25 x 10

## Coloração por Picrosirius - 21º Dia



**FIGURA 57-** Grupo A - Ferida  
Aumento original 16 x 1.25 x 10



**FIGURA 58-** Grupo B - Ferida + Vit. E (3-60UI)  
Aumento original 16 x 1.25 x 10

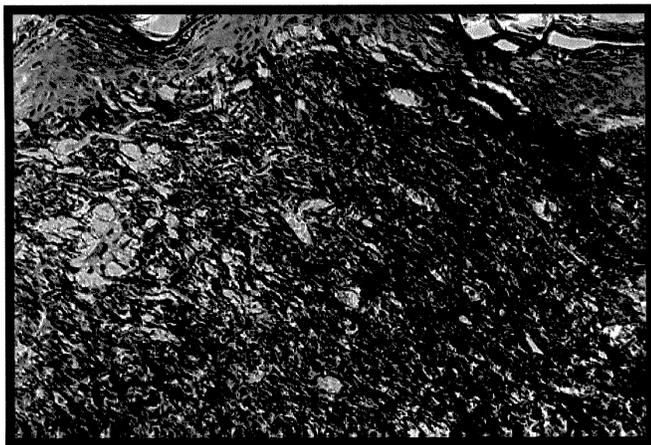


**FIGURA 59-** Grupo C – Ferida + Vit. E (3-90UI)  
Aumento original 16 x 1.25 x 10

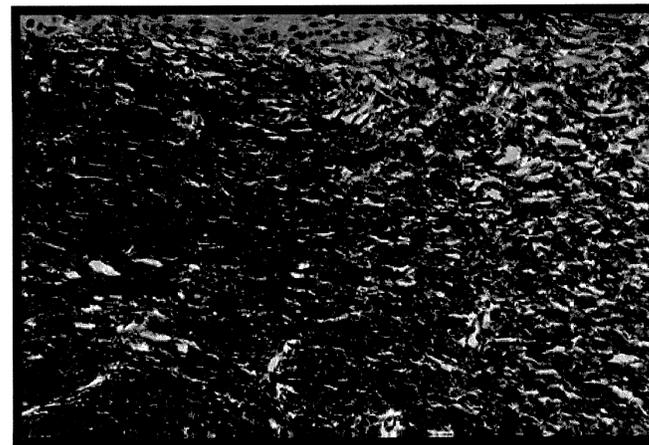


**FIGURA 60-** Grupo D - Ferida + Irradiação  
Aumento original 16 x 1.25 x 10

## Coloração por Picrosirius - 21º Dia



**FIGURA 61-** Grupo E – Ferida + Vit. E (3-60UI) + Irrad.  
Aumento original 16 x 1.25 x 10



**FIGURA 62-** Grupo F - Ferida + Vit. E (3-90UI) + Irrad.  
Aumento original 16 x 1.25 x 10



**FIGURA 63-** Grupo G – Ferida + Óleo (3-1ml)  
Aumento original 16 x 1.25 x 10



**FIGURA 64-** Grupo H - Ferida + Óleo (3-1ml)+ Irrad.  
Aumento original 16 x 1.25 x 10

### **3- Avaliação qualitativa do dicróismo -coloração pelo azul de toluidina pH 4.**

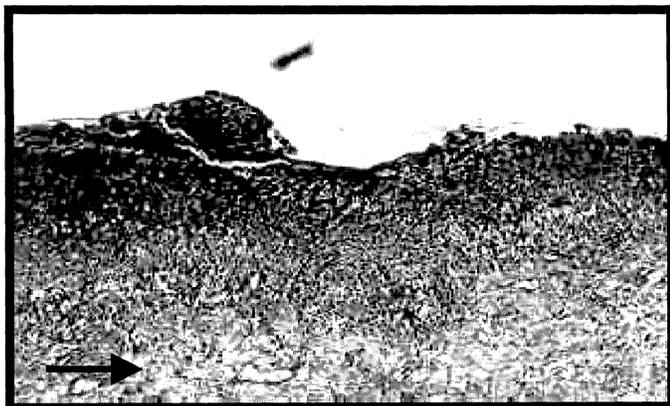
Nesta avaliação, a reação histoquímica pelo azul de toluidina pH 4 permitiu a observação do dicróismo linear (“duas cores”) apresentado pelos tecidos organizados. A observação do dicróismo foi feita por meio de microscopia de luz polarizada sem o analisador de imagens.

O fenômeno do dicróismo é fundamental para se detectar a presença ou ausência da orientação macromolecular do tecido em evolução. Neste método de estudo, moléculas do corante ligam-se às glicoproteínas adesivas (glicosaminoglicanas / “GAGs”) produzidas pelos fibroblastos, que são ligadas orientadamente às moléculas de colágeno, para a formação de feixes de fibras.

O tecido corado, ao ser analisado sob luz polarizada apresenta coloração azul ortocromática quando as fibras colágenas estão paralelas ao plano de polarização da luz (PPL); por rotação da platina do microscópio em 90°, o tecido que apresenta-se organizado apresenta uma coloração rósea metacromática das fibras colágenas (FIG. 67 e 68), portanto este fenômeno do dicróismo somente é evidenciado quando existe acentuado grau de orientação macromolecular. Caso contrário, os tecidos, em qualquer PPL, permanecem com a cor azul ortocromática (FIG. 65 e 66).

A análise dos resultados mostrou que o tecido de granulação nos grupos **C, VE60, VE90, VE60IRR e VE90IRR**, o dicróismo foi observado ao 7º dias do processo de reparação tecidual, enquanto que nos grupos **IRR, OOL e OOLIRR** o dicróismo foi observado no 14º dia, mostrando um atraso na orientação macromolecular do tecido desses grupos em relação aos grupos **C, VE60, VE90, VE60IRR e VE90IRR**.

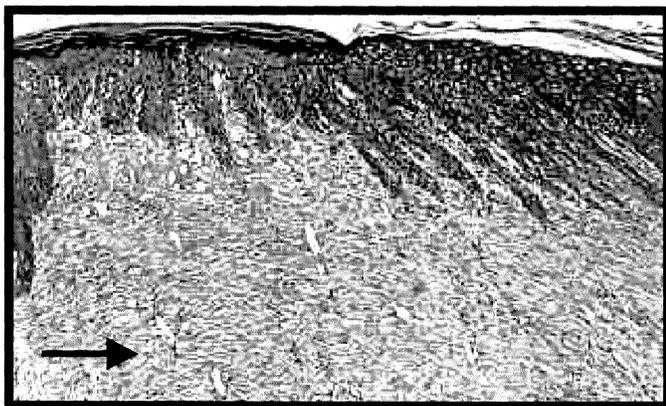
## Reação Histoquímica de Azul de Toluidina



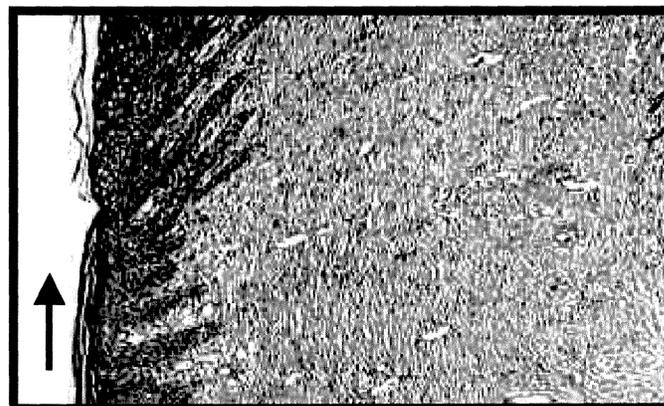
**FIGURA 65-** Incidência paralela ao Plano de polarização da luz



**FIGURA 66-** Incidência perpendicular ao Plano de polarização da luz - coloração azul ortocromática



**FIGURA 67-** Incidência paralela ao Plano de polarização da luz



**FIGURA 68-** Incidência perpendicular ao Plano de polarização da luz - coloração róseo metacromática

#### **4- Avaliação quantitativa da área de feixes de fibras colágenas birrefringentes.**

Os dados obtidos pelo analisador de imagens histológicas, que teve como finalidade medir as áreas (em pixel<sup>2</sup>) dos feixes com birrefringência, foram submetidos ao Teste de Tukey para os grupos dentro de cada período de tempo e à Regressão Polinomial para .os tempos dentro de cada grupo.

A análise estatística dos resultados, referente ao 4º dia, pelo Teste de Tukey apresentados na TAB. 2 e na FIG. 69 mostra que não existe diferença significativa ( $p < 0.05$ ) entre as médias das áreas birrefringentes dos grupos **VE60** e **VE90**, que correspondem aos grupos que tiveram apenas o tratamento prévio de vitamina E. Estes dois grupos apresentam as maiores médias. O grupo controle (**C**) vem em seguida, com média significativamente menor ao do grupo **VE90**, maior que os grupos **IRR**, **VE60IRR**, **VE90IRR**, **OOL** e **OOLIRR** e não significante com o grupo **VE60**. Os grupos **VE60IRR** e **VE90IRR**, que testaram o efeito radioprotetor da vitamina E, apresentaram médias estatisticamente menores que os grupos **C**, **VE60** e **VE90**, indicando um pequeno atraso em relação a tais grupos. Porém estas médias são maiores quando estatisticamente comparadas com o grupo irradiação (**IRR**) e com os grupos em que foi administrado o óleo de

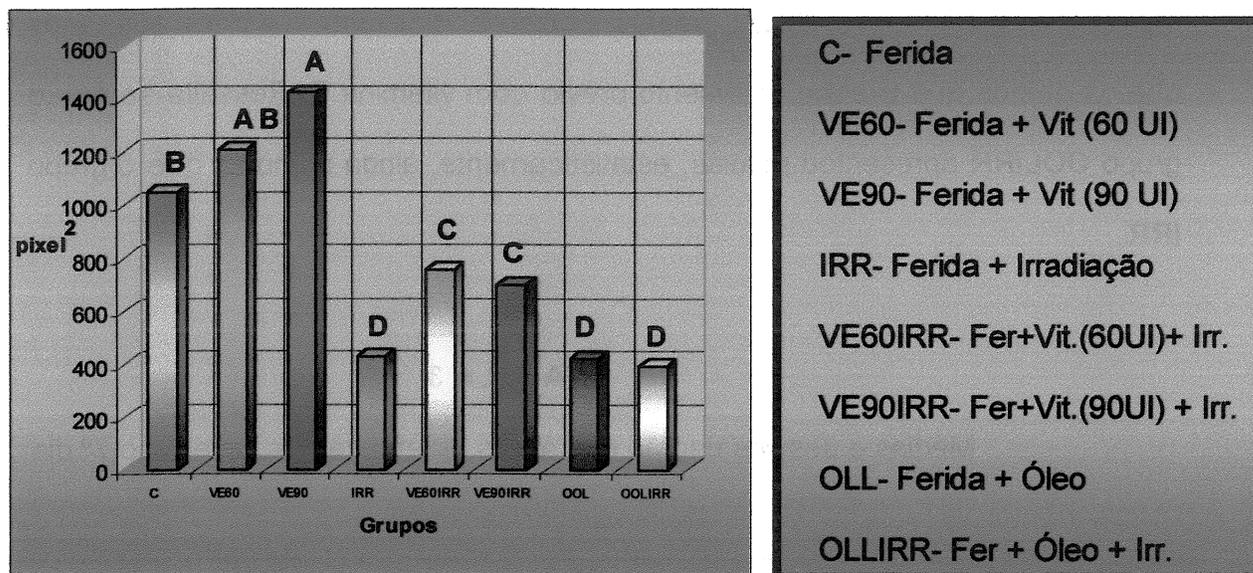
oliva (**OOL** e **OOLIRR**), sendo que estes três grupos (**IRR**, **OOL** e **OOLIRR**) não apresentavam médias estatisticamente diferentes entre si.

**TABELA 2**

Médias e desvios padrão das áreas birrefringentes (pixel<sup>2</sup>) no 4º dia de reparação tecidual

<b>Grupos</b>	<b>Médias</b>	<b>Desvios Padrão</b>
C- Ferida	1049.72 B	91.22
VE60- Ferida+Vit.(60UI)	1206.70 AB	154.93
VE90- Ferida+Vit.(90UI)	1422.86 A	123.10
IRR- Ferida+Irradiação	426.32 D	24.30
VE60IRR - Ferida+Vit(60UI)+Irrad	757.04 C	85.73
VE90IRR- Ferida+Vit(90UI)+Irrad	696.21 C	51.18
OOL- Ferida+Óleo	420.69 D	48.64
OOLIRR- Ferida+Óleo+Irrad.	393.50 D	60.79

Médias seguidas de letras iguais não diferem entre si e médias seguidas de letras diferentes diferem entre si pelo Teste de Tukey (p<0,05).



Médias seguidas de letras iguais não diferem entre si e médias seguidas de letras diferentes diferem entre si pelo Teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

**FIGURA 69** – Gráfico das médias das áreas birrefringentes em função do grupo, no 4º dia de reparação tecidual

A TAB. 3 e a FIG. 70 são referentes à análise estatística utilizando o Teste de Tukey dos resultados do 7º dia de reparação tecidual. Entre os grupos C, VE60 e VE90, as médias das áreas birrefringentes não diferem entre si ( $p < 0,05$ ), apresentando os maiores valores. Porém quando comparando o grupo C com os grupos VE60IRR e VE90IRR, grupos que verificam o efeito radioprotetor da vitamina E, não houve diferença estatística. O grupo IRR e os grupos OOL e

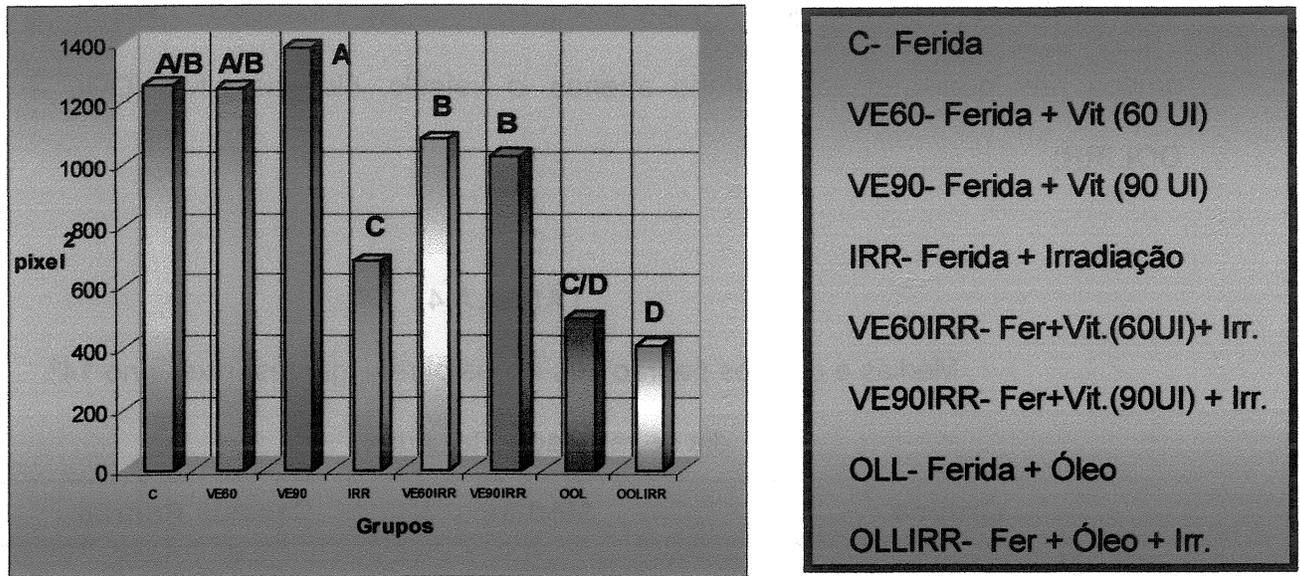
OOLIRR apresentaram médias das áreas birrefringentes estatisticamente menores que o grupo C. Esses grupos, portanto, mostraram-se mais atrasados que os grupos que tiveram tratamento prévio com vitamina E. Ressalta-se que o grupo OOLIRR apresentou médias, estatisticamente, ainda menores que o grupo IRR.

**TABELA 3**

Médias e desvios padrão das áreas birrefringentes (pixel<sup>2</sup>) no 7º dia de reparação tecidual

<b>Grupos</b>	<b>Médias</b>	<b>Desvios Padrão</b>
C- Ferida	1259.91 A B	71.47
VE60- Ferida+Vit.(60UI)	1248.00 A B	123.83
VE90- Ferida+Vit.(90UI)	1381.09 A	99.97
IRR- Ferida+Irradiação	684.65 C	108.89
VE60IRR - Ferida+Vit(60UI)+Irrad	1081.65 B	159.52
VE90IRR- Ferida+Vit(90UI)+Irrad	1028.76 B	109.72
OOL- Ferida+Óleo	498.05 C D	81.49
OOLIRR- Ferida+Óleo+Irrad.	409.95 D	55.28

Médias seguidas de letras iguais não diferem entre si e médias seguidas de letras diferentes diferem entre si pelo Teste de Tukey (p<0,05).



Médias seguidas de letras iguais não diferem entre si e médias seguidas de letras diferentes diferem entre si pelo Teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

**FIGURA 70** – Gráfico das médias das áreas birrefringentes em função do grupo, no 7º dia de reparação tecidual

A análise dos resultados referentes ao 14º dia está apresentada na TAB. 4 e na FIG. 71. Pode-se notar que as médias das áreas birrefringentes de todos os grupos que sofreram o pré tratamento com vitamina E (VE60, VE90, VE60IRR e VE90IRR) não se diferem estatisticamente ( $p < 0,05$ ) com a média do grupo C. O grupo OOL, apresenta média menor que os grupos citados acima, porém maior que os grupos IRR e OOLIRR, os quais não diferem entre si. Nota-

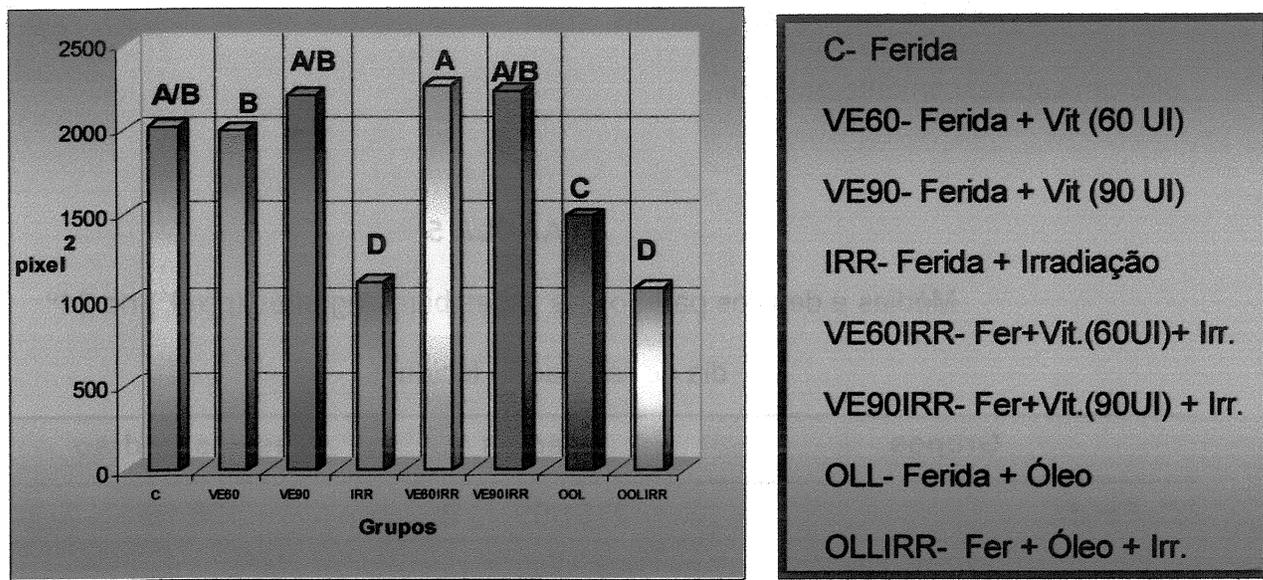
se, mais uma vez, que os grupos tratados com vitamina E, apresentaram médias estatisticamente maiores que o grupo submetido apenas à irradiação (IRR) e os grupos nos quais foi administrado apenas o veículo, óleo de oliva (OOL e OOLIRR).

**TABELA 4**

**Médias e desvios padrão das áreas birrefringentes (pixel<sup>2</sup>) no 14<sup>o</sup> dia de reparação tecidual**

<b>Grupos</b>	<b>Médias</b>		<b>Desvios Padrão</b>
C- Ferida	2022.12	A B	170.71
VE60- Ferida+Vit.(60UI)	1994.90	B	177.92
VE90- Ferida+Vit.(90UI)	2201.17	A B	88.05
IRR- Ferida+Irradiação	1105.86	D	73.44
VE60IRR - Ferida+Vit(60UI)+Irrad	2260.55	A	41.17
VE90IRR- Ferida+Vit(90UI)+Irrad	2221.27	A B	100
OOL- Ferida+Óleo	1494.61	C	137.28
OOLIRR- Ferida+Óleo+Irrad.	1066.85	D	171.76

Médias seguidas de letras iguais não diferem entre si e médias seguidas de letras diferentes diferem entre si pelo Teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).



Médias seguidas de letras iguais não diferem entre si e médias seguidas de letras diferentes diferem entre si pelo Teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

**FIGURA 71** – Gráficos da médias das áreas birrefringentes em função do grupo, no 14º dia de reparação tecidual

A TAB. 5 e a FIG. 72 são referentes à análise estatística pelo Teste de Tukey dos resultados do 21º dia de reparação tecidual. Observa-se que apenas o grupo **VE90** apresentou média estatisticamente maior ( $p < 0,05$ ) das áreas birrefringentes em relação aos demais grupos. Porém observa-se que as médias das áreas birrefringentes dos grupos testando o efeito radioprotetor da vitamina E (**VE60IRR** e **VE90IRR**) não diferem, estatisticamente, com as médias do grupo

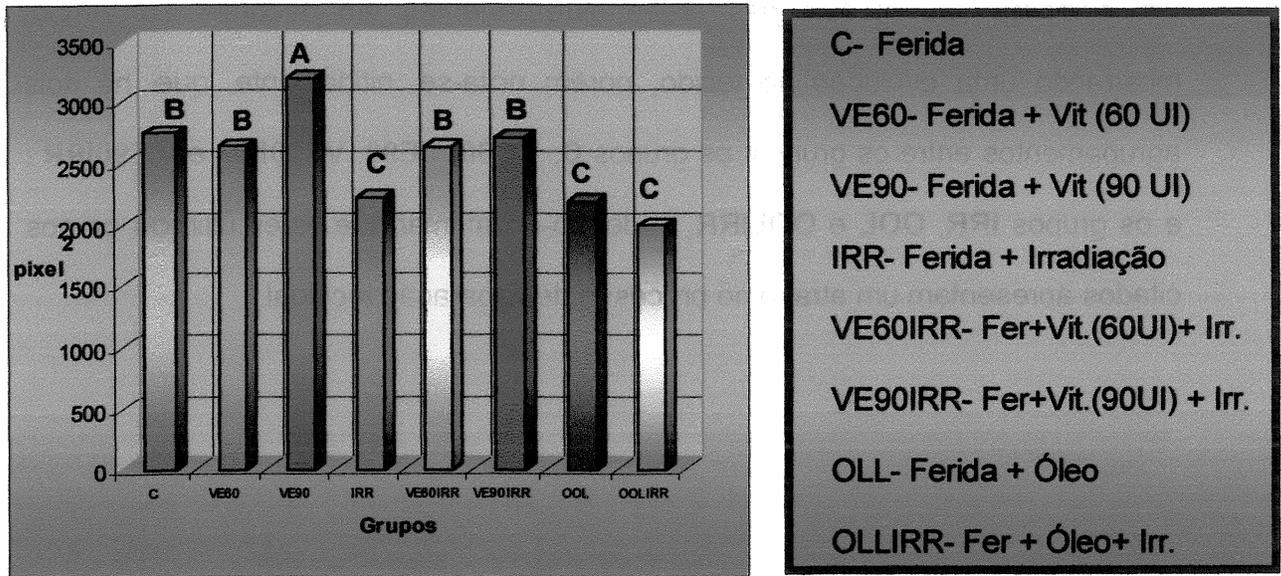
controle (C), além do grupo VE60. Os grupos IRR, OOL e OOLIRR, encontraram-se atrasados em relação aos demais, mas neste período de avaliação, não diferem estatisticamente entre si.

**TABELA 5**

**Médias e desvios padrão das áreas birrefringentes (pixel<sup>2</sup>) no 21º dia de reparação tecidual**

<b>Grupos</b>	<b>Médias</b>		<b>Desvios Padrão</b>
C- Ferida	2751.99	B	105.16
VE60- Ferida+Vit.(60UI)	2641.70	B	248.11
VE90- Ferida+Vit.(90UI)	3197.89	A	282.29
IRR- Ferida+Irradiação	2222.22	C	149.09
VE60IRR - Ferida+Vit(60UI)+Irrad	2632.01	B	227.10
VE90IRR- Ferida+Vit(90UI)+Irrad	2712.60	B	103.77
OOL- Ferida+Óleo	2187.74	C	133.38
OOLIRR- Ferida+Óleo+Irrad.	1994.49	C	117.88

Médias seguidas de letras iguais não diferem entre si e médias seguidas de letras diferentes diferem entre si pelo Teste de Tukey (p<0,05).

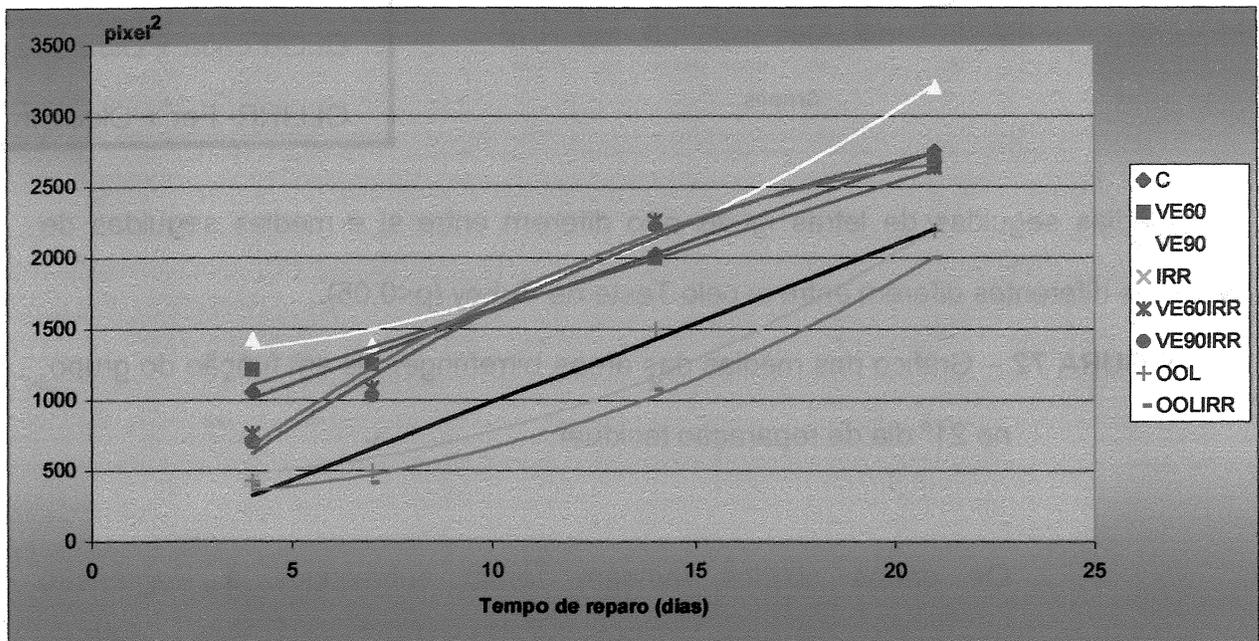


Médias seguidas de letras iguais não diferem entre si e médias seguidas de letras diferentes diferem entre si pelo Teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

**FIGURA 72** – Gráfico das médias das áreas birrefringentes em função do grupo, no 21º dia de reparação tecidual

Os dados obtidos também foram submetidos à Regressão Polinomial, que tem como objetivo avaliar às áreas birrefringentes, em função do tempo para os diversos grupos experimentais. Nota-se que houve um aumento polinomial de todos os grupos, sendo que os grupos C, VE e OOL apresentam uma equação linear e os demais grupos (VE90, IRR, VE60IRR, VE90IRR e OOLIRR) uma equação quadrática.

Analisando a FIG. 73 observa-se que todos os grupos apresentam um aumento das médias das áreas birrefringentes em decorrer do tempo, mostrando uma evolução do tecido, porém nota-se, nitidamente, que há dois agrupamentos entre os grupos: os grupos C, VE60, VE90, VE60IRR e VE90IRR ; e os grupos IRR, OOL e OOLIRR, podendo-se afirmar que estes últimos grupos citados apresentam um atraso no processo de reparação tecidual.



**FIGURA 73** – Gráfico das médias das áreas birrefringentes em função do tempo para os diferentes grupos

## 6- Discussão

O processo de reparo pode ocorrer por dois mecanismos que são semelhantes, mas diferem em alguns pontos, dependendo das condições em que se processam. O primeiro e mais simples desses mecanismos é aquele denominado cura por primeira intenção e acontece quando se tem uma ferida cirúrgica limpa e de bordas regulares, sem contaminação bacteriana e com as faces suturadas. Nestas condições, a cura da ferida se processa com mínimo de inflamação exsudativo-vascular e também com pequena formação posterior de tecido de granulação. No entanto, a maioria das feridas é acidental e nesses casos existe grande perda tecidual, sem regularidade de bordas e inevitável contaminação bacteriana, além da presença de hemorragia. Nestes casos, a cura

contaminação bacteriana, além da presença de hemorragia. Nestes casos, a cura não é tão simples, pois fatores complicadores podem estar presentes, como a formação de abscessos. Existe também a necessidade de que grandes quantidades de tecido de granulação sejam sintetizadas a partir das bordas da ferida, a fim de reconstituir a arquitetura original. Esta forma de cura é chamada cura por segunda intenção e difere da anterior por apresentar feridas maiores; maior quantidade de restos necróticos e exsudato que necessitam ser removidos tendo, conseqüentemente, a reação inflamatória mais intensa; área de tecido de granulação maior e, principalmente, fenômeno da contração da ferida presente. No caso de feridas experimentais usadas como modelo, elas são próximas da cura por segunda intenção, embora praticamente sem infecção.

Assim, quando o tecido é lesado, ocorre uma série de fenômeno exsudativos vasculares tentando restabelecer a normalidade do tecido, pelo aumento da permeabilidade vascular, vasodilatação e diapedese de elementos celulares, como macrófago, linfócito e plaquetas, que agem tanto liberando mediadores químicos (fatores intrínsecos) quanto na ação fagocitária.

Além dos fatores intrínsecos, tem-se os elementos ou fatores extrínsecos ao organismo, podendo ser químico ou físico, que retardam ou impedem o processo de reparação tecidual. Nesta pesquisa foi utilizada a irradiação ionizante como fator extrínseco, visto que em várias pesquisas **(POHLE, RITCHIE & WRIGHT (1931), STEIN, BRADY & RAVENTOS (1957),**

**DOTTO et al.(1970), MOORE (1984), RUDOLPH et al.(1988), RAVELLI et al.(1990), BERNSTEIN et al.(1993), WANG et al.(1994), ALMEIDA (1997) e MONTEIRO (1999)** demonstraram que a radiação promove um retardo neste processo.

O tecido de escolha para ser submetido à radiação ionizante nesta pesquisa foi o tecido correspondente as bordas das feridas produzidas na pele de ratos pois, pelo trabalho de **GRILLO (1963)** fica claro que no processo de cura e reparo de feridas os fibroblastos presentes tem sua origem principalmente do tecido conjuntivo das bordas da lesão. Assim, uma injúria nesta região terá efeito deletério maior na reparação tecidual. Nos grupos de animais que tiveram as bordas das feridas irradiadas, foi administrada uma dose de radiação de elétrons de 6 Gy, 3 dias após a realização da ferida, visto que **ALMEIDA (1997)** e **MONTEIRO (1999)** observaram que houve retardo maior no processo de reparação nos animais que foram submetidos a irradiação 3 dias após a produção da ferida comparado com a reparação dos animais que foram submetidos a irradiação imediatamente após à cirurgia.

No grupo controle (**C**), que foi realizado apenas a ferida, segundo o exame histológico na coloração por hematoxilina-eosina, a evolução do tecido de granulação ocorreu de maneira semelhante a um processo de reparação tecidual normal, na seqüência dos fases. Para o grupo que sofreu irradiação (**IRR**), os mesmos aspectos foram observados, notando-se mais evidente os fenômenos de

necrose tecidual e exsudativos vasculares no 4º dia do processo de reparo, observados também por **ALMEIDA (1997)** e **MONTEIRO (1999)**. Pode-se ainda observar que no 7º dia de reparação tecidual, o grupo controle já mostrava disposição ordenada de vasos néo formados, também observado por **VIZIOLI (1971)**. No grupo irradiado, observou-se um retardo na organização tecidual, sendo esse resultado, em parte, coincidente com o trabalho de **DOTTO et al. (1970)**, que observaram também menor proliferação tecidual para os dias iniciais de formação do tecido de granulação.

Foi encontrado menor vascularização do grupo irradiado, fato observado também nos trabalhos de **MOORE (1984)**, **GUIDUGLI NETO (1987)**, **ALMEIDA (1997)** e **MONTEIRO (1999)**. Esses autores sugerem que as falhas no fechamento das feridas irradiadas são devido à vascularização inadequada. Porém no trabalho de **AITASALO et al. (1992)**, onde mostraram a importância da manutenção adequada da vascularização na cicatrização de feridas, não apresentou diferença entre a cicatrização na interface de retalhos de pele sobrepostos no leito irradiado ou não irradiado. Mas deve-se ressaltar que nesse trabalho, a irradiação foi realizada 1 semana antes da confecção da ferida e as margens do enxerto, local da avaliação, foram suturadas. Assim pode-se afirmar que a menor proliferação dos vasos sanguíneos não é a única causa do retardo do processo de reparação tecidual quando as bordas da ferida são irradiadas. Já no trabalho de **DOTTO et al. (1970)**, a vascularização manteve-se maior em todos

os grupos que sofreram irradiação, este fato pode ser explicado pela utilização da radiação X de ortovoltagem, onde os feixes de raios X são pouco penetrantes e neste trabalho foi utilizado a radiação de elétrons de megavoltagem, tendo feixes de radiação com grande poder de penetração, causando injúrias na vascularização da ferida.

O retardo no processo de reparação permaneceu até os últimos tempos estudados, entretanto a radiação de elétrons interferiu retardando, mas não impedindo, fato observado também nos trabalhos de **ALMEIDA (1997)** e **MONTEIRO (1999)**. Já **WANG et al. (1994)**, encontraram para a radiação de elétrons, com dose de 9,6 Gy um retardo na reparação tecidual até o 7º dia, sendo restabelecido no 14º dia. Neste trabalho, o retardo deste processo permaneceu até o 21º dia de observação, esta diferença pode ser devido do fato de que no trabalho de **WANG et al. (1994)**, a irradiação foi realizada 7 dias antes do procedimento cirúrgico, no pré operatório, sendo que só as células inativas foram irradiadas, enquanto neste trabalho o período em que ocorreu a irradiação correspondia à fase proliferativa da inflamação. Foi observado no trabalho de **MONTEIRO (1999)** um atraso transitório no processo de reparação tecidual, que pode ser explicado pela a área irradiada, onde nesse trabalho foi na ferida cirúrgica e neste nas bordas das feridas; provavelmente nos fibroblastos que iniciam o processo de cura e reparo das feridas, onde uma injúria direta nestas

células acarretará atraso no processo de reparação tecidual, como afirma **BERNSTEIN et al. (1993)** e **DRAKE & SCOTT (1995)**.

A célula que tem a maior participação no processo de reparação tecidual é, sem dúvida, o fibroblasto devido a sua função de produzir fibras e matriz extracelular. O processo de reparação tecidual é concluído quando o colágeno produzido atinge sua maturação restabelecendo a homeostasia da área lesada. Portanto, observar também a população de fibroblastos constitui um parâmetro para avaliar a produção de colágeno e assim, o processo de reparação tecidual. No grupo que sofreu apenas a irradiação (**IRR**) notou-se que a proliferação dos fibroblastos foi menor que no grupo controle (**C**). **ALMEIDA (1997)** e **MONTEIRO (1999)** sugerem que o atraso da reparação tecidual pode ter sido também decorrente de injúrias a essa célula. Segundo **GRILLO (1963)** e **RUDOLPH et al. (1988)**, os fibroblastos presentes na reparação tecidual originam-se do tecido conjuntivo adjacente à lesão e não da corrente sanguínea, como os macrófagos. Neste trabalho e no de **ALMEIDA (1997)** a irradiação foi realizada nas bordas da ferida, podendo afirmar que as células precursoras ou fibroblastos ativos sofreram a ação direta da radiação de elétrons sugerindo que o atraso observado na reparação tecidual do grupo irradiado pode ser também decorrente de danos nos fibroblastos, resultando em menor quantidade de colágeno, levando ao atraso a maturação do mesmo, concordando com os trabalhos de **DRAKE &**

**SCOTT (1995)**, que afirmam serem permanentes os danos que ocorrem nos fibroblastos.

Na avaliação qualitativa do dicróismo pela reação de azul de toluidina, verificou-se que no grupo controle a organização das fibras colágenas foi observado nas lâminas à partir do 7º dia e do grupo que sofreu apenas a irradiação nas lâminas à partir do 14º dia, mostrando o atraso na orientação macromolecular do tecido em evolução, o que também foi encontrado por

**MONTEIRO (1999)**

Quando comparado o grupo controle (**C**) aos grupos que tiveram apenas o tratamento prévio de vitamina E (**VE60** e **VE90**) observou-se que estes na análise subjetiva das lâminas corada por Hematoxilina-Eosina apresentaram-se mais adiantados e organizados aparentemente e que o dicróismo, fornecido pela reação histoquímica do azul de toluidina, foi observado a partir do mesmo período da reparação tecidual, ou seja, no 7º dia. Nas lâminas coradas por picrossirius, observou-se que no 4º dia de reparação tecidual, nos grupos que tiveram apenas o tratamento prévio de vitamina E, houve maior quantidade de feixes de fibras colágenas birrefringentes se igualando nos demais períodos de observação. Na avaliação quantitativa da área de feixes de fibras colágenas birrefringentes, notou-se que apenas no 4º e 21º dia de reparação tecidual o grupo (**VE90**), animais apenas com tratamento prévio de vitamina E com 3 doses de 90 U.I., apresentou médias maiores ( $p < 0.05$ ). Estes resultados sugerem que a vitamina E favorece de

alguma maneira o processo de reparação tecidual. Talvez esta ajuda, como citado por **MAERCUS & COULSTON**, em **1996** que descreveram a propriedade antioxidante da vitamina E, característica mais importante dos tocoferóis, a qual impede a oxidação de constituintes essenciais dos tecidos, como a ubiquinona (coenzima Q), ou impede a formação de produtos tóxicos da oxidação, como os produtos da peroxidação formados a partir de ácidos graxos insaturados, ou seja, os radicais livres

Analisando o efeito radioprotetor da vitamina E pelos grupos **VE60IRR** e **VE90IRR**, observou-se, pela análise quantitativa da área de feixes de fibras colágenas, que no 4º dia de reparação tecidual o tecido de granulação apresentava-se mais atrasado que o grupo controle, porém mais adiantado quando comparado com o grupo que recebeu apenas a radiação de elétrons. Já na análise qualitativa da birrefringência, as fibras colágenas apresentaram brilho pouco intenso, porém semelhante. Na análise das lâminas coradas por hematoxilina-eosina, não houve diferença na morfologia dos tecidos do grupo controle (**C**) e dos grupos experimentais testando a vitamina E como radioprotetor (**VE60IRR** e **VE90IRR**). Quanto ao dicróismo do tecido, tanto no grupo controle quanto nos grupos experimentais estava ausente, o que era esperado pois não havia orientação macromolecular por se tratar de um tecido em fase inicial de evolução.

Nos outros períodos de avaliação resultados semelhantes foram encontrados entre o grupo controle e os grupos com associação do pré tratamento com vitamina E e radiação de elétrons, ou seja, em todas as análises deste estudo, morfologia pelo coloração de Hematoxilina-Eosina, avaliação qualitativa e quantitativa da birrefringência de fibras colágenas pela coloração por picrosirius e na avaliação qualitativa do dicróismo pela reação histoquímica do azul de toluidina pH 4, não apresentaram diferenças, podendo-se afirmar que a vitamina E, na forma dl-alfa-tocoferil, teve um efeito radioprotetor no processo de reparação tecidual.

Neste trabalho, foi avaliado o efeito radioprotetor da vitamina E em duas doses, de 60 U.I.e 90 U.I., pois observou-se nos trabalhos descritos na literatura que não havia uma padronização das dosagens de vitamina E entre os autores, sendo então melhor utilizar duas dosagens para verificar se havia diferenças entre elas. Foi observado, tanto de maneira qualitativa como quantitativa, que não houve diferença entre os grupos com associação da irradiação com o pré tratamento de vitamina E nas duas dosagens, sugerindo que é necessário apenas uma quantidade certa para que a vitamina E promova seu efeito radioprotetor, o excesso de vitamina E não promoverá um efeito maior. Entretanto **LONDER & MYERS (1952)**, observaram que quanto maior a quantidade de vitamina E, menor foi a sua radioproteção. Isso pode ser decorrente do fato de que os autores utilizaram uma dose letal de radiação X no corpo todo

do animal e talvez a vitamina E em excesso promova um efeito prejudicial ao organismo. Já no trabalho de **TAREN et al. (1986)**, observou-se que pequenas concentrações de vitamina E, nos grupos que receberam 3 doses de 10, 20 e 40 UI, não promovia a ação radioprotetora. Quando utilizou 3 doses de 120 UI de vitamina E promoveu tal ação. Esta diferença de resultados entre os trabalhos supra citados, talvez seja devido à área irradiada e ao tipo de análise utilizado, uma vez que **LONDER & MYERS (1952)** avaliaram a habilidade da vitamina E na proteção da morbidade de uma dose letal de radiação X e **TAREN et al. (1986)** avaliaram a resistência à tensão das feridas cirúrgicas expostas à irradiação local.

**FELEMOVICIUS et al. (1995)** discute em seu trabalho que os efeitos da radiação ionizante são mediados principalmente pelos radicais livres de oxigênio gerados pela ação com a molécula da água. Os radicais livres são moléculas de oxigênio contendo um elétron não pareado na última órbita da eletrosfera, o que este elétron não pareado confere uma capacidade de induzir injúrias. Estas reações, que são altamente oxidantes, remove átomos de hidrogênio dos ácidos graxos, causando a peroxidação lipídica, resultando em mudanças na permeabilidade e fluidez das membranas celulares, levando-as à morte. Assim, o efeito radioprotetor da vitamina E deve-se, provavelmente, a sua ligação química com os radicais livres produzido pela irradiação, uma vez que os radicais livres, produzidos pela radiação, ligados quimicamente com um antioxidante, não poderão promover tais ações danosas ao organismo. Essa

hipótese da ação da vitamina E como radioprotetor é aceita e afirmada por muitos autores (**MALICK et al. (1978)**, **KONINGS & DRIJVER (1979)**, **KONINGS & OOSTERLOO (1980)**, **SHIRAISHI et al. (1985)**, **RANA et al. (1993)**, **SIMON et al. (1994)**, **CARROLL et al. (1995)**, **FELEMOVICIUS et al. (1995)**) que estudaram a vitamina E e outros antioxidantes.

**FELEMOVICIUS et al. (1995)** ainda em seu trabalho afirma que os oxiradicais também induzem a quebra de DNA. Os trabalhos de **GALLIGAN et al. (1997)** e **KONOPACKA et al. (1998)** que estudaram o efeito radioprotetor da vitamina E mensurando as quebras do DNA e observaram que houve diminuição significativa quando comparado com o grupo controle sugeriram que a vitamina E aumenta de alguma maneira a capacidade de reparo do DNA, ou evita a sua quebra. Entretanto **KONOPACKA et al. (1998)** afirma que as propriedades radioprotetoras da vitamina C e da vitamina E são dependentes de sua concentração e do tempo de administração.

O tipo celular também deve ser levado em consideração, visto que os trabalhos de **KAGERUD et al. (1978)** e de **SARRIA & PRASAD (1984)**, verificaram que a vitamina E não promoveu efeito radioprotetor em células tumorais e sim um efeito deletério de maneira que haja aumento na inibição do crescimento das células tumorais pela radiação. Este fato é de grande importância para os pacientes que necessitam da radioterapia, uma vez que a vitamina E promove uma radioproteção em células normais e aumento dos efeitos danosos nas células

do tumor. No mesmo trabalho de **SARRIA & PRASAD (1984)** observou-se que não houve modificações significativas no efeito da radiação na cultura de fibroblasto, resultado positivo se considerar que houve aumento da mortalidade das células tumorais e não dos fibroblastos frente à uma radiação considerada bastante ionizante (radiação gama). Esses autores sugerem que a ação da vitamina E talvez esteja associada com o aumento da resposta imune ou com o aumento da recuperação da medula óssea, além da ligação química do dl-alfa-tocoferil com os radicais livres.

Sabe-se que a vascularização é um fator bastante importante no processo de reparação tecidual, visto que em alguns trabalhos (**MOORE (1984)**, **GUIDUGLI NETO (1987)**, **ALMEIDA (1997)** e **MONTEIRO (1999)**) observaram e sugerem que a irradiação influencia de maneira negativa no sistema vascular convertendo-se em um dos fatores de atraso do processo de cicatrização. É possível que a vitamina E também tenha ação radioprotetora no sistema vascular. Nos trabalhos de **HOFFER & ROY (1975)** e **KONOPACKA et al. (1998)**, a deficiência da vitamina E na dieta promoveu fragilidade maior dos eritrócitos frente a radiação quando comparado com o grupo controle e com o grupo que recebeu suplemento de vitamina E na dieta, devido a maior susceptibilidade da peroxidação hidrogênica na membrana lipídica destas células. E o grupo que recebeu suplemento de vitamina E na dieta teve eritrócitos mais resistentes à

radiação, sugerindo que o tocoferól incorporou-se nas membranas lipídicas no momento da formação de novas células.

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 **ROSTOCK 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 do coração ou que estes tipos celulares são radioresistentes.

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 elétrons 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 pelo dl-alfa-tocoferil e não pelo óleo de oliva. Talvez esta diferença de resultado pode ser devido a 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.

Os resultados encontrados nesta pesquisa indicaram que a vitamina E promove uma ação radioprotetora no processo de reparação tecidual de feridas quando submetidos à altas doses de radiação de elétrons quando forem administradas em suas bordas, resultado positivo pois a maior preocupação no tratamento de tumores utilizando-se radioterapia é a destruição das células tumorais e permanência da integridade das células normais adjacente ao tecido neoplásico.

## **7- Conclusões**

Da discussão dos dados obtidos nesta pesquisa, dentro das condições experimentais utilizadas, pode-se concluir que:

A vitamina E , utilizada como radioprotetor, possibilitou que o desenvolvimento morfológico do tecido de granulação fosse semelhante ao desenvolvimento do tecido de granulação dos animais do grupo controle,

O desenvolvimento e ordenação das fibras colágenas nos animais do grupo irradiado, sob o efeito da vitamina E apresentaram-se semelhantes ao grupo controle, mostrando um atraso apenas no 4 dia do processo de reparação.

## 8- Referências Bibliográficas\*

1. AITASALO K. *et al.* Healing of microvascular free skin flaps in irradiated recipient tissue beds. **Am J Surg**, New York, v.164, n.6, p.662-666, Dec. 1992.
2. ALMEIDA, S.M. **Efeito da radiação de elétrons na reparação tecidual.** Piracicaba, 1997. 103p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas.
3. BERNSTEIN, E.F. *et al.* Biology of chronic radiation effect on tissue and wound healing. **Clin Plast Surg**, Philadelphia, v.20, n.3, p.435-453, July 1993.

\* De acordo com a NBR-6023 de 1989, da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT). Abreviaturas de periódicos de conformidade com a Base de Dados MEDLINE.

**Referências Bibliográficas**

4. BUBRICK, M.P. *et al.* Radiation injuries to the small and large intestine. *Apud*: GORDON, P.H. *et al.* Principles and practice of surgery for the colon, rectum and anus. **Publ Med**, St. Louis, v.47, p.835-854, 1992.
5. CARROLL, M.P. *et al.* Efficacy of radioprotective agents in preventing small and large bowel radiation injury. **Dis Colon Rectum**, Philadelphia, v.38, n.7, p.716-722, July 1995
6. DOTTO, C.A. *et al.* Quantitative study of vascular response in irradiated wounds. **Surg Gynecol Obstet**, Chicago, v.130, n.5, p.875-878, May 1970.
7. DRAKE, B.D., SCOTT, N.O. Wound healing considerations in chemotherapy and radiation therapy. **Clin Plast Surg**, Philadelphia, v.22, n.1, p.31-37, Jan. 1995.
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 nutritional regimes. **J Metab Res**, Morristown, v.1, p.319-356, 1922
10. EVANS, H.M. *et al.* The isolation from wheat germ oil of an alcohol alpha-tocopherol, having properties of vitamin E. **J Biol Chem**, Bethesda, v.113, p.329-332, 1936.
11. FELEMOVICIUS, I. *et al.* Intestinal radioprotection by vitamin E (alpha-tocopherol) **Ann Surg**, Philadelphia, v.222, n.4, p.504-510, Oct. 1995.

**Referências Bibliográficas**

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. GRILLO, H.C Origin of fibroblasts in wound healing: an autoradiographic study of inhibition of cellular proliferation by local x-irradiation. **Ann Surg**, Philadelphia, v.157, n.3, p.453-467, Mar. 1963.
14. 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. **Rev Fac Odontol Univ Sao Paulo**, São Paulo, v.1, n.4, p.6-8, out./dez. 1987.
15. HOFFER, A., ROY, M.R. Vitamin E decreases erythrocyte fragility after whole-body irradiation. **Radiat Res**, New York, v.61, n.3, p.439-443, Mar. 1975.
16. JUNQUEIRA, L.C., CARNEIRO, J. **Histologia básica**. 9.ed. Rio de Janeiro: Guanabara, 1999. 427p.
17. KAGERUD, A. *et al.* Tocopherol and local x-ray irradiation of two transplantable rat tumors. **Cancer Lett**, Limerick, v.5, n.3, p.123-129, Sept. 1978
18. KONINGS, A.W.T., DRIJVER, E.B. Radiation effects on membranes. I. Vitamin E deficiency and lipid peroxidation. **Radiat Res**, New York, v.80, n.3, p.494-501, Dec. 1979.
19. KONINGS, 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.

Referências Bibliográficas

- 20 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.
- 21 LISON, L. **Histochimie et citochemie animales** : principes et méthodes. Paris : Gauthier-villais, 1960. v.1, p.280.
- 22 LONDER, H.N., MYERS, C.E. Radioprotective effect of vitamin E. **Am J Clin Nutr**, New York, v.31, n.4, p.705, 1952
- 23 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
- 24 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: McGraw-Hill, 1996. Cap.63, p.1165-1178.
- 25 MONTEIRO, S.A.C. **Efeito da irradiação por elétrons em feridas e em tecido de granulação**. Piracicaba, 1999. 99p. Tese (Doutorado) - Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas.
- 26 MOORE, M.J. The effect of radiation on connective tissue. **Otolaryngol Clin North Am**, Philadelphia, v.17, n.2, p.389-398, May 1984.
- 27 POHLE, E.A., RITCHIE, G., Wright, .W. Studies of the effect of Roentgen Rays on Healing of Wounds. III. Histological changes in skin wounds in rats following postoperative irradiation with very small and moderate doses. **Radiology**, Easton, v.52, p.707-713, May 1931.
- 28 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

**Referências Bibliográficas**

- 29 RAVELLI, D.B. *et al.* Influencia da radiação X na cronologia do processo de reparo em feridas de extração dental. Estudo histomorfométrico em ratos. **Rev Fac Odontol Univ São Paulo**, São Paulo, v.4, n.2, p.119-125, abr./jun. 1990.
- 30 REYNOLDS, J.E.F. (Ed.), **MARTINDALE**: The extra pharmacopoeia. 29<sup>th</sup> ed. London: The Pharmaceutical Press, 1989, p.1284-1285.
- 31 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
- 32 RUDOLPH, R. *et al.* Slowed growth of cultured fibroblasts from human radiation wounds. **Plast Reconstr Surg**, Baltimore, v.82, n.4, p.669-675, Oct. 1988.
- 33 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.88-92, Jan. 1984.
- 34 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.
- 35 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.
- 36 STEIN, M., BRADY, L.W., RAVENTOS, A. The effects of radiation on extraction-wound healing in the rat. **Cancer**, Philadelphia, v.10, n.6, p.1167-1181, Nov./Dec. 1957.
- 37 TAREN, D.L. *et al.* Increasing the breaking strength of wounds exposed to preoperative irradiation using vitamin e supplementation. **Int J Vitam Nutr Res**, Bern, v.57, n.2, p.133-137, Dec. 1986.

*Referências Bibliográficas*

- 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.