

**FABRÍCIO MESQUITA TUJI**

***AVALIAÇÃO DO EFEITO RADIOPROTETOR DO  
SELENITO DE SÓDIO NO PROCESSO DE  
REPARAÇÃO TECIDUAL  
– estudo experimental em ratos–***

**Dissertação apresentada à Faculdade  
de Odontologia de Piracicaba da  
Universidade Estadual de Campinas,  
para a obtenção do título de Mestre  
em Ciências – Área de Radiologia**

**Piracicaba – SP  
- 2000 -**



**FABRÍCIO MESQUITA TUJI**

***AValiação DO EFEITO Radioprotetor DO  
SELENITO DE SÓDIO NO PROCESSO DE  
REPARAÇÃO Tecidual  
– Estudo experimental em ratos–***

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas, para a obtenção do título de Mestre Radiologia Odontológica

Este exemplar foi devidamente corrigido,  
de acordo com a Resolução CCPG-036/83  
CPG, 27/04/2001

*Solange Maria de Almeida*  
Assinatura do Orientador

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

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Claudio Costa

Prof. Dr. Mario Roberto Vizioli

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Solange Maria de Almeida

Piracicaba – SP

- 2001 -

200117237



**Ficha Catalográfica**

**T819a** Tuji, Fabrício Mesquita.  
Avaliação do efeito radioprotetor do selenito de sódio no processo de reparação tecidual. Estudo experimental em ratos. / Fabrício Mesquita Tuji.. -- Piracicaba, SP : [s.n.], 2001. xx, 121p. : il.

Orientadora : Profª Drª Solange Maria de Almeida.  
Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Radiação ionizante. 2. Selênio. 3. Radicais livres (Química) – Toxicologia. I. Almeida, Solange Maria de. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.

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



FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA  
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Tese de MESTRADO, em sessão pública realizada em 21 de Fevereiro de 2001, considerou o candidato FABRÍCIO MESQUITA TUJI aprovado.

1. Profa. Dra. SOLANGE MARIA DE ALMEIDA

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

2. Prof. Dr. JULIO CEZAR DE MELO CASTILHO

Handwritten signature of Julio Cesar de Melo Castilho in cursive script, written over a horizontal line.

3. Prof. Dr. MARIO ROBERTO VIZIOLI

Handwritten signature of Mario Roberto Vizioli in cursive script, written over a horizontal line.

*“Se você está percorrendo o caminho de seus sonhos, comprometa-se com ele. Não deixe a porta de saída aberta, através da desculpa: “Ainda não é bem isto que eu queria.” Esta frase guarda dentro dela a semente da derrota.*

*Assuma o seu caminho. Mesmo que precise dar passos incertos, mesmo que saiba que pode fazer melhor o que está fazendo. Se você aceitar suas possibilidades no presente, com toda certeza vai melhorar no futuro.*

*Mas, se negar suas limitações, jamais se verá livre delas.*

*Enfrente seu caminho com coragem, não tenha medo da crítica dos outros. E, sobretudo, não se deixe paralisar por sua própria crítica.*

*Deus estará com você nas noites insones, e enxugará as lágrimas ocultas com Seu amor.*

*Deus é o Deus dos valentes.”*

*(Autor Desconhecido)*

## **ESTE TRABALHO É DEDICADO :**

**À Deus** , que possibilitou-nos concluir mais esta etapa de nossas vidas.

*“ Senhor, que esta vela que acabo de  
acender seja luz  
e me ilumine em minhas decisões e dificuldades.*

*Que seja fogo  
para que Tu queimes em mim o egoísmo,  
orgulho, e impurezas.*

*Que seja chama  
para que Tu aqueças meu coração e  
me ensine a amar.”*

A minha família, entre eles, meus pais, Adamor e Geni Tuji e meus irmãos, Júnior e Alex Tuji, que com seu carinho, apoio e dedicação nos acompanharam nesta longa jornada, dando força e incentivo nos momentos em que mais necessitava.

*“ Porque só a coragem no caminho faz com que o  
caminho se manifeste.”*

A minha namorada Gyselle Ribeiro, pela compreensão e apoio dados ao longo deste curso, mesmo com minha ausência em vários momentos importantes da sua vida

*“ ... o que faz uma árvore forte é a sua raiz. E a raiz  
de uma planta não pode ajudar outra planta crescer.  
Estar junto no mesmo propósito, e deixar que cada  
um cresça à sua maneira, este é o caminho dos que  
desejam comungar com Deus.*

## *AGRADECIMENTOS ESPECIAIS*

Aos professores da Disciplina de Radiologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas, os quais as palavras serão pequenas para descrever tudo o que fizeram por mim, entre eles estão:

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Solange Maria de Almeida**, a qual tive a felicidade de tê-la como minha orientadora e amiga, me acolhendo em Piracicaba nestes dois anos de curso, acrescentando seus conhecimentos e amizade, e também pela sua competente orientação por este trabalho realizado. Agradeço, ainda, à oportunidade concedida ao permitir o meu ingresso no curso, no qual serei eternamente grato.

**Prof. Dr. Francisco Haiter Neto**, pelos conhecimentos transmitidos ao longo deste curso, incentivando-me a crescer profissionalmente, mostrando-me que os conhecimentos aliados à dedicação são os principais fatores para o sucesso profissional. Agradeço também a amizade, paciência e dedicação dispensada durante o nosso período de convívio.

**Prof. Dr. Frab Norberto Bóscolo**, o PAI da Radiologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, por mostrar-me o caminho da pesquisa e as virtudes de ser um pesquisador, incentivando sempre, não só a mim, bem como todos os alunos da sua disciplina os quais tem o privilégio de estarem sempre ao seu lado.

Prof. Dr. **Mario Roberto Vizioli**, pelo auxílio na realização deste trabalho, e sobretudo pelos ensinamentos transmitidos, oferecendo suas valiosas sugestões, e por mostrar-me uma maneira diferente de se observar um trabalho de pesquisa.

*Minha Eterna Gratidão*

## *AGRADECIMENTOS*

À professora Silvana Pereira, pela contribuição dada à banca examinadora e pela incansável ajuda e compreensão nos momentos em que precisei;

A minha grande amiga Ana Emília Oliveira pela presença constante nos momentos de alegria e de dificuldades, e pela espontaneidade e sinceridade de sua pessoa que contagia todos a seu redor;

A minha vizinha e amiga Adah Regina Freire pelo seu companheirismo e pelo convívio saudável, me dando forças e amizade em todos os momentos em que foram necessários;

Ao meu amigo Flávio Ricardo Manzi, que me acolheu no momento de chegada à Piracicaba, apresentando-me à 'família radiológica', com os quais tive um convívio intenso e gratificante;

Aos meus amigos de pós-graduação: **Élcio Carneiro, Melissa Damian, Ricardo Matheus, Cláudia Haiter, Luciane Araújo, Tasso Shusterschitz, Mariliani Chicarelli, José Osmar Vasconcelos, Ana Silvia Ganzerli, Mauro Martins, Márcia Spinelli, Rívea Inês Ferreira, Márcia Brunelli e Solange Monteiro**, que permitiram uma vida mais alegre e prazerosa nos anos em que convivemos juntos;

Ao funcionário **Wanderlei Francisco Vieira**, pela incansável ajuda e atenção na fase experimental desta tese.

Aos funcionários da radiologia, **Raquel, Waldeck, Gislaine e Giselda**, pela ajuda e cooperação prestados dentro e fora deste departamento;

Às disciplinas de **Patologia e Histologia** da FOP- UNICAMP, por cederem gentilmente seus laboratórios, contribuindo para a realização da parte prática deste trabalho;

À Faculdade de Odontologia de Piracicaba, representado pelo Professores Doutores **Antônio Wilson Sallum e Frab Norberto Bóscolo**, sendo respectivamente o Diretor e o Diretor Associado desta instituição, por ter me acolhido e oferecido a oportunidade de conhecer e conviver com profissionais renomados em suas áreas;

Aos funcionários da biblioteca, em especial a bibliotecária **Heloisa Maria Ceccotti**, por todo apoio fornecido quando necessário e pela normatização desta tese;

Ao físico **José Renato de Oliveira Rocha**, do Centro de Engenharia Biomédicas da UNICAMP, pela ajuda no processo de Irradiação dos animais utilizados nesta pesquisa;

À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)**, por acreditar no projeto enviado para avaliação e dar a oportunidade de realizar este trabalho;

A todos que diretamente ou indiretamente ajudaram para a realização deste trabalho, no qual seria impossível descrever somente nas páginas concedidas para agradecimentos;

À **Deus**, o qual nunca me abandonou e sempre iluminou os meus caminhos.

## **SUMÁRIO**

<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>1</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS .....</b>	<b>11</b>
<b>RESUMO .....</b>	<b>13</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>15</b>
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>17</b>
<b>2. REVISÃO DA LITERATURA .....</b>	<b>23</b>
<b>3. PROPOSIÇÃO.....</b>	<b>61</b>
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>63</b>
<b>5. PRANCHAS .....</b>	<b>71</b>
<b>6. RESULTADOS .....</b>	<b>83</b>
<b>7. DISCUSSÃO.....</b>	<b>97</b>
<b>8. CONCLUSÃO .....</b>	<b>111</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>113</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>121</b>

## **LISTA DE FIGURAS**

<b>Figura 1.1 – Fotografia Clínica da Ferida Cirúrgica do Grupo Controle (04 dias)</b>	<b>85</b>
<b>Figura 1.2 – Fotografia Clínica da Ferida Cirúrgica do Grupo Selênio (04 dias)</b>	<b>85</b>
<b>Figura 1.3 – Fotografia Clínica da Ferida Cirúrgica do Grupo Irradiado (04 dias )</b>	<b>85</b>
<b>Figura 1.4 – Fotografia Clínica da Ferida Cirúrgica do Grupo Selênio Irradiado (04 dias)</b>	<b>85</b>
<b>Figura 1.5 – Fotografia Clínica da Ferida Cirúrgica do Grupo Controle (07 dias)</b>	<b>85</b>
<b>Figura 1.6 - Fotografia Clínica da Ferida Cirúrgica do Grupo Selênio (07 dias)</b>	<b>85</b>
<b>Figura 1.7 - Fotografia Clínica da Ferida Cirúrgica do Grupo Irradiado (07 dias)</b>	<b>85</b>

**LISTA DE FIGURAS**

<b>Figura 1.8 - Fotografia Clínica da Ferida Cirúrgica do Grupo Selênio Irradiado (07 dias)</b>	<b>85</b>
<b>Figura 2.1 – Fotografia Clínica da Ferida Cirúrgica do Grupo Controle (13 dias)</b>	<b>86</b>
<b>Figura 2.2 – Fotografia Clínica da Ferida Cirúrgica do Grupo Selênio (13 dias)</b>	<b>86</b>
<b>Figura 2.3 – Fotografia Clínica da Ferida Cirúrgica do Grupo Irradiado (13 dias)</b>	<b>86</b>
<b>Figura 2.4 – Fotografia Clínica da Ferida Cirúrgica do Grupo Selênio Irradiado (13 dias)</b>	<b>86</b>
<b>Figura 2.5 – Fotografia Clínica da Ferida Cirúrgica do Grupo Controle (21 dias)</b>	<b>86</b>
<b>Figura 2.6 - Fotografia Clínica da Ferida Cirúrgica do Grupo Selênio (21 dias)</b>	<b>86</b>
<b>Figura 2.7 - Fotografia Clínica da Ferida Cirúrgica do Grupo Irradiado (21 dias)</b>	<b>86</b>
<b>Figura 2.8 - Fotografia Clínica da Ferida Cirúrgica do Grupo Selênio Irradiado (21 dias)</b>	<b>86</b>
<b>Figura 3.1 – Coloração por Hematoxilina-Eosina com aumento de 2.5 X 1.25 X 10 do Grupo Controle (04 dias)</b>	<b>87</b>
<b>Figura 3.2 – Coloração por Hematoxilina-Eosina com aumento de 2.5 X 1.25 X 10 do Grupo Selênio (04 dias)</b>	<b>87</b>

**LISTA DE FIGURAS**

<b>Figura 3.3 – Coloração por Hematoxilina-Eosina com aumento de 2.5 X 1.25 X 10 do Grupo Irradiado (04 dias)</b>	<b>87</b>
<b>Figura 3.4 – Coloração por Hematoxilina-Eosina com aumento de 2.5 X 1.25 X 10 do Grupo Selênio Irradiado (04 dias)</b>	<b>87</b>
<b>Figura 3.5 – Coloração por Hematoxilina-Eosina com aumento de 2.5 X 1.25 X 10 do Grupo A Controle (07 dias)</b>	<b>87</b>
<b>Figura 3.6 - Coloração por Hematoxilina-Eosina com aumento de 2.5 X 1.25 X 10 do Grupo Selênio (07 dias)</b>	<b>87</b>
<b>Figura 3.7 - Coloração por Hematoxilina-Eosina com aumento de 2.5 X 1.25 X 10 do Grupo Irradiado (07 dias)</b>	<b>87</b>
<b>Figura 3.8 - Coloração por Hematoxilina-Eosina com aumento de 2.5 X 1.25 X 10 do Grupo Selênio Irradiado (07 dias)</b>	<b>87</b>
<b>Figura 4.1 – Coloração por Hematoxilina-Eosina com aumento de 2.5 X 1.25 X 10 do Grupo Controle (13 dias)</b>	<b>88</b>
<b>Figura 4.2 – Coloração por Hematoxilina-Eosina com aumento de 2.5 X 1.25 X 10 do Grupo Selênio (13 dias)</b>	<b>88</b>
<b>Figura 4.3 – Coloração por Hematoxilina-Eosina com aumento de 2.5 X 1.25 X 10 do Grupo Irradiado (13 dias)</b>	<b>88</b>
<b>Figura 4.4 – Coloração por Hematoxilina-Eosina com aumento de 2.5 X 1.25 X 10 do Grupo Selênio Irradiado (13 dias)</b>	<b>88</b>
<b>Figura 4.5 – Coloração por Hematoxilina-Eosina com aumento de 2.5 X 1.25 X 10 do Grupo Controle (21 dias)</b>	<b>88</b>

**LISTA DE FIGURAS**

<b>Figura 4.6 - Coloração por Hematoxilina-Eosina com aumento de 2.5 X 1.25 X 10 do Grupo Selênio (21 dias)</b>	<b>88</b>
<b>Figura 4.7 - Coloração por Hematoxilina-Eosina com aumento de 2.5 X 1.25 X 10 do Grupo Irradiado (21 dias)</b>	<b>88</b>
<b>Figura 4.8 - Coloração por Hematoxilina-Eosina com aumento de 2.5 X 1.25 X 10 do Grupo Selênio Irradiado (21 dias)</b>	<b>88</b>
<b>Figura 5.1 – Coloração por Hematoxilina-Eosina com aumento de 6.3 X 1.25 X 10 do Grupo Controle (07 dias)</b>	<b>89</b>
<b>Figura 5.2 – Coloração por Hematoxilina-Eosina com aumento de 6.3 X 1.25 X 10 do Grupo Selênio (07 dias)</b>	<b>89</b>
<b>Figura 5.3 – Coloração por Hematoxilina-Eosina com aumento de 6.3 X 1.25 X 10 do Grupo Irradiado (07 dias)</b>	<b>89</b>
<b>Figura 5.4 – Coloração por Hematoxilina-Eosina com aumento de 6.3 X 1.25 X 10 do Grupo Selênio Irradiado (07 dias)</b>	<b>89</b>
<b>Figura 5.5 – Coloração por Hematoxilina-Eosina com aumento de 6.3 X 1.25 X 10 do Grupo Controle (13 dias)</b>	<b>89</b>
<b>Figura 5.6 - Coloração por Hematoxilina-Eosina com aumento de 6.3 X 1.25 X 10 do Grupo Selênio (13 dias)</b>	<b>89</b>
<b>Figura 5.7 - Coloração por Hematoxilina-Eosina com aumento de 6.3 X 1.25 X 10 do Grupo Irradiado (13 dias)</b>	<b>89</b>
<b>Figura 5.8 - Coloração por Hematoxilina-Eosina com aumento de 6.3 X 1.25 X 10 do Grupo Selênio Irradiado (13 dias)</b>	<b>89</b>

**LISTA DE FIGURAS**

<b>Figura 6.1 – Coloração por Hematoxilina-Eosina com aumento de 6.3 X 1.25 X 10 do Grupo Controle (21 dias )</b>	<b>90</b>
<b>Figura 6.2 – Coloração por Hematoxilina-Eosina com aumento de 6.3 X 1.25 X 10 do Grupo Selênio (21 dias)</b>	<b>90</b>
<b>Figura 6.3 – Coloração por Hematoxilina-Eosina com aumento de 6.3 X 1.25 X 10 do Grupo Irradiado (21 dias)</b>	<b>90</b>
<b>Figura 6.4 – Coloração por Hematoxilina-Eosina com aumento de 6.3 X 1.25 X 10 do Grupo Selênio Irradiado (21 dias)</b>	<b>90</b>
<b>Figura 7.1 – Coloração por Picrosirius com aumento de 2.5 X 1.25 X 10 do Grupo Controle (04 dias )</b>	<b>91</b>
<b>Figura 7.2 – Coloração por Picrosirius com aumento de 2.5 X 1.25 X 10 do Grupo Selênio (04 dias )</b>	<b>91</b>
<b>Figura 7.3 – Coloração por Picrosirius com aumento de 2.5 X 1.25 X 10 do Grupo Irradiado (04 dias)</b>	<b>91</b>
<b>Figura 7.4 – Coloração por Picrosirius com aumento de 2.5 X 1.25 X 10 do Grupo Selênio Irradiado (04 dias)</b>	<b>91</b>
<b>Figura 7.5 – Coloração por Picrosirius com aumento de 2.5 X 1.25 X 10 do Grupo Controle (07 dias )</b>	<b>91</b>
<b>Figura 7.6 - Coloração por Picrosirius com aumento de 2.5 X 1.25 X 10 do Grupo Selênio (07 dias)</b>	<b>91</b>
<b>Figura 7.7 - Coloração por Picrosirius com aumento de 2.5 X 1.25 X 10 do Grupo Irradiado (07 dias)</b>	<b>91</b>

**LISTA DE FIGURAS**

<b>Figura 7.8 - Coloração por Picrosirius com aumento de 2.5 X 1.25 X 10 do Grupo Selênio Irradiado (07 dias)</b>	<b>91</b>
<b>Figura 8.1 – Coloração por Picrosirius com aumento de 2.5 X 1.25 X 10 do Grupo Controle (13 dias)</b>	<b>92</b>
<b>Figura 8.2 – Coloração por Picrosirius com aumento de 2.5 X 1.25 X 10 do Grupo Selênio (13 dias)</b>	<b>92</b>
<b>Figura 8.3 – Coloração por Picrosirius com aumento de 2.5 X 1.25 X 10 do Grupo Irradiado (13 dias)</b>	<b>92</b>
<b>Figura 8.4 – Coloração por Picrosirius com aumento de 2.5 X 1.25 X 10 do Grupo Selênio Irradiado (13 dias)</b>	<b>92</b>
<b>Figura 8.5 – Coloração por Picrosirius com aumento de 2.5 X 1.25 X 10 do Grupo Controle (21 dias)</b>	<b>92</b>
<b>Figura 8.6 - Coloração por Picrosirius com aumento de 2.5 X 1.25 X 10 do Grupo Selênio (21 dias)</b>	<b>92</b>
<b>Figura 8.7 - Coloração por Picrosirius com aumento de 2.5 X 1.25 X 10 do Grupo Irradiado (21 dias)</b>	<b>92</b>
<b>Figura 8.8 - Coloração por Picrosirius com aumento de 2.5 X 1.25 X 10 do Grupo Selênio Irradiado (21 dias)</b>	<b>92</b>
<b>Figura 9.1 – Coloração por Picrosirius com aumento de 6.3 X 1.25 X 10 do Grupo Grupo Controle (04 dias)</b>	<b>93</b>
<b>Figura 9.2 – Coloração por Picrosirius com aumento de 6.3 X 1.25 X 10 do Grupo Grupo Selênio (04 dias)</b>	<b>93</b>

**LISTA DE FIGURAS**

<b>Figura 9.3 – Coloração por Picrosirius com aumento de 6.3 X 1.25 X 10 do Grupo Grupo Irradiado (04 dias)</b>	<b>93</b>
<b>Figura 9.4 – Coloração por Picrosirius com aumento de 6.3 X 1.25 X 10 do Grupo Selênio Irradiado (04 dias)</b>	<b>93</b>
<b>Figura 9.5 – Coloração por Picrosirius com aumento de 6.3 X 1.25 X 10 do Grupo Grupo Controle (07 dias )</b>	<b>93</b>
<b>Figura 9.6 - Coloração por Picrosirius com aumento de 6.3 X 1.25 X 10 do Grupo Grupo Selênio (07 dias )</b>	<b>93</b>
<b>Figura 9.7 - Coloração por Picrosirius com aumento de 6.3 X 1.25 X 10 do Grupo Grupo Irradiado (07 dias)</b>	<b>93</b>
<b>Figura 9.8 - Coloração por Picrosirius com aumento de 6.3 X 1.25 X 10 do Grupo Grupo Selênio Irradiado (07 dias)</b>	<b>93</b>
<b>Figura 10.1 – Coloração por Picrosirius com aumento de 6.3 X 1.25 X 10 do Grupo Controle (13 dias)</b>	<b>94</b>
<b>Figura 10.2 – Coloração por Picrosirius com aumento de 6.3 X 1.25 X 10 do Grupo Selênio (13 dias)</b>	<b>94</b>
<b>Figura 10.3 – Coloração por Picrosirius com aumento de 6.3 X 1.25 X 10 do Grupo Irradiado (13 dias)</b>	<b>94</b>
<b>Figura 10.4 – Coloração por Picrosirius com aumento de 6.3 X 1.25 X 10 do Grupo Selênio Irradiado (13 dias)</b>	<b>94</b>
<b>Figura 10.5 – Coloração por Picrosirius com aumento de 6.3 X 1.25 X 10 do Grupo Controle (21 dias)</b>	<b>94</b>

**LISTA DE FIGURAS**

Figura 10.6 - Coloração por Picrosirius com aumento de 6.3 X 1.25 X 10 do Grupo Selênio (21 dias)	94
Figura 10.7 - Coloração por Picrosirius com aumento de 6.3 X 1.25 X 10 do Grupo Irradiado (21 dias)	94
Figura 10.8 - Coloração por Picrosirius com aumento de 6.3 X 1.25 X 10 do Grupo Selênio Irradiado (21 dias)	94
Figura 11.1 – Coloração por Azul de Toluidina com aumento de 16 X 1.25 X 10 do Grupo Controle (07 dias) – 180°	95
Figura 11.2 – Coloração por Azul de Toluidina com aumento de 16 X 1.25 X 10 do Grupo Controle (07 dias) – 90°	95
Figura 11.3 - Coloração por Azul de Toluidina com aumento de 16 X 1.25 X 10 do Grupo Selênio (07 dias) – 180°	95
Figura 11.4 – Coloração por Azul de Toluidina com aumento de 16 X 1.25 X 10 do Grupo Selênio (07 dias) – 90°	95
Figura 11.5 – Coloração por Azul de Toluidina com aumento de 16 X 1.25 X 10 do Grupo Irradiado (07 dias) – 180°	95
Figura 11.6 - Coloração por Azul de Toluidina com aumento de 16 X 1.25 X 10 do Grupo Irradiado (07 dias) – 90°	95
Figura 11.7 - Coloração por Azul de Toluidina com aumento de 16 X 1.25 X 10 do Grupo Selênio Irradiado (07 dias) – 180°	95
Figura 11.8 - Coloração por Azul de Toluidina com aumento de 16 X 1.25 X 10 do Grupo Selênio Irradiado (07 dias) – 90°	95

**LISTA DE FIGURAS**

<b>Figura 12.1 – Coloração por Azul de Toluidina com aumento de 16 X 1.25 X 10 do Grupo Irradiado (13 dias) – 180°</b>	<b>96</b>
<b>Figura 12.2 – Coloração por Azul de Toluidina com aumento de 16 X 1.25 X 10 do Grupo Irradiado (13 dias) – 90°</b>	<b>96</b>
<b>Figura 12.3 – Coloração por Azul de Toluidina com aumento de 16 X 1.25 X 10 do Grupo Irradiado (21 dias) – 180°</b>	<b>96</b>
<b>Figura 12.4 – Coloração por Azul de Toluidina com aumento de 16 X 1.25 X 10 do Grupo Irradiado (21 dias) – 90°</b>	<b>96</b>

## **LISTA DE ABREVIATURAS**

bw	-	por peso corpóreo
µg	-	micrograma
ng	-	nanograma
µg/ml	-	Micrograma por mililitro
µM	-	micromolar
µm	-	micrômetro
cGy	-	centigray
DNA	-	Ácido desoxirribonucléico
DRF	-	Fator de redução da dose
GSH-Px	-	Glutathiona peroxidase
Gy	-	Gray
ip	-	intraperitoneal
J/m <sup>2</sup>	-	Joule/metro quadrado
kg	-	kilograma
kVp	-	quilovoltagem/pico
mA	-	miliamperagem
MeV	-	Milhão de elétron volt

**AVALIAÇÃO DO EFEITO RADIOPROTETOR DO SELENITO DE SÓDIO NO PROCESSO DE REPARAÇÃO TECIDUAL**  
**- ESTUDO EXPERIMENTAL EM RATOS -**  
**LISTA DE ABREVIATURA**

<b>Nm</b>	-	<b>nanômetro</b>
<b>nM</b>	-	<b>nanomolar</b>
<b>pH</b>	-	<b>Potencial hidrogeniônico</b>
<b>ppm</b>	-	<b>Dose por milhão</b>
<b>R</b>	-	<b>Roentgen</b>
<b>rad</b>	-	<b>Radiation absorbed dose</b>
<b>sc</b>	-	<b>Subcutâneo</b>
<b>UI</b>	-	<b>Unidade internacional</b>
<b>UV</b>	-	<b>ultravioleta</b>

## **RESUMO**

O presente trabalho teve como finalidade avaliar a ação do Selenito de Sódio (Selênio) como substância radioprotetora através do processo de reparação tecidual. Para isto, foram produzidas feridas retangulares (2,5X 1,5 cm) na região dorsal de ratos, que foram então divididos em quatro grupos: Controle, onde foram feitos somente as feridas; Selênio, no qual foram administrados 2,0 mg de Selenito de Sódio; Irrradiado, onde as bordas das feridas foram irradiadas (6 MeV de radiação de elétrons em dose única) e; Selênio irradiado, no qual administrou-se o selênio 24 horas antes da exposição à radiação.

Após 4, 7, 13 e 21 dias da produção das feridas, todos os animais, controle e irradiados, foram sacrificados e a ação radioprotetora do Selênio foi avaliada através da análise morfológica, histoquímica e avaliação por luz polarizada.

**RESUMO**

Os resultados obtidos mostraram que a aplicação de selenito de sódio administrado 24 horas antes de altas doses de irradiação de elétrons (6 MeV) em tecido de granulação apresentou-se como radioprotetor eficaz, visto que o grupo irradiado no qual foi administrado o selenito de sódio comportou-se histologicamente semelhante ao grupo controle.

## **ABSTRACT**

**T**he aim of this study was to evaluate the Sodium Selenite as protection substance. It were made rectangular wounds (2,5 X 1,5 cm) in the dorsal region of the rats, in order to stimulate the growing of the repair process. The rats were then divided into four groups as follows: control group, where only were made the wounds; selenium group, where 2 mg of sodium selenite were administrated to the animals; irradiated group, where the border of the wounds were irradiated (6 MeV of electron radiation in a single dose) and; irradiated plus selenium group, where the selenium was administrated 24 hours before the irradiation.

The animals from all the groups were sacrificed at 4, 7, 13 and 21 days after the procedures above, and histological and structural observations of the granulation tissue were made by means of morphological, histochemical and polarized light investigation.

**ABSTRACT**

The results showed that the administration of sodium selenite made 24 hours before the irradiation through high doses (6 MeV) of electron radiation on the granulation tissue has produced a remarkable radioprotection effect, as showed through the methods which were employed.

## **1. INTRODUÇÃO**

Logo após a descoberta dos Raios-X em 1895 por Wilhelm Röntgen, verificou-se que o uso em excesso da radiação X poderia provocar efeitos deletérios aos organismos vivos, quando um fabricante de tubos à vácuo chamado Emil Grubbé apresentou uma dermatite localizada na mão, sendo considerada como causa a exposição excessiva aos raios X.

Esses efeitos deletérios classificaram as radiações X como ionizante, pois radiação significa emissão de energia, enquanto ionizante é a propriedade de remover elétrons dos átomos constituintes das moléculas dos organismos, podendo ser divididas em eletromagnéticas e corpusculares. As radiações eletromagnéticas apresentam a propagação de energia sem deslocamento de matéria, sendo feita em forma de ondas. As radiações de partículas ou corpusculares são providas de massa podendo ser produzida por desintegração nuclear ou produzidas artificialmente. Este tipo de radiação apresenta um poder

**INTRODUÇÃO**

de penetração menor em relação às eletromagnéticas, sendo utilizadas para tratamento de lesões superficiais ou de média profundidade.

Com isso, pesquisas estão continuamente sendo desenvolvidas a fim de, entre outros motivos, tentar diminuir os efeitos deletérios provocados não só pela radiação X, mas também por outros tipos de radiações ionizantes, visto que a utilização das radiações, seja como meio de diagnóstico à obtenção de energia e forma terapêutica, já é uma realidade, fato que pode ser confirmado desde as primeiras evidências como forma terapêutica no tratamento de um "sinal capilar" em 1897 por FREUD ou até mesmo através de catástrofes nucleares como Hirishima, Nagasaki e Chernobyl e, no Brasil, em Goiania com o Césio 137.

Apesar de existirem normas de proteção quando a radiação é utilizada como meio de diagnóstico ou tratamento, como a calibração do aparelho, a filtração da radiação X feita pelos filtros de alumínio que os próprios aparelhos possuem, a colimação dos raios-X pelos diafragmas de chumbo que determinam a área irradiada no paciente, sabe-se que esta interação resulta em efeitos benéficos e deletérios, que quase sempre ocorrem conjuntamente. Por estes motivos, têm-se atualmente pesquisado possíveis substâncias que diminuam os efeitos deletérios provocados pela exposição à estas radiações, conhecidas como Radioprotetores (CEKAN *et al.*; 1985; LINDH *et al.*, 1996). Essas substâncias são utilizadas principalmente quando a radiação ionizante é utilizada com finalidade terapêutica em pacientes portadores de certos tipos de câncer, o que vem preocupando devido à alta porcentagem do aparecimento de complicações

**INTRODUÇÃO**

maiores, como é o caso da radioterapia na região abdominal e pélvica, na qual mais de 17% dos pacientes desenvolvem grandes complicações (EMPERY *et al.*, 1992). Dos pacientes que são submetidos à radioterapia, como tratamento do câncer, 5% necessita de cirurgias para remoção de injúrias causadas por tal tratamento segundo EMPERY *et al.* (1992) e CEKAN *et al.* (1985), devido à grande dose submetida às células neoplásicas que acabam afetando células normais circunvisinhas que aumentam a sensibilidade dependendo da região onde está localizada a lesão.

No entanto, para esses pacientes que obrigatoriamente têm que passar por tratamentos radioterápicos existe uma preocupação por parte dos profissionais em diminuir os efeitos deletérios das radiações ionizantes, podendo-se citar a crescente utilização dos Aceleradores Lineares para tratamentos radioterápicos, que produzem feixes de elétrons altamente colimados, sendo possível determinar a energia do feixe de radiação, tornando-se fácil controlar a profundidade de penetração do mesmo.

Um dos fatores que contribuem para os danos causados pela radiação é o fato de que no exato momento em que a radiação ionizante é absorvida pelos tecidos vivos, ocorrem nas células reações químicas com produção de radicais livres que provocam danos ao DNA.

Os radioprotetores têm a propriedade de proteger o tecido vivo, ou pelo menos, diminuir os danos a ele causados pela radiação. Seu mecanismo de ação

**INTRODUÇÃO**

ainda não está claro, porém diversos autores como SANDSTRÖM *et al.* (1989); BOREK (1993) e CEKAN *et al.* (1985) citam que sua ação é decorrente da ligação química que é realizada entre certas enzimas que são ativadas por estas substâncias e os radicais livres produzidos pela radiação.

Outras pesquisas realizadas com animais demonstraram que a radiação ionizante afeta desfavoravelmente o processo de cicatrização de feridas induzidas como as de ALMEIDA (1997); LOURENÇO (1998) e MONTEIRO (1999). Estudos mostram que o tecido de granulação de feridas expostas à radiação ionizante apresenta uma inibição no início da hidroxilação da prolina e na redução da quantidade de colágeno depositado, além da diminuição da resistência à tensão do tecido neo-formado. O efeito prejudicial da radiação pode ser devido ao início da peroxidação de lipídios, a qual ocorre principalmente dentro da membrana celular com alta concentração de ácidos graxos poli-insaturados. Como as membranas microssomais e mitocondriais apresentam uma grande quantidade de ácidos graxos poli-insaturados, elas são susceptíveis à peroxidação lipídica, que tem como uma das conseqüências a perda da integridade dessas membranas e a diminuição no funcionamento celular (WATANABE, 1994; ALMEIDA, 1997).

Outro estudo observou os níveis de anti-oxidantes enzimáticos e não enzimáticos na cicatrização de feridas cutâneas com o envolvimento de radicais livres (KUMAR *et al.*, 1988). Esse estudo verificou que todos os anti-oxidantes enzimáticos estudados (superóxido dismutase, glutathionina peroxidase, glutathion-S-transferase, catalase, entre outros) e não enzimático (como ácido ascórbico,

**INTRODUÇÃO**

glutathione e vitamina E encontram-se reduzidos após o ferimento. Esses resultados mostram que o processo de injúria tecidual resulta em uma diminuição de eliminadores de radicais livres, tanto enzimáticos quanto não-enzimáticos, que recuperam-se parcial ou totalmente após algum tempo.

Diversos estudos como o de CEKAN *et al.* (1985); HOLLÓ & ZLATAROV, (1960) e BRECCIA *et al.* (1969) demonstram que a administração de sais de selênio, como o selenito de sódio tem aumentado a sobrevivência de ratos quando expostos a doses letais de raios X. Uma das explicações para este fato é o mecanismo antioxidante do selênio que segundo vários autores aumenta o nível da atividade da enzima glutathione peroxidase.

Visto que a ação destes antioxidantes está diretamente ligada à captura dos radicais livres formados pelas radiações ionizantes e que o nível destes antioxidantes aumenta quando se utiliza o selenito de sódio, o presente trabalho propõe-se a pesquisar esta substância, principalmente quanto ao seu efeito radioprotetor, avaliando-o através do processo de reparação tecidual.

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

A interação das radiações ionizantes com o tecido vivo pode provocar diversos efeitos deletérios ao organismo, inclusive com perpetuação de alterações quando os gametas são irradiados. Devido a radiação ser uma constante na vida de todos, seja através de radiações usadas com finalidade de diagnóstico, finalidade radioterápica, explosões nucleares e até mesmo através dos raios solares, a sua prevenção vem sendo motivo de preocupação para os profissionais da área, procurando soluções que minimizem ou eliminem os efeitos produzidos por esses tipos de radiações.

Estas alterações são decorrentes da formação de radicais livres quando a radiação interage com a matéria, principalmente a água, que constitui a maior parte de nosso organismo, o que acarreta a formação de radicais hidroxilas (OH), prótons ( $H^+$ ) e, principalmente, o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), provocando danos às

estruturas críticas da célula, dentre elas os DNAs, enzimas e os constituintes da membrana (KUMAR *et al.*, 1988), que segundo LECCIA *et al.* (1993) é o principal alvo dos radicais livres. Este fato também é observado por TAPPEL (1965), onde afirma que a mensuração destes radicais livres é difícil de ser realizada, principalmente pela sua baixa concentração e pelo pequeno tempo de vida destes radicais.

Segundo KUMAR *et al.* (1988), existem enzimas antioxidantes, também denominadas de antioxienzimas, que são responsáveis pela diminuição dos efeitos provocados pelos radicais livres no organismo, sendo elas a glutathiona peroxidase, que tem ação na  $H_2O_2$  e nos peróxidos orgânicos; catalase, que age na  $H_2O_2$  e a superóxido dismutase, que tem ação na desproporção do  $O^{-2}$  para a  $H_2O_2$ . Além destas enzimas existem substâncias que protegem contra a formação e reparo de radicais livres, que são as substâncias endógenas (glutathiona e outros antioxidantes fisiológicos) e exógenas (aminotiois ou sulfidrilas). Seus mecanismos de ação ainda são desconhecidos, porém BAILEY (1968) relata que existem diversas hipóteses que tentam explicá-las, como a interação química dessas substâncias com os radicais livres produzidos durante a radiólise da água, a diminuição da tensão do oxigênio celular, reações com as moléculas irradiadas provocando sua reparação, entre outras.

Sendo assim, sabendo-se que um dos mais importantes aspectos da radiobiologia atualmente é a radioproteção química, é de grande interesse o estudo de substâncias radioprotetoras, entre estas o selênio, que age nestas enzimas

antioxidantes com a finalidade de diminuir os efeitos deletérios provocados pelo uso da radiação, principalmente quando utilizado como forma terapêutica.

## **2.1 – Metabolismo do Selênio.**

O selênio é um metal que está presente no sítio de ação da enzima glutathiona peroxidase que promove uma diminuição no nível de peróxido nos tecidos. Entre os sais de selênio, os mais utilizados em pesquisas para a radioproteção são o selenato de sódio e o selenito de sódio, que apresentam em humanos uma dose mínima de toxicidade de aproximadamente 22mg/kg para o selenato e de 1 a 5 mg/kg para o selenito, com os sintomas de náuseas, vômitos, dores abdominais e tremores que são normalizados em 24 horas, segundo ELLENHORN & BARCELOUX (1988).

Evidências atuais comprovam que o selênio é uma substância essencial em humanos. Em parte da China, o selênio é administrado em grupos de populações selecionados para prevenir a cardiomiopatia juvenil, conhecida também como desordem de Keshan. Na Finlândia, investigações epidemiológicas em áreas com baixo nível de selênio, indicou uma associação deste decréscimo com o aumento no risco de desordens cardiovasculares. Mais recentemente, algumas investigações demonstraram uma inversa relação no nível de selênio com o risco de câncer em áreas com baixo e alto nível deste metal (SWANSON *et al.*, 1991), com uma inversa relação entre o nível de selênio no soro e o risco de câncer, particularmente o câncer de pâncreas (HAYES, 1994).

Desde 1957, as pesquisas em torno do selênio e sua importância na nutrição tem aumentado constantemente, quando foi descoberta sua função na proteção contra a necrose de fígado, através de experimentos com ratos por SCWARZ & FOLTZ. Posteriormente, levantou-se a hipótese da ação antioxidante, protegendo membranas e grupos sulfidrilas, apresentando para isto um metabolismo específico.

Em 1960, ZALKIN *et al.* compararam o mecanismo da vitamina E com o selênio em relação a inibição da peroxidação lipídica em galinhas. Como resultado, verificou-se que a dieta com selenito proporciona uma atividade antioxidante, o que permitiu a estes autores concluir que os selenoaminoácidos e os compostos derivados do selênio proporcionam uma ação antioxidante lipídica substituindo, assim, a vitamina E. Esses autores também verificaram um fato considerado inesperado, o de que os compostos derivados do selênio quando administrados em altas concentrações apresentam-se menos eficazes quando comparados ao  $\alpha$ -tocoferol (vitamina E)

HAMILTON *et al.* em 1963 citam que desde que se tiveram evidências de substâncias que agem como antioxidantes, a possibilidade do selênio funcionar com um mecanismo similar foi considerada, portanto os autores testaram esta substância até descobrirem sua grande ação antioxidante em relação às outras substâncias anteriormente estudadas, sendo teoricamente possível se obter uma grande ação antioxidante lipídica através de uma alimentação com baixas doses de selênio. Com isso, os autores relatam que, em ovelhas, o selênio é o que encontra-se em maior concentração, possuindo a melhor atividade antioxidante concluindo

que o selenometionina é caracterizado como uma proteína rapidamente sintetizada, e que este molde de distribuição é similar ao encontrado em aminoácidos naturais e no metione.

Em 1966, HANSSON *et al.*, utilizando o  $^{75}\text{Se}$ , que é uma forma radioativa do selênio, através da auto-radiografia determinaram a distribuição e o destino da selenometionina em vários órgãos e tecidos de ratos. Os resultados mostraram que a distribuição após a injeção do selênio foi diferente, sendo que o pâncreas rapidamente acumulou uma alta concentração de selenometionina, apresentando a mais alta concentração em relação aos outros órgãos e tecidos estudados no período de cinco minutos a quatro horas. Porém após este período, houve um decréscimo considerável desta concentração. Em relação ao fígado, este órgão acumulou a maior quantidade de selenometionina, mantendo uma constante radioatividade durante o período de observação. Também foi verificada uma alta concentração no rim, que até certo ponto foi considerada estável.

Em 1967, EWAN *et al.* observou que quando injetadas grandes quantidades de selênio em ratos, juntamente com uma dieta a base de selênio, a quantidade retida de selênio aumenta de acordo com a quantidade de selênio injetada, porém quando expressado em porcentagem de dose, esta decresce com o aumento da dose injetada.

Em 1970, SANDSTEAD *et al.* relatam que diversas substâncias presentes na nutrição dos seres-humanos, como o cobre, zinco, cromo, manganês e selênio, são

bem conhecidas, porém informações a respeito da fisiologia humana ainda não são bem explicadas. Esses mesmos autores relatam ainda que estes elementos são essenciais para os mamíferos, apresentando funções metabólicas específicas, e que sua deficiência resulta em síndromes que podem ser observadas no homem. Suas funções metabólicas podem influenciar em algumas proteínas ou outras moléculas, podendo também funcionar como coordenador de forças entre essas moléculas. Podem também agir em algumas enzimas (metaloenzimas), sendo essencial para a função das mesmas.

O metabolismo do selênio quanto à retenção tecidual e excreção foi analisado por BURK *et al.* em 1972, utilizando para isto ratos. Foi administrado selênio em forma de selenito de sódio, tanto na dieta como injetado intraperitonealmente. Os animais foram divididos em vários grupos de acordo com a dosagem de selênio, apresentando o grupo controle; o grupo que recebeu 0,10 ppm de selênio com vitamina E; o grupo que recebeu 0,25 ppm de selênio; outro grupo que foi administrado 0,50 ppm de selênio e por fim o último grupo que recebeu 1,0 ppm de selênio. Após 35 dias estes animais foram submetidos a uma injeção intraperitoneal de 20, 50 e 200 µg de selenito de sódio. Como resultado observou-se que o tempo necessário para a metade da excreção diminuiu em relação ao aumento da quantidade de selênio, apresentando diferença estatística somente o grupo com 0,10 ppm de selênio que necessitou de mais tempo para excreção. A excreção fecal foi em torno de 10% em todos os grupos e, aparentemente, não apresentou relação com a quantidade de selênio administrada.

Entretanto a excreção urinária apresentou uma íntima relação com o nível de selênio na dieta, apresentando seu menor nível (aproximadamente 6%) no grupo controle e seu maior (aproximadamente 67%) no grupo com 1,0 ppm de selênio. A excreção pela via respiratória foi considerada pequena, em torno de 10%, exceto no grupo que foi administrado 200 µg de selênio, o qual apresentou uma volatilização de 35% durante o primeiro dia. Quanto a retenção, foi verificado que o fígado apresentou um comportamento único, com baixa retenção no grupo controle, porém no grupo com 0,10 ppm esta retenção quase quadruplicou, e nos grupos com maiores administração de selênio houve um decréscimo nesta retenção. Esses resultados permitiram aos autores concluir que a principal via de excreção do selênio para os ratos é a urinária, independentemente das circunstâncias.

Estudos em relação ao metabolismo de substâncias derivadas do selênio também foram realizados por THOMSON & STEWART em 1973, utilizando a selenometionina e o selenito, sendo verificado que apresentavam o mesmo metabolismo. Para isto utilizaram-se diversos grupos de ratos submetidos à uma dieta contendo 0,05mg de selênio. Dois destes grupos receberam uma dose de 5µg de selênio com uma injeção intravenosa e outra por intubação intragástrica. Como resultado observou-se que no primeiro dia, os animais que receberam selenito pela via intravenosa excretaram 16% da dose recebida pela urina, enquanto que o selenito recebido pela via oral a porcentagem foi de 10%. O grupo que recebeu selenometionina apresentou uma excreção de 2% por ambas as vias. A excreção fecal obteve o seu apogeu no segundo dia e apresentou o dobro de excreção para

a via oral em relação à via intravenosa, acumulando uma perda, no final da semana, de 21% e 16% para as doses orais de selenito e selenometionina, respectivamente, e 13% e 12% para a via intravenosa. Combinada a excreção urinária e fecal até o final da semana, obteve-se um resultado de 33% da dose oral de selenito e 32% da dose intravenosa, e para os ratos que receberam selenometionina, houve uma perda de 20% para a dose oral e 17% para a dose intravenosa. Com isso, os resultados para o nível de retenção, de acordo com o nível de excreção do selenito, foi de 67% para a dose oral e 68% para a dose intravenosa, enquanto que para o selenometionina foi de 80,5% para a dose oral e 83% para a dose intravenosa.

Em 1966, HOPKINS *et al.* analisaram a distribuição da quantidade de selênio nos tecidos de ratos e seus efeitos, utilizando para isto selenito de sódio injetável intraperitonealmente com uma dose de 3 $\mu$ c e, adicionado em suas dietas, várias concentrações desta mesma substância (0,1, 1 e 5 ppm) por um período de duas semanas antes da injeção. Foi verificado que a excreção urinária do selênio aumentava de acordo com o aumento da dosagem e que houve uma quantidade substancial de selênio no fígado e nos rins. Os animais que tiveram em sua dieta 5ppm de selênio apresentaram mosqueamento no fígado. Foi também demonstrado por estes autores que a retenção do selênio injetado diminui com a prévia ingestão desta substância na dieta e que o decréscimo na retenção do selênio está diretamente relacionado com o aumento da excreção urinária.

O metabolismo do selênio também foi verificado em humanos no trabalho de THOMSON & STEWART, realizado em 1974. Três voluntárias do sexo feminino com idades diferentes foram submetidas a uma dose oral de  $10\mu\text{Ci} [^{75}\text{Se}]$  selenito, contendo aproximadamente  $10\mu\text{g Se}$ . Foram feitas coletas de urina, fezes, sangue e mensuração da excreção respiratória, para determinar o nível de absorção e excreção. Como resultado, verificou-se que o selênio era rapidamente excretado pela urina durante o primeiro dia, e que a maior taxa de excreção (0,4-1,4%) ocorreu durante as duas primeiras horas, indicando uma rápida absorção deste elemento pelo organismo, com um decréscimo para menos de 0,1% na décima segunda hora, totalizando uma taxa de excreção que variou de 7% a 14% da dose durante os quatorze dias de pesquisa. A excreção fecal apresentou seu maior nível durante o quarto e o quinto dia, totalizando uma excreção durante os quatorze dias com um índice que variou de 33% a 58% da dose, enquanto que a dose absorvida pelo intestino variou de 44% a 70%. A dose total absorvida pelo organismo, determinada pela mensuração da perda através da excreção fecal e urinária, foi de 38% a 60% para o sétimo dia e de 35% a 53% para o décimo quarto dia. Com isso, os autores concluíram que a absorção do selenito variou consideravelmente para as três pacientes e que a média de absorção foi significativamente menor que nos ratos (92%), provavelmente devido a uma menor absorção intestinal do selênio pelo homem.

Em 1989, PATTERSON *et al.* desenvolveram um modelo cinético que reproduzia o metabolismo humano a fim de verificar o comportamento do selênio

quando administrado na forma de selenito. Com isso, esses autores relataram que em humanos o selenito é rapidamente absorvido no plasma, em aproximadamente 30 minutos, apresentando na urina sua máxima excreção, nas duas primeiras horas após a dosagem. Também foi verificado que o selênio é excretado nas fezes porém, baseado no corrente modelo de estudo, foi observado que nos humanos, o selênio é excretado em maior quantidade pela bile e pelo sulco pancreático, em comparação aos ratos. Esses autores ainda citam que o selenito é uma molécula altamente reativa e que quando introduzida no organismo, apresenta uma série de complexas reações resultando na produção de várias espécies de selênio como selenides, selenotrisulfidres e selênio elemental. A máxima concentração de selênio ocorre entre 9 e 14 horas após a administração, apresentando uma considerável diminuição na sua concentração no plasma sangüíneo após ao dia da dosagem, podendo ser resultado da utilização pelos tecidos do material retornado pelo fígado. Com isso especula-se que a secreção ou a excreção do selênio pelo fígado se dá em forma de proteínas, possivelmente a glutathiona peroxidase ou outra selenoproteína.

SWANSON *et al.*, em 1991, observaram o metabolismo do selênio através do selenometione em humanos, utilizando um modelo cinético baseado no estudo de PATTERSON *et al.*, 1989. Como resultado verificaram que a absorção do selenometione é de aproximadamente 98%, enquanto que o selenito é de 84%, e que a excreção na urina constitui-se de uma pequena fração que decresce com o tempo. Foi também verificado que o selenometione mantém-se no organismo por

aproximadamente o dobro de tempo em relação ao selenite, podendo isto está atribuído à reutilização, uma das maiores diferenças entre estas duas substâncias. Porém esta reutilização pode, em altas doses, ser nociva pois resulta em um excessivo acúmulo de selênio nos tecidos e conseqüentemente uma maior toxicidade desta substância.

## **2.2 – Mecanismos da ação antioxidante do selênio.**

**T**APEEL, em 1965, estudou os danos provocados pelos radicais livres na peroxidação de lipídios e sua inibição pelo selênio e pela vitamina E à nível celular, e concluiu que esses danos atingem as mitocôndrias e o retículo endoplasmático, produzindo grandes alterações nos mesmos. Também verificou que o mecanismo de ação antioxidante do selênio é semelhante ao dos radicais sulfurados, porém com uma superioridade em relação aos mesmos, sendo classificado em: a) antioxidante lipídico que inibe a peroxidação; b) decomposição do peróxido; c) captura dos radicais livres; d) reparo dos danos moleculares.

Em 1972, ROTRUCK *et al.* analisaram a prevenção dos danos provocados pela oxidação nos eritrócitos de ratos, utilizando uma dieta com selênio. Segundo esses autores a proteção destas células contra a hemólise é maior quando utilizado o selênio em conjunto com a glucose, porém esta substância não é eficaz quando

submetida a uma dieta com deficiência de selênio. Também relataram que o mecanismo de proteção do selênio contra a hemólise é diferente do mecanismo da vitamina E, pois esta última não necessita da adição da glucose para realizar seu efeito protetor. Foi utilizado para realização desse experimento o ácido ascórbico, para induzir a oxidação nos eritrócitos, visto que este elemento reage com o oxigênio da oxihemoglobina, produzindo peróxido de hidrogênio ou radicais livres reativos. Os animais foram submetidos a uma dieta com 0,5ppm de selênio na forma de selenito de sódio; a uma dieta contendo 50 UI de alfa-tocoferol; a uma combinação destas duas substâncias e também a uma dieta com deficiência destas duas substâncias. Como resultado foi verificado que o selênio, mesmo com a abstinência da vitamina E, produziu uma diminuição da hemólise dos eritócitos, sendo mais efetivo quando a glucose estava presente, apresentando este, as maiores taxas de decréscimo. Quanto à vitamina E, foi verificado que a glucose não diminuiu a hemólise na dieta com deficiência desta vitamina, a não ser quando os animais foram submetidos a uma dieta com selênio. Porém, a vitamina E diminuiu a hemólise, mesmo na ausência do selênio e da glucose.

No ano seguinte, esses mesmos autores realizaram um experimento com a finalidade de verificar a possível relação do selênio com a enzima glutathione peroxidase. Ratos foram submetidos a dietas com deficiência de selênio e dietas com 0,5 ppm de selênio, na forma de selenito de sódio, estando todas as dietas acrescidas de 50 mg de alfa-tocoferol por kilograma de dieta. Como resultado foi observado que os animais do grupo com deficiência de selênio, apresentavam

muito menos glutathione peroxidase do que o grupo da dieta com selênio. Isso possibilitou o início de uma suspeita de que o selênio poderia fazer parte da constituição da glutathione peroxidase, tornando-se alvo de várias pesquisas, pois se tinha o conhecimento de que o mecanismo primário desta enzima é a degradação, em baixos níveis, de peróxido de hidrogênio nas células, além de também agir nos hidroperóxidos de ácidos insaturados gordurosos, mostrando ser um importante protetor dos lipídios da membrana celular contra a desintegração a partir da oxidação.

Em 1973, FLOHE *et al.*, classificaram a enzima glutathione peroxidase como uma selenoenzima, pois verificaram que a deficiência de selênio levava a diminuição na atividade desta enzima, o que permitia considerar o selênio um essencial componente da glutathione peroxidase. Este achado pode, segundo os autores, explicar algumas manifestações patológicas que ocorrem com a deficiência do selênio que, normalmente, estão relacionadas com a peroxidação de lipídios insaturados em membranas biológicas.

Em 1974, o efeito da dieta com o selênio na atividade da glutathione peroxidase (GSH-Px) também foi verificado nos eritrócitos e no fígado de ratos por HAFEMAN *et al.*, que utilizaram uma dieta com selenito de sódio, onde foram feitas dois experimentos. No primeiro, foi utilizado o selênio em diversas concentrações (0; 0.05; 0.10; 0.5; 1 e 5 ppm), dividindo os animais em seis grupos. Os autores observaram que o selênio tinha uma grande influência na atividade da glutathione peroxidase apresentando, nos eritócitos, sua maior atividade no grupo com 5 ppm

de selenito de sódio, com uma média de 132% de acréscimo em relação ao nível inicial, enquanto que no fígado sua influência foi sempre mais pronunciada, com uma maior atividade no grupo com 1 ppm de selenito de sódio, contrariando os achados para os eritrócitos, podendo ser explicado, provavelmente, pelo dano hepático provocado pela toxicidade do selênio em grandes concentrações. No segundo experimento, foram utilizados ratos submetidos a uma dieta com deficiência de selênio durante nove meses, sendo em seguida dividido em quatro grupos que foram administrado uma dieta com diferentes concentrações de selenito de sódio (0, 0.1, 0.5 e 5 ppm). Foi observado que estes animais possuíam, previamente à administração do selênio, uma deficiência na atividade da glutathione peroxidase ao nível dos eritrócitos e que, após a administração do selênio, o aumento da atividade enzimática foi maior no grupo com 5 ppm de selenito de sódio. Com esses resultados HAFEMAN *et al.* afirmam que o selênio é essencial para a atividade da glutathione peroxidase.

No mesmo ano, CHOW *et al.* explicaram que a glutathione peroxidase é uma importante enzima responsável pela desintoxicação da maioria dos peróxidos lipídios que podem ser formados no organismo, protegendo desta maneira, os tecidos contra os efeitos deletérios dos mesmos. Também afirmaram que o selênio é uma parte integrante da enzima glutathione peroxidase, sendo utilizado para esse estudo ratos submetidos a dietas contendo selênio na forma de seleniometione. Como resultado foi verificado que o grupo que possuía deficiência de selênio apresentava uma deficiência na atividade da glutathione peroxidase em

aproximadamente 53% no coração e 39% para os pulmões, sendo que o maior decréscimo foi verificado no plasma e o menor nas células vermelhas. Quando foi utilizado a dieta com selênio, foi observado que entre os tecidos estudados, o plasma mostrou a maior mudança na atividade da glutathione peroxidase, com um acréscimo de 419% em relação ao grupo da dieta com deficiência de selênio. Também foi verificado um aumento da atividade enzimática nos outros tecidos estudados. Com isso, os autores concluem que o selênio é extremamente necessário para a atividade da glutathione peroxidase, sendo mais eficaz no plasma, rim, coração, eritrócitos, pulmões e fígado, enquanto que com a diminuição do selênio a menor atividade enzimática foi encontrada no plasma, rim, coração, pulmão, fígado e eritrócitos. Sendo assim, devido o plasma ser o mais sensível na atividade enzimática em relação à dieta com o selênio, os autores ainda afirmam que é possível determinar o nível de selênio pela atividade da glutathione peroxidase no plasma.

LAWRENCE *et al.* em 1976, através de uma experiência com ratos submetidos a uma dieta com deficiência de selênio, afirmaram que a atividade da enzima glutathione peroxidase está diretamente ligada a dieta com selênio, e que dietas com deficiência desta substância diminuíam a atividade desta enzima contra o peróxido de hidrogênio. Para isto, os animais foram divididos em dois grupos, um com uma dieta com deficiência de selênio, e outro com adição de 0,5mg/kg de selenito de sódio. Foi verificado que a atividade da glutathione peroxidase em

relação ao Peróxido de Hidrogênio teve um decréscimo, no grupo com deficiência de selênio, de 8% a 42% em relação ao grupo com administração de selênio.

Um outro estudo feito com a finalidade de observar a relação entre o selênio, vitamina E e a enzima glutathione peroxidase foi feito em 1977 por SCOTT *et al.* Para isso foram utilizados sessenta e sete ratos os quais foram submetidos a uma dieta contendo selenito de sódio a 0,4 e 4 ppm e  $\alpha$ -tocoferol (vitamina E) com uma dose de 100 e 500mg/kg. Após três meses de dieta, os ratos foram sacrificados e feitas as análises. Foi mostrado um significativo aumento na atividade da enzima glutathione peroxidase nas hemácias quando utilizada uma dieta de selênio de 0,4ppm, que ocorreu tanto na abstinência da vitamina E como também na presença da mesma nas duas concentrações. Quando utilizada a dieta com 4ppm de selênio, verificou-se que a atividade da enzima glutathione peroxidase foi a mais alta de todas as dietas e que isto ocorreu em ambas às concentrações da vitamina E. Na análise das células do rim, a atividade da glutathione peroxidase foi aumentada em todas as dietas. Na análise das células do fígado foi verificado um aumento significativo na atividade enzimática quando adicionado 0,4ppm de selênio em todos os níveis de vitamina E, porém quando aumentada a dosagem de selênio para 4ppm foi verificado um declínio da atividade da glutathione peroxidase, principalmente quando utilizado 500mg. Foi também verificado que os ratos que continham selênio em sua dieta não dependiam da adição da vitamina E para o aumento da atividade enzimática. Quanto à vitamina E, foi evidenciado que ela influencia na atividade da glutathione peroxidase, porém quando interagido com o

selênio, a sua atuação se dá somente em baixas doses deste metal, enquanto que em altas doses, a sua atividade enzimática é abolida.

SANDSTRÓN *et al.*, em 1989, avaliaram o aumento da atividade da glutathione peroxidase para a proteção das células humanas contra o peróxido de hidrogênio através do selênio. A pesquisa foi feita com células humanas as quais foram tratadas com 100nM de selenito por 10 a 15 dias e expostas ao peróxido de hidrogênio por 30 a 60 minutos, o que permitiu concluir que estas células sofreram um aumento considerável no nível da atividade da glutathione peroxidase, porém os autores relatam que mesmo com o aumento desta enzima, ela foi incapaz de proteger o DNA da ação das radiações ionizantes, agindo apenas na prevenção da lise celular provocada pelo peróxido de hidrogênio que não destrói o DNA.

### **2.3 – Mecanismo da ação radioprotetora do selênio.**

**O** estudo de químicos radioprotetores *in vivo* e *in vitro* tem levado a um melhor entendimento dos danos que a radiação produz, assim como a aplicação prática destas substâncias. Sendo assim, o primeiro estudo que obteve sucesso em radioproteção *in vivo* foi o de PATT *et al* em 1949 que observaram uma proteção em ratos submetidos a doses letais de radiação, quando

injetado cisteína antes da irradiação. Durante várias décadas, diversos químicos têm sido estudados a fim de se encontrar um efeito radioprotetor.

HOLLÓ & ZLATAROV, em 1960 avaliaram a prevenção aos raios-X pelos sais de selênio injetados após a radiação. Para isto foram utilizados ratos brancos recebendo uma dose total de 800r de radiação no corpo todo. Após a irradiação, passado 55-60 minutos, os animais foram divididos em cinco grupos de acordo com a quantidade da solução salina de selênio administrada: controle, injeção de 4,2mg/kg i.p. + 8/10 desta dosagem s.c., injeção de 4,4mg/kg i.p. + 8/10 dessa dosagem s.c., injeção de 4,6 mg/kg i.p. + 8/10 desta dosagem s.c e 5mg/kg i.p. + 8/10 desta dosagem s.c . Como resultado foi verificado que dos vinte ratos do grupo controle dezoito morreram entre o quarto e o décimo dia, enquanto que os grupos dos animais tratados com o selênio todos sobreviveram, exceto o grupo em que foi administrada uma dosagem maior de selênio (5mg/kg), no qual todos morreram.

Em 1964, SHIMAZU *et al.* verificaram a ação dos selenoaminoácidos comparando com os análogos aminoácidos sulfurados e outros protetores com radicais -SH, em relação aos aminoácidos e proteínas quando submetidos à radiação. Foi observado que o selenometionina protege tanto os aminoácidos como as proteínas quando expostas à radiação, e que ele possui o maior valor D1/2 (dose responsável pela destruição da metade das células), seguida pelo metiona. Os autores ainda explicam que a proteção atribuída à estas substâncias é devido à facilidade de remoção dos radicais livres e pelo mecanismo de reparo. No primeiro caso, há uma competição na reação entre a substância protetora e o aminoácido

testado pelos radicais livres da água. No segundo caso, estes autores explicam que pode ser devido a uma transferência de elétrons do agente protetor para o radical do aminoácido testado, formando um aminoácido como o original. Também foi verificado que, dos selenoaminoácidos testados, os mais eficazes foram o selenometionina e a Selenocisteína, apresentando os melhores resultados em radioproteção quando comparados com os análogos sulfoaminoácidos e os protetores sulfidrilas, fato também verificado por TAPPEL posteriormente em 1965.

BRECCIA *et al.*, em 1969 investigaram a radioproteção química em organismos vivos através da administração intra-peritoneal de derivados de selênio, entre esses a selenocisteína, o selenocromo e o selenometionina, em ratos, comparando seus efeitos radioprotetores com o da cisteína. Cinco minutos após a injeção destas substâncias, os ratos foram irradiados com 600, 750 e 900R de radiação gama e observados por quarenta dias após a exposição. Os resultados permitiram concluir que na dose de 600R o selenocromo apresentou a mesma proteção da cisteína, enquanto que todos os outros derivados do selênio foram mais eficazes. Com 750R, que representa a dose letal, todos os ratos tratados com derivados de selênio tiveram uma taxa de sobrevivência igual ou maior que 50%, com exceção do selenometionina. Porém, com a dose de 900R, nenhum dos componentes derivados do selênio testados foram eficazes, ao contrário da cisteína e da selenourea.

Em 1971, HURT *et al.* pesquisaram o efeito da dieta com selênio na sobrevivência de ratos expostos a radiação crônica do corpo todo, utilizando 74

ratos que foram submetidos a uma dieta com 0,5ppm de selênio (seleniomethione) durante sete semanas. Foram irradiados com radiação gama ( $^{60}\text{Co}$ ) diariamente com uma dose de 188 R até os animais sucumbirem. Foram avaliados a contagem dos hematócitos, eritrócitos e os leucócitos no sangue dos animais expostos, onde foi observado que os animais tratados com o selênio tiveram o número de leucócitos reduzidos a partir do sexto dia de irradiação, enquanto que os hematócitos e os eritrócitos reduziram somente a partir do décimo terceiro dia. As mortes iniciais surgiram a partir do décimo quarto dia para o grupo controle e décimo quinto dia para o grupo submetido à dieta, e que todos os grupos de ratos morreram após o vigésimo quarto dia.

CEKAN *et al.* em 1985, analisaram o efeito radioprotetor do selênio contra a radiação ionizante na indução de mal formação de ratos, utilizando uma injeção intraperitoneal de 0,5 mg/kg de selenito de sódio. Os animais tinham de 3 a 5 meses e estavam no nono dia de gestação quando submetidos à radiação de 1,75 Gy. O selênio foi administrado trinta minutos e duas horas antes da irradiação tendo como resultado uma discreta diminuição do número de fetos sobreviventes, principalmente no grupo que foi pré-tratado duas horas antes da exposição.

A ação da suplementação da dieta com selenometionina nos efeitos teratogênicos da radiação ionizante em ratos foram observado por CEKAN *et al.* em 1985, através de uma dieta contendo 0,15 a 0,20 ppm de selênio e 30 ppm de vitamina E, além da administração intraperitoneal de baixas doses (0,8 ppm) e altas doses (3,4 ppm) de selenito de sódio. Os animais foram irradiados no nono dia de

gestação com uma dose de 1,7 Gy de raios-X no corpo todo que provoca uma incidência de aproximadamente 50% de mortalidade fetal e má formação. No 18º dia os ratos foram sacrificados para serem feita as análises. Os resultados mostraram que o grupo tratado com o selênio reduziu a incidência de más formações em relação ao grupo controle de 53% para 36% e 37%, respectivamente para baixa e alta dose de selênio, enquanto que o número de fetos sobreviventes aumentou de 39% para 59% no grupo de altas doses e para 55% no grupo de baixas doses de selênio.

A utilização do teste da formação de micronúcleos tem-se mostrado um método confiável e sensível para detecção de danos genéticos provocados pela radiação, segundo KNUUTILA *et al.*, que em 1985 avaliaram a possibilidade do efeito de proteção do selênio contra a radiação utilizando este método em medula óssea de ratos. Para isto foram utilizados três grupos de dezenove ratos, sendo que o primeiro recebeu uma dieta com 0,2ppm de selenito de sódio, o segundo 0,3ppm e o terceiro recebeu 0,5ppm. Os animais foram irradiados com radiação gama, utilizando uma dose total de 200 rad no corpo todo, sendo sacrificados após 48 horas. Porém, contradizendo a maioria dos autores que pesquisam esta área, os resultados mostraram que os animais submetidos à dieta com selênio apresentaram maior formação de micronúcleos em comparação ao grupo controle, havendo um aumento desta formação quanto maior a dose de selênio utilizada, isto significa que o selênio não apresentou nenhum efeito radioprotetor em relação à

formação de micronúcleos, mas em vez disso potencializou a formação desta aberração.

Segundo BOREK *et al.* em 1986, analisando a ação inibidora radiogênica e os mecanismos do selênio e da vitamina E, relatam que o selênio é um essencial constituinte da enzima glutathiona peroxidase, que é responsável pela destruição do peróxido de hidrogênio. Nesse trabalho as células foram tratadas com 2,5  $\mu\text{M}$  de selênio e 7 $\mu\text{M}$  de vitamina E, sendo expostas 24 horas depois à radiação X. Os resultados indicaram um considerável aumento dos níveis de glutathiona peroxidase, catalase e proteínas não tióis, quando feito um pré-tratamento com selênio. Quanto ao tratamento com a vitamina E, nenhum aumento nos níveis destas enzimas foi observada. Quando foi feita a interação do selênio com a vitamina E, não foi constatado aumento na atividade do selênio.

Em 1987, WEISS *et al.* avaliaram o efeito radioprotetor e a redução da toxicidade do WR-2721 através do pré-tratamento com o selênio, devido ser esta substância, utilizada em pacientes submetidos a tratamentos radioterápicos, quimioterápicos e em exposição acidental à explosões nucleares, ter seu uso limitado pela grande toxicidade que esta droga possui, incluindo como sintomas náuseas e vômitos. Foi utilizado o selenito de sódio injetado intraperitonealmente em um volume que era de aproximadamente 1% por peso corporal do animal e foi dada uma dose de radiação de 9Gy de  $^{60}\text{CO}$ . Como resultado, estes autores observaram que quando o selênio era administrado 24 horas antes da dose letal de WR2721 (800-1200mg/kg) foi encontrado um aumento significativo no número de

sobreviventes que era potencializado com a dose do selênio, enquanto que quando o selênio era administrado simultaneamente, ele não reduzia a toxicidade do WR2721. Quando foi analisada a ação somente do selênio, foi verificado que havia um moderado efeito radioprotetor. Estes dados indicam que o pré-tratamento com o selênio além de diminuir a toxicidade do WR2721, provoca também um aumento em sua ação radioprotetora.

SANDSTRÖN *et al.*, em 1989 verificaram que o selênio induz à variação do nível de atividade da enzima glutathione peroxidase, porém não tendo efeito na proteção da quebra do DNA e da lise celular provocada pela radiação. Para esse experimento foram utilizados três tipos de células mamárias as quais sofreram um "banho" de um soro contendo baixa concentração de selênio e após um período de três semanas foi adicionado 100nM de selenito de sódio. A radiação utilizada era produzida por uma fonte de  $^{137}\text{C}$  (raios Gama) de  $0,60\text{Gy min}^{-1}$ . Não houve diferença quanto à radiosensibilidade entre o grupo controle e o grupo tratado com o selênio, contrariando a grande diferença da atividade enzimática da glutathione peroxidase, que se apresentava bastante aumentada. Também foi testado o nível de atividade de outras enzimas, como a CuZn superoxide dismutase e catalase, porém com os resultados minimamente influenciados pelo tratamento com o selênio. A diferença também foi insignificante quanto ao número de quebras nos DNAs pela radiação em relação ao grupo controle e o grupo tratado. Os resultados mostraram que os efeitos radioprotetores do selênio não são devido ao aumento da

atividade da enzima glutathiona peroxidase, mas a um possível fator de dependência do selênio.

Os avanços em radioproteção através do uso combinado de agentes químicos foram relatados ainda por WEISS *et al* em 1990. Os autores afirmam que diversas substâncias consideradas antioxidantes naturais tem sido pesquisadas para o uso em radioproteção, principalmente para diminuir a alta toxicidade das substâncias radioprotetoras utilizadas, e para aumentar o seu efeito radioprotetor. O efeito do selênio foi estudado através do selenito de sódio em adição ao WR2721 em ratos. Com uma injeção de 1,6mg/kg de selênio antes do WR2721 (800-1200mg/kg), ambas aplicadas intraperitonealmente, foi verificado que o selênio reduziu consideravelmente a toxicidade letal do WR2721. Quando injetado somente o Se 24 horas antes de uma irradiação com cobalto 60, este apresentou um aumento na sobrevivência dos animais em aproximadamente 1,1 DRF (Fator de Redução da Dose). Quando utilizado o selênio 24 horas antes da aplicação do WR2721 (200-600mg/kg, i.p, 30 minutos antes da exposição) foi evidenciado um aumento da ação radioprotetora de 2,2 para 2,6 DRF. Este autor também concluiu que o selênio é o metal mais efetivo quando comparado com o cobre e o zinco administrados simultaneamente com o WR2721.

Porém, BOREK discorda da afirmação feita por SANDSTRÖN *et al.* (1989) No seu trabalho realizado em 1993, ele explica que tanto as radiações ionizantes como as não ionizantes provocam complexas alterações no DNA, e que as radiações X induzem ionizações e ataques indiretos de radicais hidroxilas. BOREK

ainda cita que quando utilizado o agente anti-carcinogênico (C3H 10T1/2) com células de hamster pré-tratadas com selênio e expostas aos diversos tipos de radiações como raios X, luz Ultravioleta, entre outras, estas células aumentavam o nível de glutathiona peroxidase e catalase, aumentando assim a destruição dos peróxidos. Ele também relata que o selênio, assim como outras substâncias antioxidantes e certas vitaminas, podem ter ação anticarcinogênica.

LECCIA *et al.*, em 1993 analisaram o efeito protetor do selênio em fibroblastos contra os danos provocados pela radiação ultravioleta, e afirmaram que o mecanismo antioxidante do selênio está estabelecido pela sua ligação com a enzima glutathiona peroxidase, o qual é responsável pela síntese da apoenzima e pela atividade catalisadora da glutathiona peroxidase. Para esse experimento foram utilizadas culturas de fibroblastos, sendo administrado 0,1mg/L de selenito de sódio e expostas à várias doses de radiação UV-B. Como resultado foi observado que o selênio aumentou a atividade da glutathiona peroxidase, produzindo um aumento considerável do efeito radioprotetor nos fibroblastos, que aumentava com o acréscimo da dose de radiação, alcançando o seu limite com a dose de 5,8j/cm<sup>2</sup>.

Em 1998, RAFFERTY *et al.* realizaram um trabalho avaliando as diferentes expressões das selenoproteínas em células epiteliais humanas, e a proteção do selênio contra a indução da morte celular pela radiação UVB. Concluíram que, das trinta selenoproteínas existentes, somente quatorze teve ação efetiva contra as radiações UVB, e destas as mais eficazes foram a selenometionina, selenocisteína e o selenito de sódio. Seu estudo foi definido analisando o perfil dos queratinócitos,

melanócitos e fibroblastos, porém as selenoproteínas produziram proteção somente nas duas primeiras células, contrariando os achados de LECCIA *et al.*, 1993. Em relação ao queratinócito, a dose de UVB ( $960\text{j/m}^2$ ) utilizada produziu uma mortalidade de 80% quarenta e oito horas após a irradiação. Com a adição do selenito de sódio e a selenometionina previamente à exposição, este obteve um aumento significativo na prevenção à morte celular, com uma proteção mais efetiva do selenito de sódio com doses de 1 a 200nM, sendo considerada a dose ideal em aproximadamente 10nM. Em relação ao selenometionina, foi verificado que este se apresentava menos eficaz em relação ao selenito de sódio, e que era necessárias altas doses para uma significativa proteção aos raios UVB. Na análise dos melanócitos, estes se apresentavam mais sensíveis às radiações UVB em relação aos queratinócitos, necessitando de uma dose de  $720\text{j/m}^2$  para produzir uma morte de aproximadamente 80% das células, apresentando os efeitos dos Se semelhantes aos encontrados no queratinócitos. Também foi verificado que tanto para os queratinócitos como para os melanócitos, o efeito do selenito de sódio e do selenometionina foram maiores quando administrados vinte e quatro horas antes da exposição, com a máxima dose de proteção em 50nM para o selenito de sódio, e de 200nM para a selenometionina.

VILLAR, em 1997 estudou o efeito da ação radioprotetora do WR2721 na medula óssea de camundongos utilizando, para isto, a análise morfológica, morfométrica, ultra-estrutural e bioquímica, sendo os animais divididos em dois grupos. O primeiro, o grupo não irradiado (G1), foi subdividido em dois subgrupos:

um grupo que recebeu somente soro fisiológico, e o grupo que recebeu 400 mg/kg de WR2721, ambos administrados intraperitonealmente. O segundo, o grupo irradiado (GII), também foi subdividido em dois subgrupos com a administração das mesmas substâncias do grupo anterior porém 30 minutos antes da irradiação de 7Gy de radiação gama em corpo inteiro. Os animais foram sacrificados nos períodos de 4, 12, 24 horas e 10 dias após a injeção (GI) ou irradiação (GII). Como resultado, observou-se que os animais irradiados na presença do WR2721 apresentaram, pela análise morfológica e ultra-estrutural, uma recuperação mais precoce e eficiente no período de 10 dias, evidenciado pela melhor reestruturação das linhagens celulares. Também foi verificado que houve uma redução significativa da apoptose no período de 4 e 12 horas após a irradiação e uma fragmentação do DNA menos intensa nesse grupo.

Neste mesmo ano, SEGRETO avaliou a ação do mesmo radioprotetor WR2721 na medula óssea de camundongos irradiados através da análise histométrica, ultra-estrutural e da matriz lipídica. Foram utilizados 76 camundongos divididos em dois grupos. O grupo I, não irradiado, foi subdividido em dois subgrupos, um que recebeu 0,5ml de soro fisiológico e o outro que recebeu 400mg/kg de WR2721, ambos administrados intraperitonealmente. O grupo II, irradiado, também foi subdividido em dois subgrupos com as mesmas quantidades das substâncias do primeiro grupo, porém administrados 30 minutos antes da irradiação de 7Gy de radiação gama. Os animais foram sacrificados nos períodos de 4, 12, 24 horas e 10 dias após a irradiação. Como resultado verificou-se que as

medulas ósseas dos animais que receberam o radioprotetor apresentaram um menor número de células em apoptose no período de 4 e 12 horas, estando o aspecto ultra-estrutural da medula óssea melhor preservado em todos os períodos e uma alteração da matriz lipídica menos intensa no período de 4 horas.

A utilização de formulações nutricionais especiais também tem sido proposta para a radioproteção em pacientes submetidos à radioterapia de intestino, como verificado no trabalho de CAMPOS em 1992. Este autor estudou o papel da glutamina e de dietas elementares na prevenção da enterite actínica aguda, utilizando 65 ratos da raça Wistar submetidos à irradiação abdominal fracionada em doses diárias de 300 cGy, totalizando 1500 cGy. Quatro dias após o término da radioterapia os animais foram submetidos à perfusão intestinal. Como resultado verificou-se que a administração da dieta elementar enriquecida com glutamina propiciou menor perda corpórea durante e após a irradiação e que a administração destas dietas não alterou a função da mucosa intestinal, no entanto, a suplementação alimentar com glutamina antes, durante e após a irradiação abdominal determinou efeitos protetores sobre o intestino irradiado, preservando sua arquitetura morfológica e a capacidade de recuperação, sobretudo no intestino delgado.

Porém, TAVARES em 1995, pesquisou sobre os efeitos do aminoácido glutamina sobre a frequência de aberrações cromossômicas induzidas pelas radiações gama, utilizando para isto células de mamíferos in vivo e in vitro. A glutamina foi administrada in vivo em uma concentração de 300 e 600mg/kg de

peso corpóreo antes da exposição à radiação de 3Gy, enquanto que in vitro foi administrado 1mm e 2mm de glutamina, e a carga da radiação gama era de 1,5 Gy nas diferentes fases do ciclo celular. Como resultado, verificou-se que tanto in vivo como in vitro a glutamina não alterou significativamente a frequência de aberrações cromossômicas induzidas pela radiação gama, nas condições utilizadas nesse trabalho.

Neste mesmo ano, COSTA analisou o efeito modulador dos componentes do veneno de abelha sobre os danos citogenéticos induzidos pela radiação gama utilizando ratos. Para isto foi utilizados dois componentes do veneno de abelha, a melitina (2,0mg/kg) e a fosfolipase-a2 (0,5 e 1,0mg/kg) bem como a associação destas duas substância, todas administradas por via subcutânea 24 horas antes da irradiação de 3 Gy. Os animais foram divididos em quatro grupos e sacrificados 24 horas após a irradiação. A análise estatística constatou não haver redução significativa aos danos citogenéticos provocados pela radiação gama.

Recentemente, em 1999, AGUILAR verificou a toxicidade e proteção hematológica da N-acetilcisteína, um aminotiol com ação antioxidante, frente aos efeitos agudos da radiação em pacientes submetidos à radioterapia pélvica por câncer de colo ou corpo de útero. Para isto foi administrado 3,6 g de N-acetilcisteína por via oral para um grupo, enquanto que o grupo controle foi administrado caseinato de cálcio como placebo. Na avaliação final foi verificado que a N-acetilcisteína não é tóxica nas doses utilizadas nesse estudo, e que possui uma ação protetora dos efeitos agudos da radiação sobre os tecidos hematológicos.

## **2.4 – Efeito da radiação e do selênio no mecanismo de reparação tecidual.**

O mecanismo de reparação tecidual é dividido em três fases distintas, segundo FELIX *et al.* (1990) : fase inflamatória, fase proliferativa e a fase de maturação. A primeira fase é aquela em que ocorrem fenômenos vasculares, destacando-se o aumento da permeabilidade vascular e a chegada dos granulócitos, que tem como função a remoção de resíduos celulares no local da lesão, incluindo os monócitos. A fase proliferativa é caracterizada pelo recobrimento da lesão por tecido epitelial, proliferação de capilares e o aparecimento dos fibroblastos no terceiro dia, que são responsáveis pela produção da substância fundamental e do colágeno, devido a sua intensa capacidade de síntese protéica e multiplicação celular. Na terceira e última fase ocorre a oclusão da ferida pela síntese do colágeno havendo a organização dos capilares e diminuição do número de fibroblastos com conseqüente queda na produção da substância fundamental. O processo de cicatrização pode sofrer interferências decorrentes de fatores sistêmicos, como os distúrbios nutricionais, hipóxia, diabetes miellitus, ou também influências externas como as drogas anti-inflamatórias e a radiação.

Um estudo feito por GRILLO *et al.* em 1961 utilizando porcos submetidos à radiação X, teve como finalidade medir o efeito provocado pela radiação na

contração das feridas. Foram feitas feridas com um diâmetro de 2x2cm em ambos os lados do tronco do animal, onde foram irradiados com uma dose de 750R de radiação X somente nas feridas produzidas no lado direito. Como resultado verificou-se que a contração era retardada com a radiação e que isto variava de acordo com o tempo da irradiação no estágio da reparação, porém todas as feridas foram cicatrizadas completamente. O máximo retardo de contração foi encontrado quando a irradiação era feita no período de 24 a 48 horas após feito a ferida, com o seu pico em 36 horas. As feridas do lado oposto ao irradiado também sofreram alteração na contração de reparação, porém em menor magnitude. Quando as duas feridas foram produzidas do mesmo lado, sendo que uma delas fora protegida, verificou-se que a ferida protegida não sofreu alteração na contração. Na análise histológica observou-se que no décimo quinto e no décimo sexto dia de reparo, a população de fibroblastos mostrou-se muito inferior que o normal, sendo que eles se encontravam alterados no tamanho, forma e orientação, com pouca evidência de formação de fibras colágenas. Também foi verificado que irradiação em períodos mais posteriores à produção da ferida, provocou menores efeitos e que as feridas irradiadas e não irradiadas tornaram-se indistinguíveis a partir de trinta dias.

Em 1976, MCKEEHAN *et al.* realizaram um experimento para avaliar o selênio como um nutriente para a produção de fibroblastos humanos, utilizando culturas de fibroblastos da série WI-38 de tecido pulmonar humano e células do ovário de hamster chineses. O efeito do selênio adicionado na forma de selenito para as células humanas apresentou um máximo crescimento com 30nM, e um

efeito tóxico em níveis acima desta dosagem, com uma inibição completa no crescimento com uma dosagem de  $10\mu\text{m}$ . Para as células dos ratos, o crescimento foi totalmente dependente da adição do selênio com um máximo crescimento em uma dosagem de  $0,1\text{nM}$ , apresentando uma ampla tolerância à adição do selênio e uma inibição total no crescimento com uma dose de  $30\mu\text{m}$ . Esses autores assim concluem que o selênio em uma concentração de  $30\text{nM}$  é um elemento essencial para o crescimento das células humanas e que as células do ovário de hamster requerem menor quantidade de selênio para o crescimento e apresentam uma menor sensibilidade aos efeitos tóxicos do excesso de selênio.

A citotoxicidade do selenito foi observada em reparos de DNA de fibroblastos humanos por LO *et al.* em 1978. Foram utilizados fibroblastos de pacientes caucasianos do sexo feminino com a faixa etária entre 18 e 25 anos, apresentando xeroderma pigmentosa e também células de pacientes normais. Como resultado foi verificado que pequenas exposições da cultura de fibroblastos ao selenito de sódio desencadeou níveis relativamente baixos, mas significante, de síntese de reparo do DNA, e que este reparo pode ser potencializado pela incubação com o sistema de ativação S9, substância amplamente utilizada para ativações metabólicas pré-carcinogênicas. Também verificou-se que os fibroblastos submetidos à exposição ao selenito de sódio apresentaram cinco vezes mais aberrações cromossômicas em relação aos fibroblastos não ativados.

SILVADO, em 1992, analisou os aspectos morfológicos e morfométricos da ação dos raios beta em feridas provocadas na pele de ratos. Para esse estudo,

duas feridas longitudinais, paralelas, foram efetuadas no dorso dos animais, medindo cada uma 1cm de extensão, sendo que uma foi irradiada, e outra usada para controle. A dose diária de irradiação era de 201,63 cG, sendo administrada no período de 3, 7 e 10 dias. Como resultado, verificou-se que os raios beta interferiram no processo de cicatrização, estimulando os leucócitos na fase proliferativa e deprimindo o número de fibroblastos e fibras colágenas na fase de fibroplasia, sem ocasionar dano estético à pele do animal no evoluir da reparação tecidual.

Em 1994, WANG *et al.* relataram que o uso pré ou pós operatório da radioterapia na prática oncológica é muito freqüente, porém para que se inicie este tratamento é necessário que haja uma reparação tecidual satisfatória. Estes mesmos autores ainda relatam que a irradiação por feixes de elétrons tem se tornado o tipo mais freqüente na radioterapia por permitir uma grande distribuição da dose em relação à profundidade. POWERS *et al.* (1967) citado por WANG *et al.* (1994) afirmaram que a irradiação na pele, tanto antes como após o processo de cicatrização, retarda a reparação tecidual em sua estrutura e função, e que este processo é influenciado pela dose/tempo e pelo intervalo de tempo entre a irradiação e a cirurgia.

Ainda nesse trabalho, o processo de reparação foi analisado, verificando o nível morfológico em tecido de ratos utilizando a radiação de elétrons. Para isto foi utilizadas uma dose total de 9,6 Gy em uma área de 20x5 cm com uma profundidade de 3mm na região dorsal dos animais. Após sete dias da irradiação foi

promovida a cirurgia, removendo um tecido de aproximadamente 7x5 cm, e após 1, 3, 7 e 14 dias, a reparação tecidual foi analisada microscopicamente através da microscopia eletrônica de varredura e da microscopia de luz. Foi observado no sétimo dia de reparação que havia poucos fibroblastos na derme do tecido irradiado e que menos tecido de granulação havia sido formado. Porém após o décimo quarto dia de reparação, o epitélio do grupo irradiado apresentava-se similar ao do controle. Estes mesmos autores explicam que a influência da radiação ionizante está nos danos provocados no DNA celular, que de acordo com WARD *et al.* (1987) se deve à produção de radicais livres quando a deposição de energia pelos raios-X é feita em locais com alta densidade de radicais, provocando diversos danos nos sítios do DNA. Como resultado da pesquisa feita por WANG *et al.* (1994), foi demonstrado que a irradiação de elétrons retarda a reparação tecidual, e que está correlacionado com a diminuição no número de fibroblastos e com a interferência na organização e consolidação das fibras colágenas, porém este retardo na reparação não é permanente, não impedindo a cicatrização normal.

Segundo DRAKE *et al.* (1995), o dano provocado pela radiação no processo de reparação é causado pela ionização dos átomos, criando radicais livres que irão prejudicar o DNA celular da ferida irradiada. Microscopicamente, as injúrias são provocadas pelo fechamento de pequenos vasos sanguíneos e pelas alterações ocorridas nos fibroblastos, alterando a produção de colágeno e tornando deficiente e inadequado o processo de cicatrização. Essa alteração na produção do colágeno pode ser explicada por duas hipóteses; os fibroblastos não produzem colágeno

suficiente para a demanda da cicatrização, ou o colágeno produzido não está totalmente maturado devido a grande necessidade de produção.

A avaliação do processo de reparação tecidual em relação ao selênio foi observada em um estudo feito por BANG *et al.* em 1995, no qual foi avaliada a alteração no comportamento de várias substâncias como o zinco, cobre, manganês e o selênio na formação de quelóide e de cicatriz hipertrófica, que é conceituado como uma perda no equilíbrio na formação e degradação do colágeno durante o processo de reparação tecidual formando um tecido anormal com a proliferação dos fibroblastos invadindo o tecido adjacente. Para essa pesquisa foram utilizados 40 pacientes de ambos os sexos e de várias faixas etárias, sendo removido o quelóide ou a cicatriz hipertófica com o tecido adjacente normal, e divididos em vários grupos de acordo com a etiologia apresentada como queimaduras, trauma, incisão cirúrgica e infecção. Como resultado foi verificado que em relação ao soro sanguíneo não se evidenciou nenhuma alteração no nível do selênio, porém no tecido normal adjacente à estas alterações, do grupo provocado por incisão cirúrgica o nível de selênio apresentou um nível significativamente baixo, enquanto que no tecido com quelóide ou cicatriz hipertófica este nível apresentou-se normal.

ALMEIDA, em 1997, analisou o efeito da radiação de elétrons no processo de reparação tecidual. Para isso, utilizou-se ratos no qual foram produzidos feridas e posteriormente irradiados com radiação de elétrons com uma dose de 1 Gy, administrado somente 1 cm lateralmente a borda da ferida, protegendo-se todo o resto do animal com um avental pumblífero. A irradiação foi realizada, para um

grupo, imediatamente após a abertura da ferida, enquanto que para o outro grupo, somente após 3 dias após este procedimento. Como resultado foi verificado um retardo no processo de reparação tecidual quando irradiado imediatamente e 3 dias após a abertura da ferida, sendo este efeito mais acentuado neste último grupo.

Em 1999, MONTEIRO, também analisou o efeito da irradiação de elétrons no processo de reparação, utilizando feridas produzidas em ratos. Este autor utilizou a dose de 1 Gy irradiando imediatamente e 3 dias após a cirurgia, verificando que houve atraso nos dois grupos analisados, porém com maior intensidade neste último grupo. Concluiu-se ainda, que o efeito da irradiação no processo de reparo promove apenas um atraso transitório e que, após o final do período experimental, os tecidos dos grupos irradiados apresentavam-se semelhantes as do controle.

Recentemente, em 2000, LOURENÇO avaliou o efeito de baixas doses de radiação de elétrons na atividade das fosfoesterases no tecido de granulação, enzimas essas que apresentam um fator preponderante na nova formação tecidual. Foram utilizados ratos que foram submetidos a um procedimento cirúrgico, sendo efetuada a inserção subcutânea de disco de esponjas PVC. Estes animais foram divididos em dois grupos, sendo um o controle e o outro irradiado com uma dose de 1 Gy de radiação de elétrons, que posteriormente foram sacrificados em diversos tempos para a avaliação da evolução do tecido de granulação. Como resultados, observou-se que a atividade da enzima trifosfatase apresentava-se com menor atividade em relação ao grupo controle aos 17 dias após a irradiação, enquanto que a fosfatase alcalina apresentou uma maior atividade no grupo irradiado aos 11 dias,

porém não significativa em relação ao grupo controle. Por fim, a enzima 5' nucleotídeo fosfodiesterase apresentou uma maior atividade, sendo estatisticamente significativa, no 2º dia e 21º pós irradiação em relação ao grupo controle.



### **3. PROPOSIÇÃO**

**T**endo em visto o pequeno volume de informações na literatura revista a respeito da radioproteção com o uso do Selênio e a grande importância que a radioterapia desempenha nos dias atuais, este trabalho de pesquisa propõe-se a avaliar o efeito do Selenito de sódio como radioprotetor no processo de reparação tecidual em ratos, verificando-se:

1. O desenvolvimento morfológico e estrutural do tecido de granulação quando submetidos à altas doses de radiação de elétrons;
2. As possíveis alterações na síntese de colágeno e das glicosaminoglicanas do referido tecido acompanhando os diversos dias após a irradiação.



## **4. MATERIAIS E MÉTODOS**

Após a aprovação na Comissão de Ética na Experimentação Animal do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas sob o protocolo de nº 032-1, aprovado em reunião realizada no dia 04 de maio de 1999, estando de acordo com os princípios éticos do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal, deu-se início ao procedimento experimental, conforme mostra o Anexo 1.

### **4.1 MATERIAIS**

**F**oram utilizados para a presente pesquisa 50 ratos de mesma linhagem (*Rattus norvegicus*, Albinus, Wistar), machos, com idade entre 60 e 90 dias e peso variando entre 150 e 300 gramas, todos procedentes do Biotério Central da USP. Todos os animais foram mantidos desde as fases de pré-tratamento e pré-operatória até o sacrifício em gaiolas apropriadas, que se

encontravam em local com temperatura e umidade controladas. A alimentação dos animais constou de ração balanceada padrão e água “*ad libitum*”, diariamente.

Os procedimentos experimentais consistiram de cinco fases distintas: a Fase Terapêutica, a Fase Cirúrgica, a Fase de Irradiação, a Fase de Obtenção das Peças e a Fase de Preparação de Lâminas para Microscopia Óptica. Para a realização dessas fase foram utilizados os seguintes materiais:

#### **4.1.1 Fase Terapêutica:**

- Solução injetável de  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  (Selenito de sódio),
- Seringas hipodérmicas para insulina com agulhas intradérmicas;

#### **4.1.2 Fase Cirúrgica:**

- Mesa cirúrgica, contendo: tesoura reta de ponta fina, pinça reta, pinça dente de rato, cabo de bisturi, lâminas de bisturi nº 15, algodão hidrófilo e gaze esterilizados;

#### **4.1.3 Fase de Irradiação:**

- Acelerador linear, modelo Mevatron 74, da Siemens
- Lâmina de chumbo de 4 mm de espessura;

#### **4.1.4 Fase de 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;
- Clorofórmio;

#### **4.1.5 Fase de Preparação de Lâminas para a Microscopia Óptica:**

- Álcool 70%;
- Álcool absoluto;
- Xilol;
- Parafina para inclusão;
- Micrótomo;
- Estufa;
- Hematoxilina-Eosina;

- Nitrato de prata;
  
- Azul de toluidina

## **4.2 MÉTODOS**

### **4.2.1 Grupos Experimentais:**

A amostra foi dividida de forma aleatória em quatro grupos experimentais:

1. grupo controle: constituído por animais nos quais realizou-se a cirurgia que constou da produção de uma ferida na região dorsal dos animais, sendo injetada 1ml de água destilada intraperitonealmente, simulando o volume de selênio que seria injetado nos grupos selênio e selênio irradiado;
  
2. grupo selênio: nos animais pertencentes a este grupo foi realizada a cirurgia e injetou-se intraperitonealmente solução de selenito de sódio, constituída de 2,0 mg de  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$ / Kg de peso corpóreo, diluídos em água destilada;

3. grupo irradiado: realizou-se a cirurgia e três dias após, os animais foram irradiados com um feixe de radiação de elétrons com 6 MeV de energia e dose única de 6 Gy;
4. grupo selênio irradiado: constituído por animais que sofreram o procedimento cirúrgico e receberam a mesma dose de selenito de sódio usado para o grupo selênio e 24 horas após foram irradiados

O tempo transcorrido, da cirurgia à obtenção das peças foi de: 4 dias, 7 dias, 13 dias e 21 dias, com isso obteve-se quatro grupos com quatro tempos diferentes de evolução do tecido de granulação (Tabela 1).

GRUPOS	SOLUÇÃO	IRRADIAÇÃO
CONTROLE	ÁGUA DESTILADA	-
SELÊNIO	SELÊNIO	-
IRRADIADO	ÁGUA DESTILADA	+
SELÊNIO IRRADIADO	SELÊNIO	+

Tabela 1 – Divisão dos grupos quanto à solução administrada e irradiação.

#### **4.2.2 Anestesia e Tricotomia:**

Na fase cirúrgica, 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 irritação química na pele dos animais.

#### **4.2.3 Produção da Ferida:**

Foram realizadas quatro incisões, que unidas entre si, produziram uma retirada de tecido dérmico de 2,0 cm x 1,5 cm, na região dorsal anterior de cada animal, a uma distância de aproximadamente 1,0 cm à direita da espinha dorsal. As incisões de maiores extensões foram feitas paralelamente a esta. A profundidade de cada incisão atingiu aproximadamente 0,2 cm, tendo como base a observação do tecido muscular na base da ferida e a presença da derme e epiderme nas bordas da mesma. As feridas foram feitas sempre na mesma região, para conservação da uniformidade das amostras três dias antes da fase de irradiação.

#### **4.2.4 Irradiação:**

Nesta fase, os animais tiveram uma área correspondendo a 1,0 cm lateralmente a cada borda da ferida irradiada. Portanto, todo o restante do animal, incluindo a ferida produzida, foi protegido com uma lâmina de chumbo de 4,0 mm de espessura. A irradiação foi realizada com um feixe de elétrons, à distância alvo-

fonte de 100 cm; com dose única de 6 Gy, que se manteve com a mesma intensidade até 1,0 cm de profundidade.

#### **4.2.5 Obtenção das Peças:**

Após o tempo previamente estabelecido para a reparação tecidual, foram obtidas as peças cirurgicamente e posteriormente os animais foram sacrificados com éter etílico. Cada peça foi 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 para produção das feridas. Depois de removidas, as peças foram devidamente lavadas com solução fisiológica, secadas em papel absorvente e mantidas em recipientes com solução fixadora de Lillie até à inclusão. Nesta solução, as peças ficaram no mínimo por 72 horas.

#### **4.2.6 Métodos Histológicos:**

As peças fixadas foram incluídas em parafina, segundo a técnica de rotina, e levadas ao micrótomo, sendo obtidos cortes de 7  $\mu$ m de espessura. Uma vez montadas as lâminas, os cortes foram divididos em 3 lotes, para os seguintes procedimentos:

a) **Coloração por hematoxilina - eosina:** um lote de lâminas foi corado, pelo método de HE, segundo a técnica rotineira, para os exames microscópicos de morfologia dos tecidos;

**b) Coloração por Picrosírius:** o segundo lote de lâminas foi submetido à coloração por Picrosírius para o exame dos feixes de colágeno do tecido de granulação, 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 glicosaminoglicanas que reagem com o azul de toluidina.

As observações morfológicas e em polarização foram realizadas através do fotomicroscópio "Zeiss – Pol 01", utilizando para isto as objetivas de aumento de 2,5X, 1,25X10 e 6,3X, 1,25X10 para a coloração de Hematoxilina – Eosina e por Picrosírius, enquanto que para o Azul de Toluidina foi utilizado um aumento de 16X, 1,25X10.

PRANCHA 01

FOTOGRAFIAS CLÍNICAS DAS FERIDAS CIRÚRGICAS

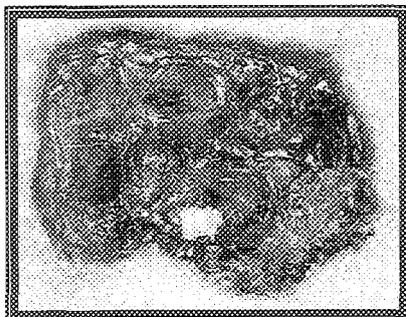


Figura 1.1 - Grupo Controle 04 dias

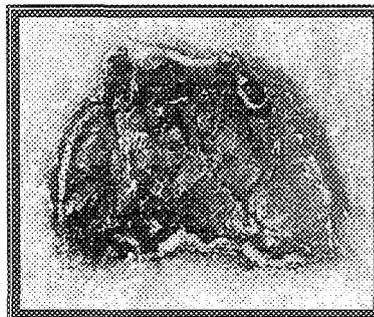


Figura 1.2 - Grupo Selênio 04 dias

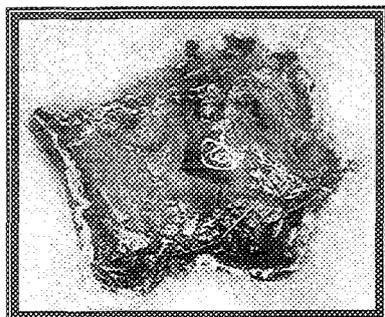


Figura 1.3 - Grupo Irradiado 04 dias

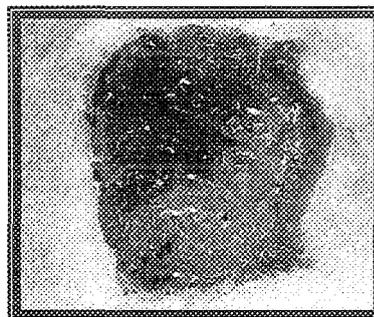


Figura 1.4 - Grupo Selênio Irradiado 04 dias

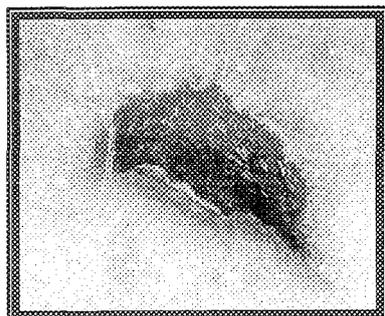


Figura 1.5 - Grupo Controle 07 dias

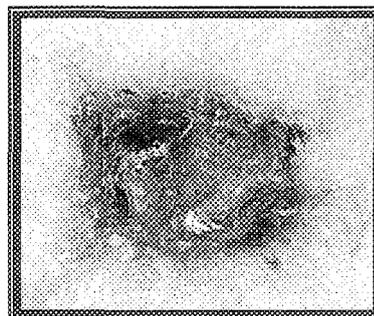


Figura 1.6 - Grupo Selênio 07 dias

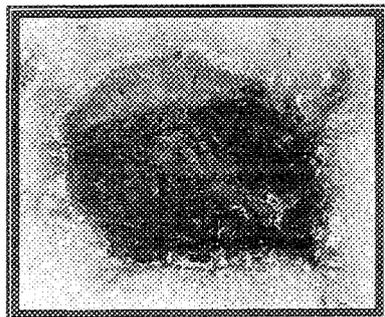


Figura 1.7 - Grupo Irradiado 07 dias

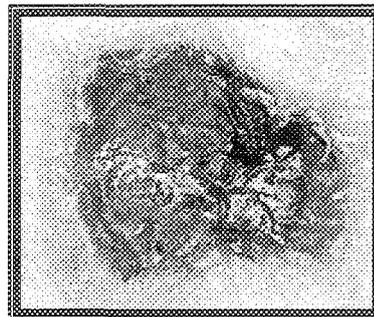


Figura 1.8 - Grupo Selênio Irradiado 07 dias

PRANCHA 02  
FOTOGRAFIAS CLÍNICAS DAS FERIDAS CIRÚRGICAS

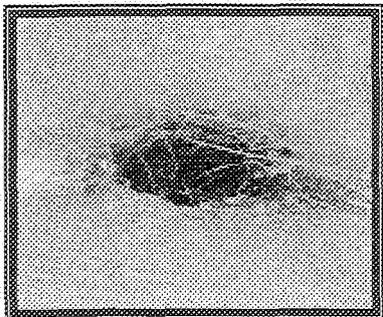


Figura 2.1 - Grupo Controle 13 dias



Figura 2.2 - Grupo Selênio 13 dias

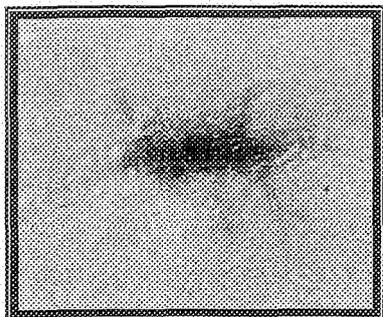


Figura 2.3 - Grupo Irradiado 13 dias

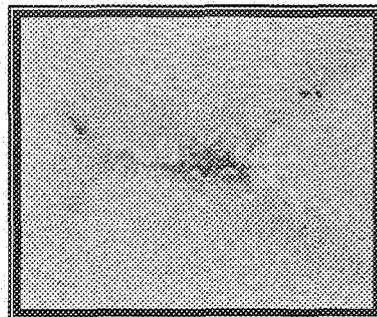


Figura 2.4 - Grupo Selênio Irradiado 13 dias

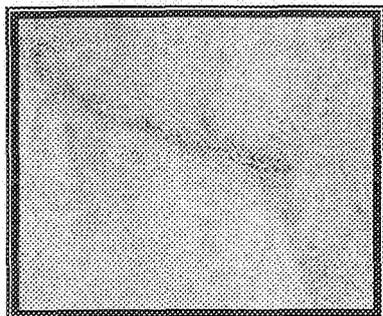


Figura 2.5 - Grupo Controle 21 dias

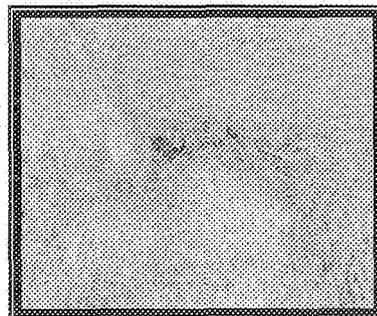


Figura 2.6 - Grupo Selênio 21 dias

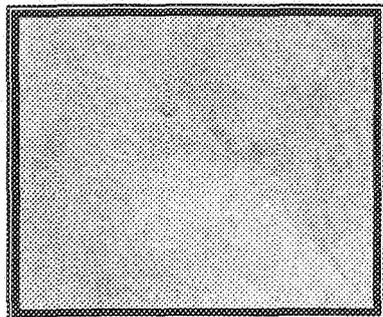


Figura 2.7 - Grupo Irradiado 21 dias

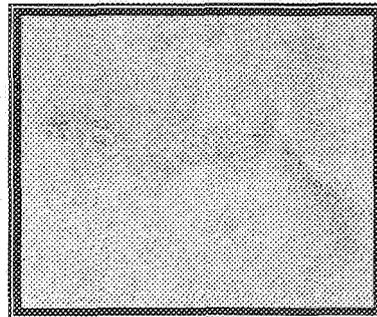


Figura 2.8 - Grupo Selênio Irradiado 21 dias

PRANCHA 03  
COLORAÇÃO POR HEMATOXILINA-EOSINA  
(aumento original 2.5 x 1.25 x 10)

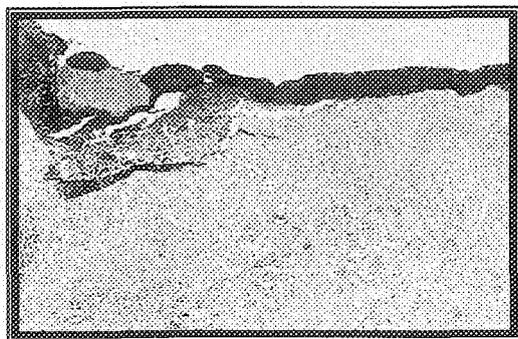


Figura 3.1 - Grupo Controle 04 dias

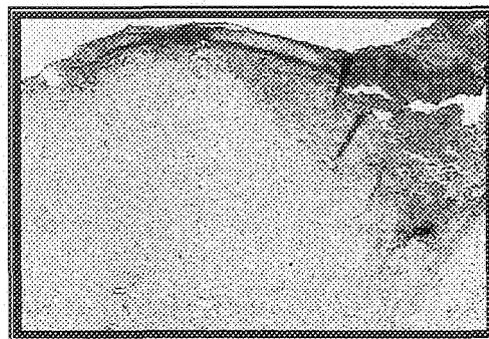


Figura 3.2 - Grupo Selênio 04 dias

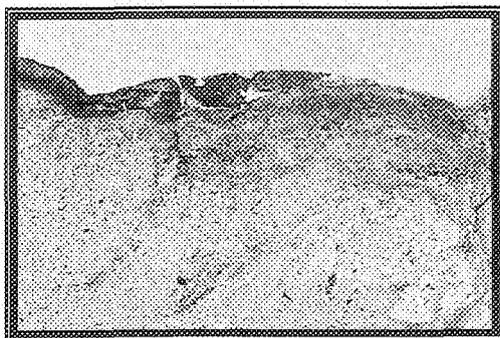


Figura 3.3 - Grupo Irradiado 04 dias

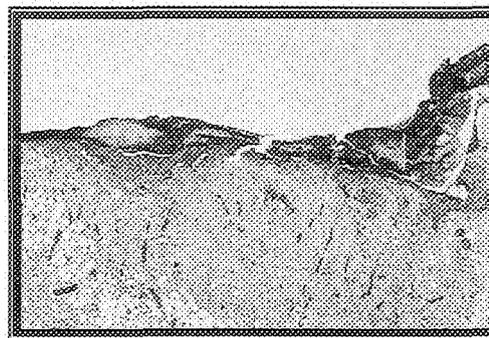


Figura 3.4 - Grupo Selênio Irradiado 04 dias



Figura 3.5 - Grupo Controle 07 dias

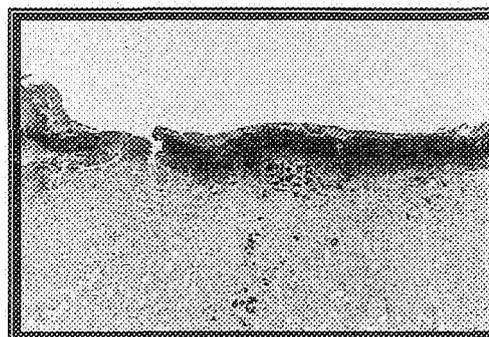


Figura 3.6 - Grupo Selênio 07 dias

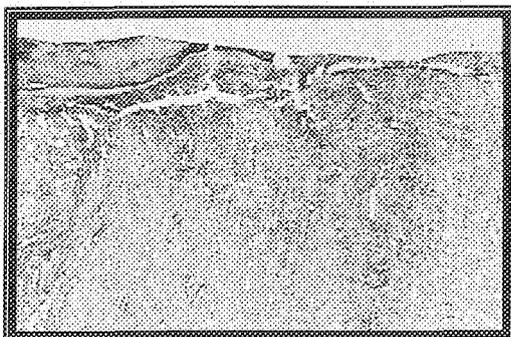


Figura 3.7 - Grupo Irradiado 07 dias



Figura 3.8 - Grupo Selênio Irradiado 07 dias

PRANCHA 04  
COLORAÇÃO POR HEMATOXILINA-HEOSINA  
(aumento original 2.5 x 1.25 x 10)



Figura 4.1 - Grupo Controle 13 dias

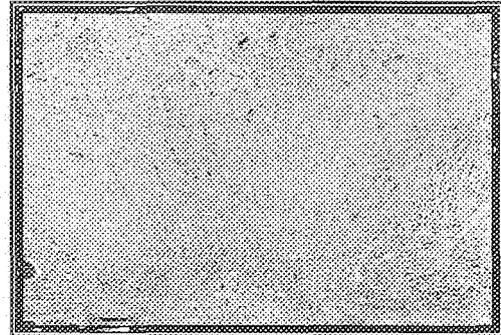


Figura 4.2 - Grupo Selênio 13 dias

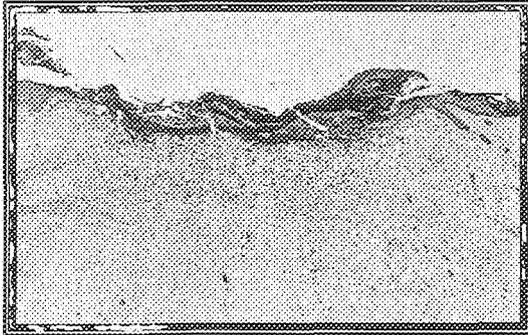


Figura 4.3 - Grupo Irradiado 13 dias

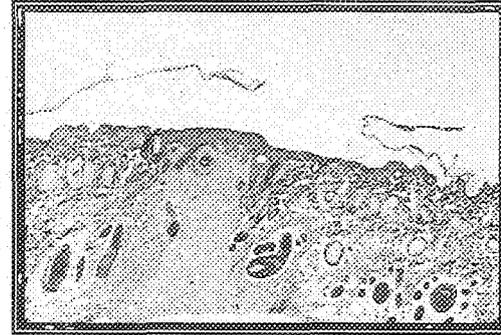


Figura 4.4 - Grupo Selênio Irradiado 13 dias

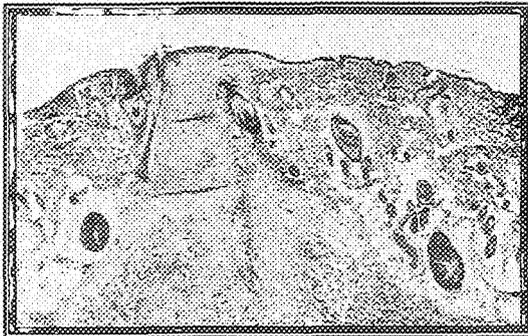


Figura 4.5 - Grupo Controle 21 dias

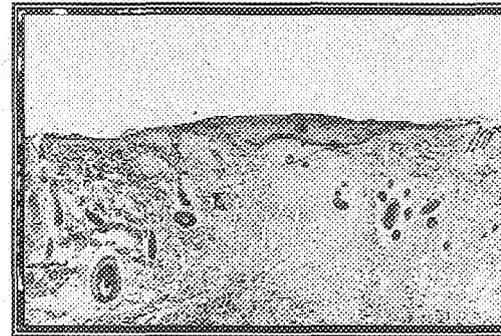


Figura 4.6 - Grupo Selênio 21 dias

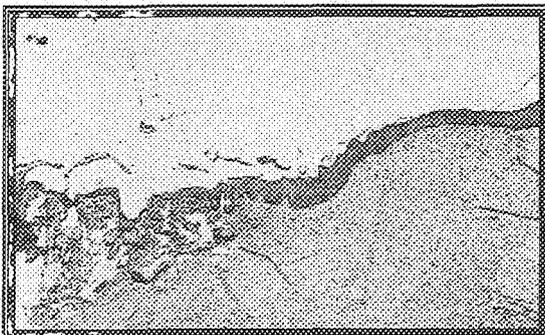


Figura 4.7 - Grupo Irradiado 21 dias

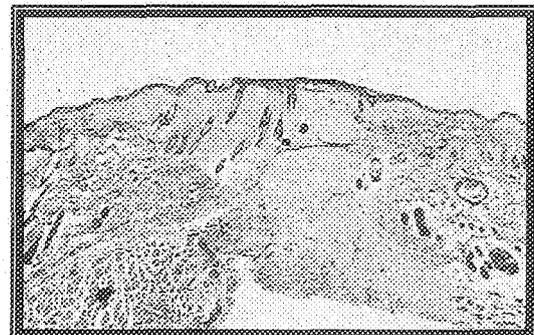


Figura 4.8 - Grupo Selênio Irradiado 21 dias

PRANCHA 05  
COLORAÇÃO POR HEMATOXILINA-HEOSINA  
(aumento original 6.3 x 1.25 x 10)

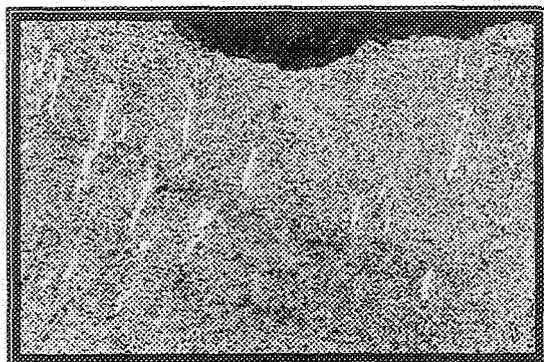


Figura 5.1 - Grupo Controle 07 dias

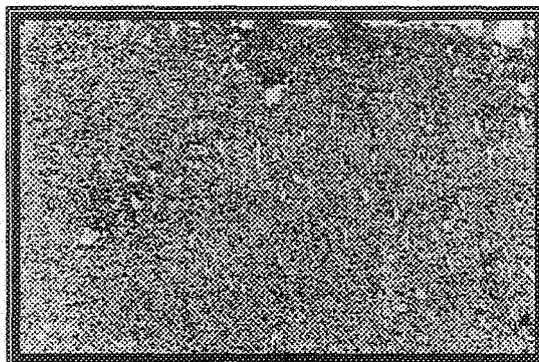


Figura 5.2 - Grupo Selênio 07 dias

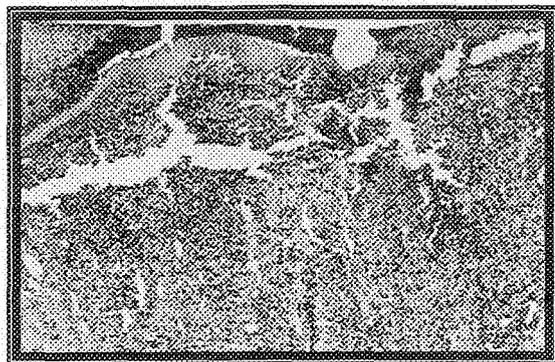


Figura 5.3 - Grupo Irrradiado 07 dias

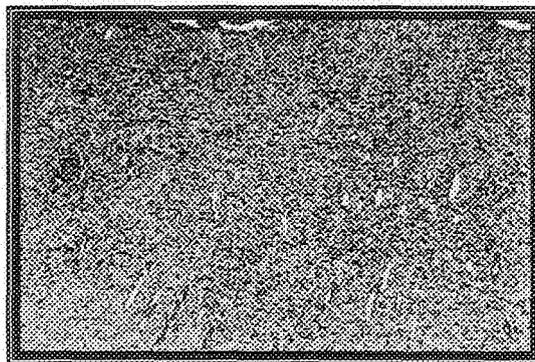


Figura 5.4 - Grupo Selênio Irrradiado 07 dias



Figura 5.5 - Grupo Controle 13 dias

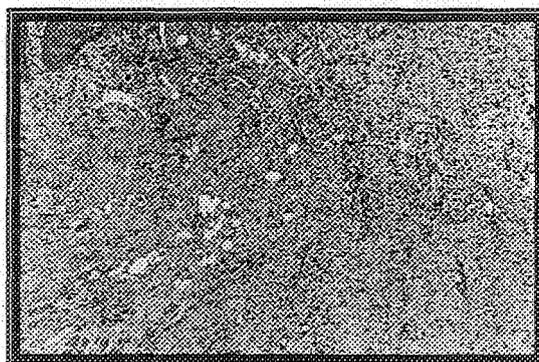


Figura 5.6 - Grupo Selênio 13 dias

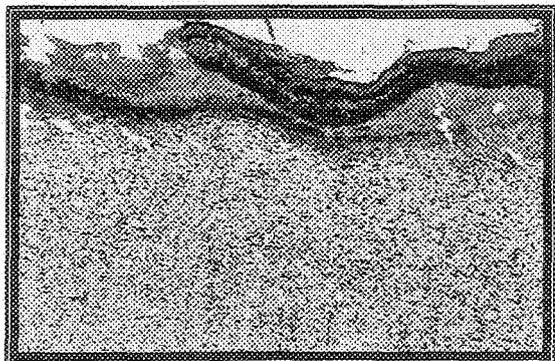


Figura 5.7 - Grupo Irrradiado 13 dias

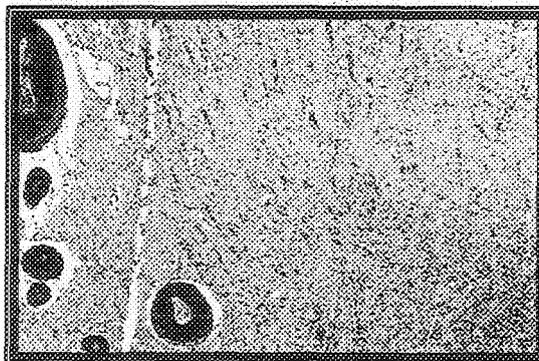


Figura 5.8 - Grupo Selênio Irrradiado 13 dias

PRANCHA 06

COLORAÇÃO POR HEMATOXILINA-HEOSINA

(aumento original 6.3 x 1.25 x 10)

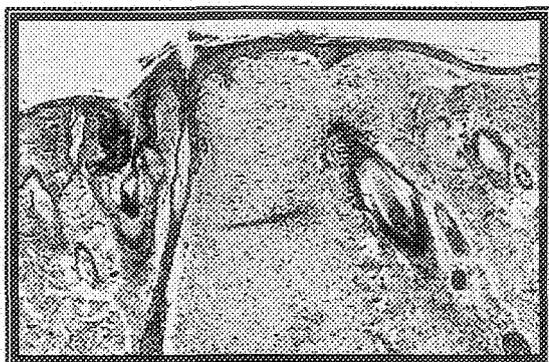


Figura 6.1 – Grupo Controle 21 dias

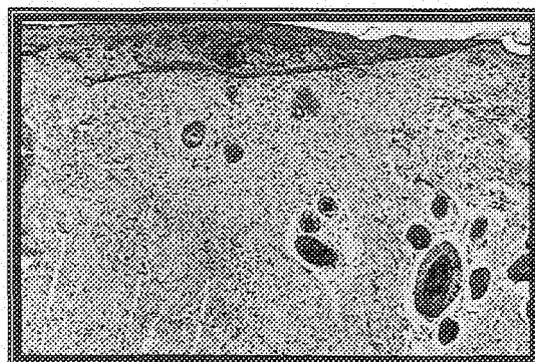


Figura 6.2 – Grupo Selênio 21 dias

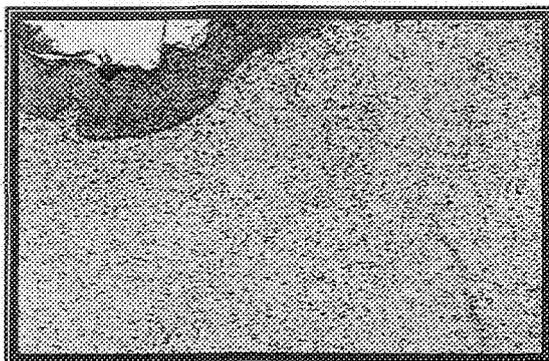


Figura 6.3 – Grupo Irradiado 21 dias

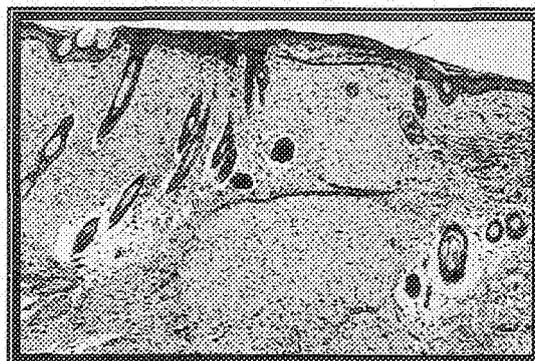


Figura 6.4 – Grupo Selênio Irradiado 21 dias

PRANCHA 07  
COLORAÇÃO POR PICROSIRIUS  
(aumento original 2.5 x 1.25 x 10)

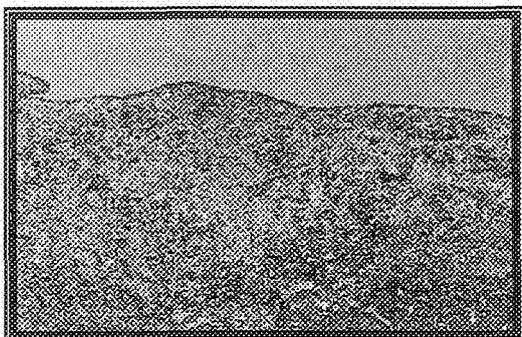


Figura 7.1 - Grupo Controle 04 dias

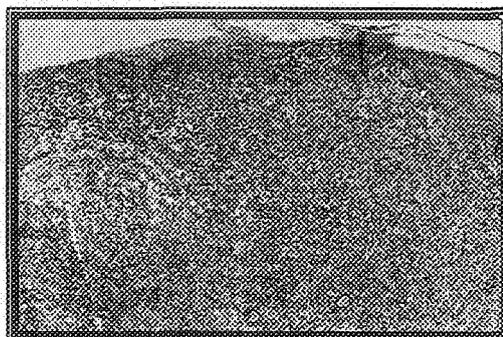


Figura 7.2 - Grupo Selênio 04 dias

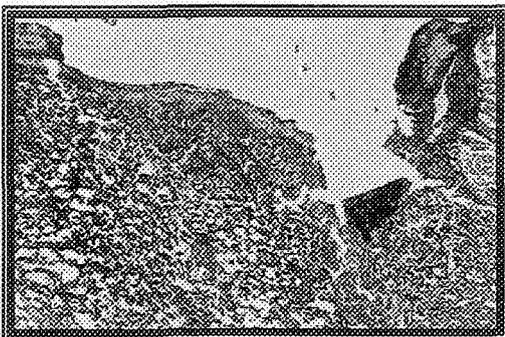


Figura 7.3 - Grupo Irradiado 04 dias

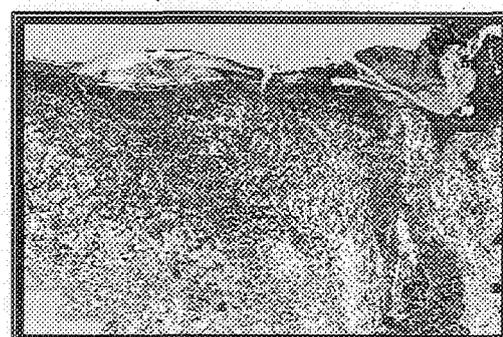


Figura 7.4 - Grupo Selênio Irradiado 04 dias

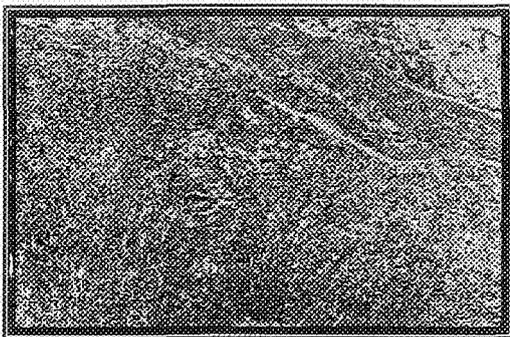


Figura 7.5 - Grupo Controle 07 dias

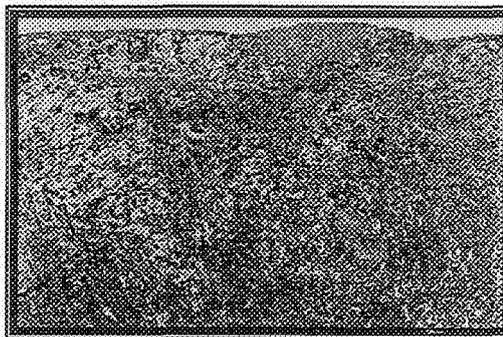


Figura 7.6 - Grupo Selênio 07 dias

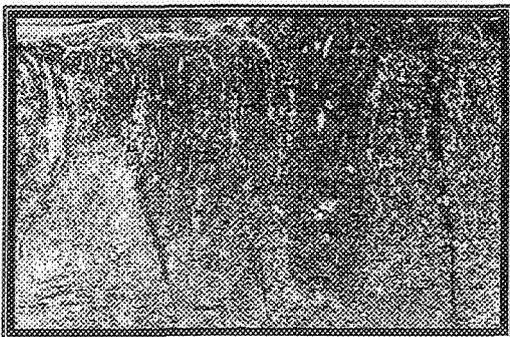


Figura 7.7 - Grupo Irradiado 07 dias

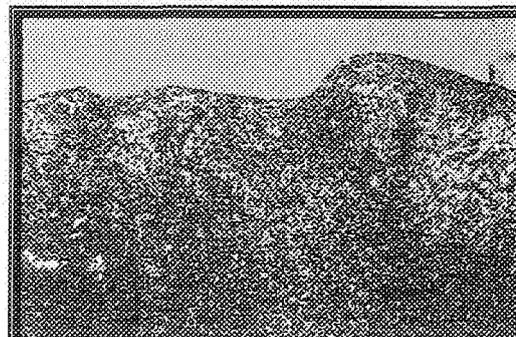


Figura 7.8 - Grupo Selênio Irradiado 07 dias

PRANCHA 08  
COLORAÇÃO POR PICROSÍRIUS  
(aumento original 2.5 x 1.25 x 10)

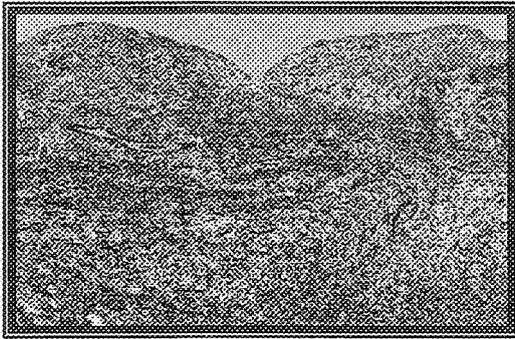


Figura 8.1 - Grupo Controle 13 dias

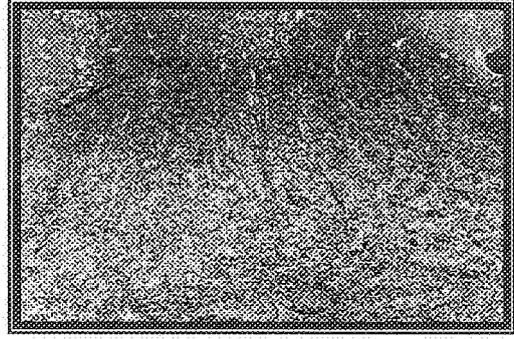


Figura 8.2 - Grupo Selênio 13 dias

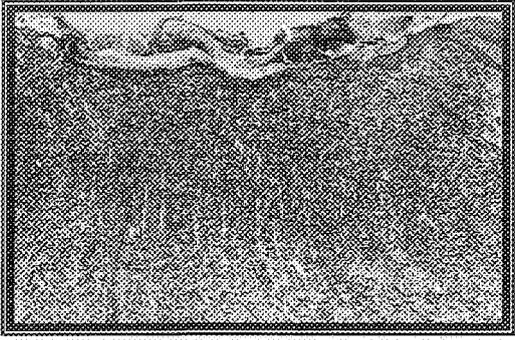


Figura 8.3 - Grupo Irradiado 13 dias

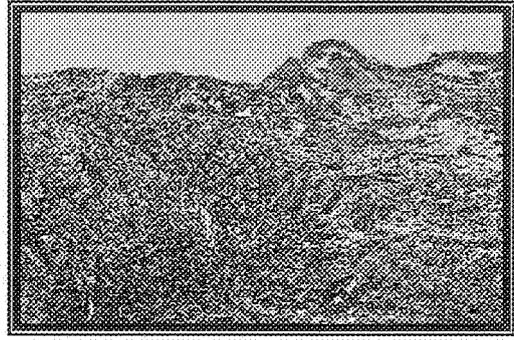


Figura 8.4 - Grupo Selênio Irradiado 13 dias

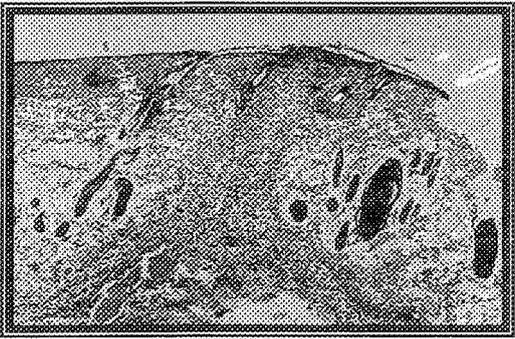


Figura 8.5 - Grupo Controle 21 dias

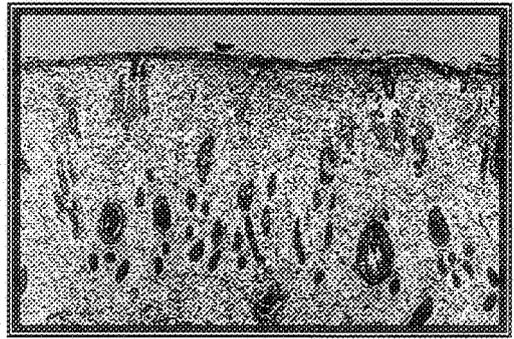


Figura 8.6 - Grupo Selênio 21 dias

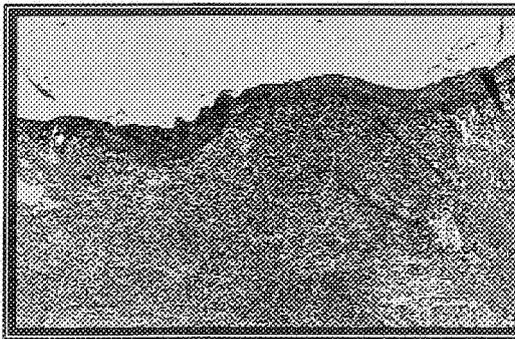


Figura 8.7 - Grupo Irradiado 21 dias



Figura 8.8 - Grupo Selênio Irradiado 21 dias

PRANCHA 09  
COLORAÇÃO POR PICROSÍRIUS  
(aumento original 6.3 x 1.25 x 10)

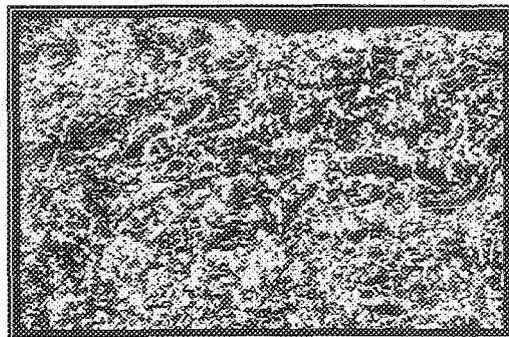


Figura 9.1 - Grupo Controle 04 dias

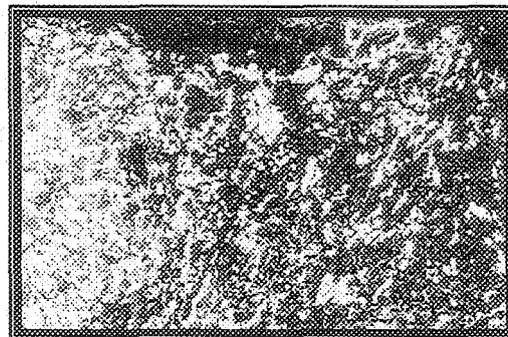


Figura 9.2 - Grupo Selênio 04 dias

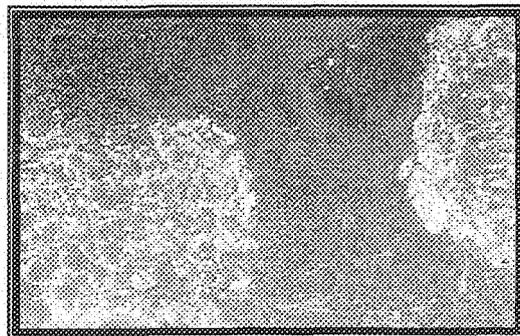


Figura 9.3 - Grupo Irrradiado 04 dias

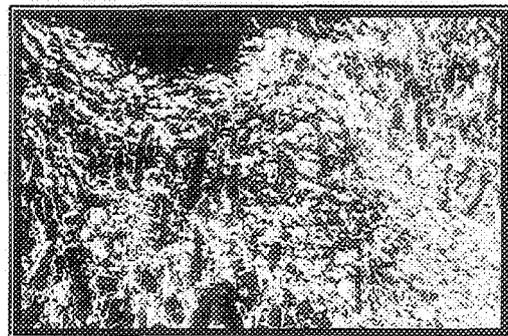


Figura 9.4 - Grupo Selênio Irrradiado 04 dias

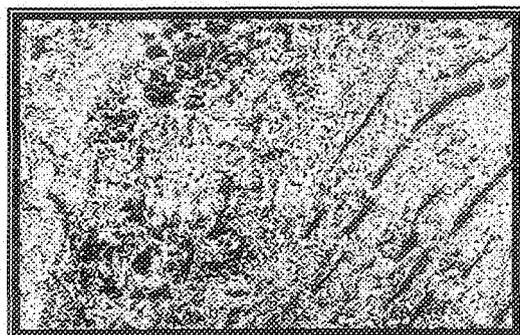


Figura 9.5 - Grupo Controle 07 dias

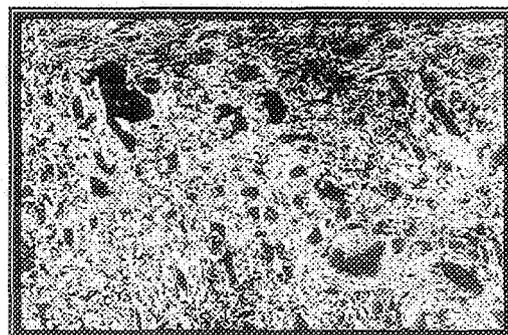


Figura 9.6 - Grupo Selênio 07 dias



Figura 9.7 - Grupo Irrradiado 07 dias



Figura 9.8 - Grupo Selênio Irrradiado 07 dias

PRANCHA 10  
COLORAÇÃO POR PICROSÍRIUS  
(aumento original 6.3 x 1.25 x 10)



Figura 10.1 - Grupo Controle 13 dias

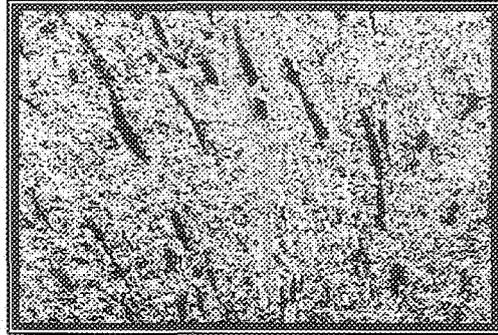


Figura 10.2 - Grupo Selênio 13 dias

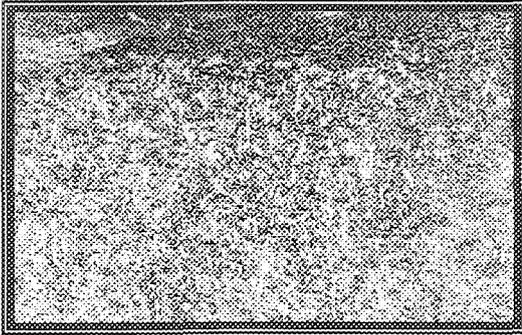


Figura 10.3 - Grupo Irradiado 13 dias

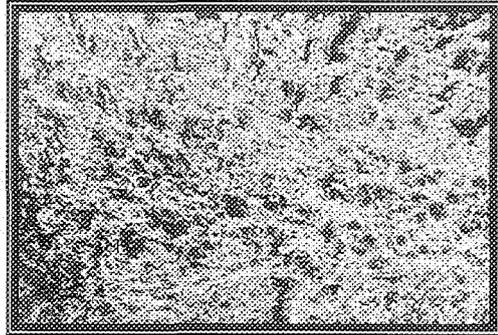


Figura 10.4 - Grupo Selênio Irradiado 13 dias

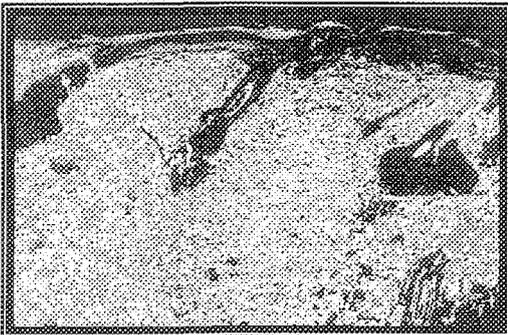


Figura 10.5 - Grupo Controle 21 dias



Figura 10.6 - Grupo Selênio 21 dias



Figura 10.7 - Grupo Irradiado 21 dias

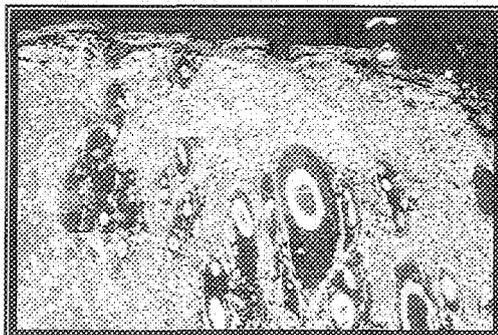


Figura 10.8 - Grupo Selênio Irradiado 21 dias

PRANCHA 11  
COLORAÇÃO POR AZUL DE TOLUIDINA  
(aumento original 16 x 1.25 x 10)



Figura 11.1 - Grupo Controle 07 dias - 180°

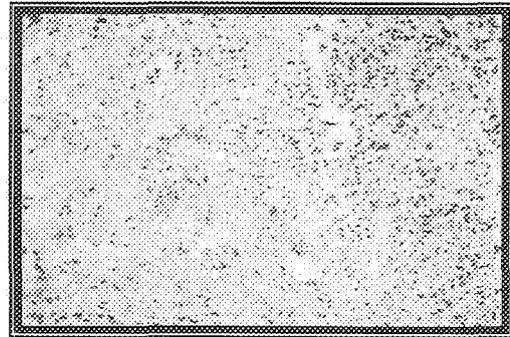


Figura 11.2 - Grupo Controle 07 dias - 90°

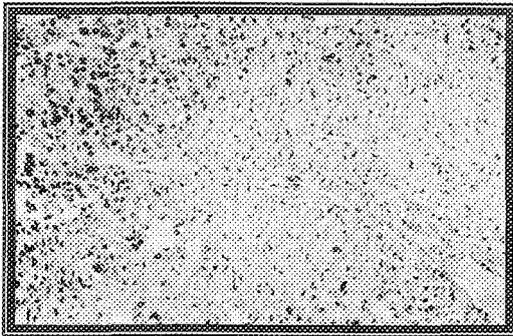


Figura 11.3 - Grupo Selênio 07 dias - 180°

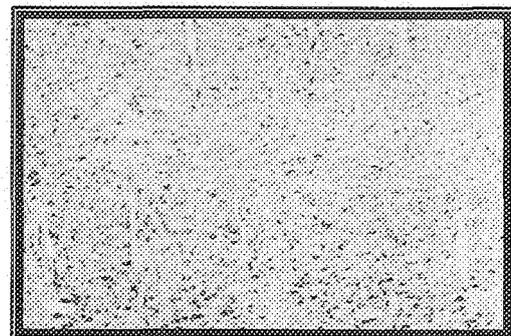


Figura 11.4 - Grupo Selênio 07 dias - 90°

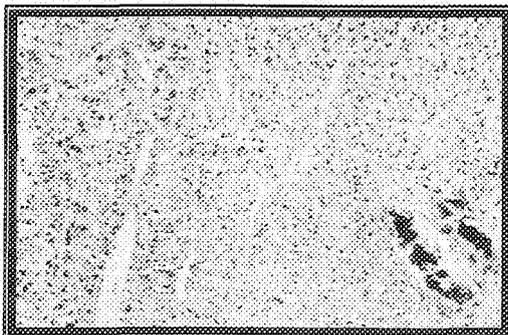


Figura 11.5 - Grupo Irradiado 07 dias - 180°

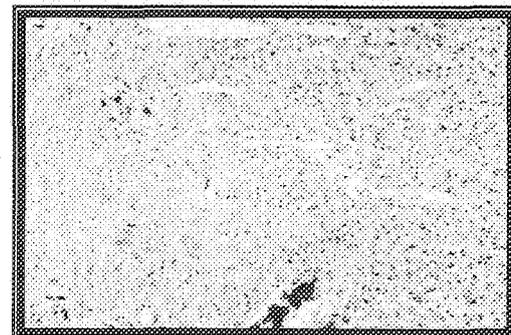


Figura 11.6 - Grupo Irradiado 07 dias - 90°

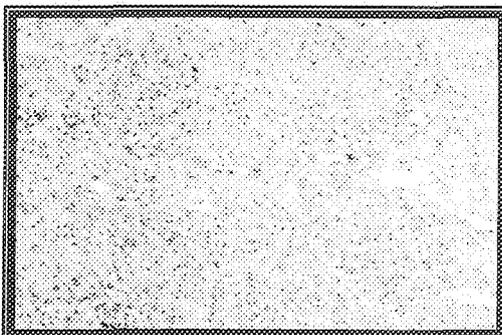


Figura 11.7 - Grupo Selênio Irradiado 07 dias - 180°

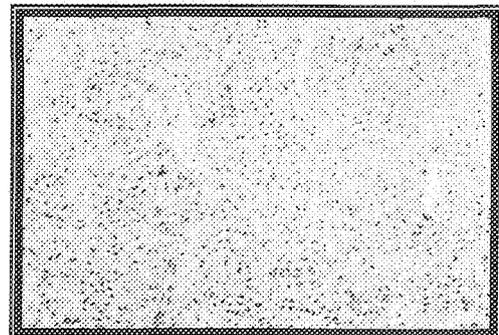


Figura 11.8 - Grupo Selênio Irradiado 07 dias - 90°

PRANCHA 12  
COLORAÇÃO POR AZUL DE TOLUIDINA  
(aumento original 16 x 1.25 x 10)

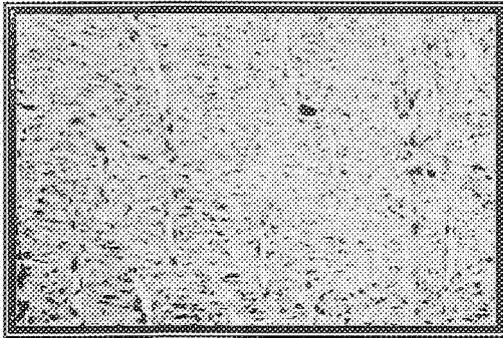


Figura 12.1 - Grupo Irradiado 13 dias - 180°

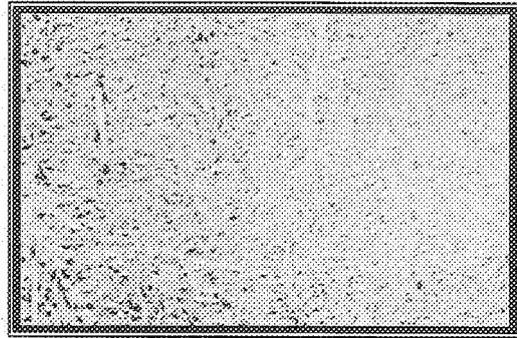


Figura 12.2 - Grupo Irradiado 13 dias - 90°

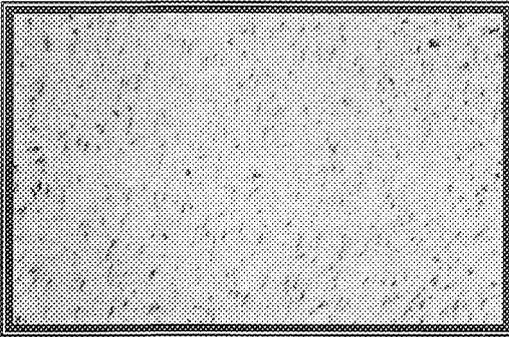


Figura 12.3 - Grupo Irradiado 21 dias - 180°

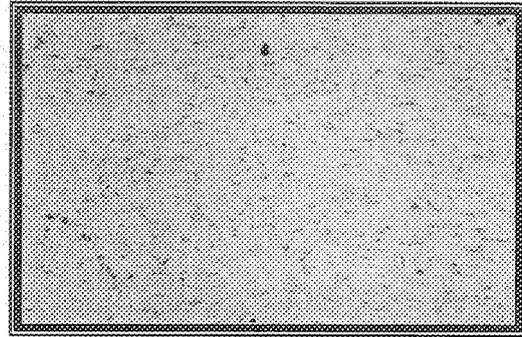


Figura 12.4 - Grupo Irradiado 21 dias - 90°

## **6. RESULTADOS:**

**S**eguem-se os resultados obtidos pelas análises dos materiais coletados através de exames microscópicos:

### **6.1 DESCRIÇÃO MORFOLÓGICA: COLORAÇÃO POR HEMATOXILINA-EOSINA**

#### **6.1.1 - 4º dia de reparação tecidual**

**Grupo controle:** A área da ferida, bastante ampla, encontra-se com predomínio de células necróticas, formando uma crosta necrótica com ausência de epitélio. Há presença de células inflamatórias com predomínio de neutrófilos e linfócitos. O

tecido de granulação está presente em áreas limitadas com vasos neoformados, fibroblastos e pequena quantidade de fibra neo-formadas devido ao pequeno tempo de reparo (figura 3.1).

**Grupo selênio:** A ferida também encontra-se bastante ampla e parece não haver diferença em relação ao tecido do grupo controle, com predomínio de tecido necrótico e conseqüentemente células necróticas com ausência de epitélio e pequena quantidade de tecido de granulação e fibras neo-formadas (figura 3.2).

**Grupo irradiado:** O tamanho da ferida apresenta-se muito ampla com predomínio de células necróticas formando uma crosta necrótica com ausência de epitélio. Há uma menor quantidade de neutrófilos e linfócitos com presença de tecido de granulação em alguns locais porém com menor quantidade de fibras e mais vasos, com hiperemia ativa em alguns deles (figura 3.3).

**Grupo selênio irradiado:** O tecido analisado é similar ao grupo controle, com presença de tecido necrótico e ausência de epitélio (figura 3.4).

### **6.1.2 - 7º dia de reparação tecidual**

**Grupo controle:** A ferida diminuiu em aproximadamente um terço da sua extensão, apresentando ainda a presença de crosta necrótica, em menor quantidade, com ausência de epitélio. Não observa-se área de tecido necrótico entre a crosta necrótica e o tecido de granulação. Presença de poucas células inflamatórias e o tecido de granulação apresenta-se com menor quantidade de vasos e maior quantidade de fibroblastos e formação de fibras (figura 3.5 e 5.1).

**Grupo selênio:** O tecido encontra-se semelhante ao observado no grupo controle, com presença de uma fina crosta e ausência de epitélio. O tecido de granulação apresenta pequena quantidade de vasos e maior quantidade de fibroblastos e fibras (figura 3.6 e 5.2).

**Grupo irradiado:** A crosta apresenta-se menos extensa e não observa-se formação de epitélio. Há presença de tecido necrótico entre a crosta e o tecido de granulação que apresenta um maior número de células inflamatórias, fibroblastos e vasos sanguíneos e, conseqüentemente, uma menor quantidade de fibras colágenas neo-formadas (figura 3.7 e 5.3).

**Grupo selênio irradiado:** Não há evidência de formação de tecido epitelial entre a crosta e o tecido de granulação e também não observa-se tecido necrótico. Uma menor quantidade de células inflamatórias são evidenciadas e o tecido de granulação apresenta uma menor quantidade de vasos e uma maior quantidade de fibroblastos e fibras colágenas (figura 3.8 e 5.4).

#### **6.1.3 - 13º dia de reparação tecidual**

**Grupo controle:** Há uma considerável redução no tamanho da ferida, onde não observa-se mais a presença da crosta necrótica. O epitélio encontra-se cobrindo totalmente a extensão da lesão e apresenta-se queratinizado. Não evidencia-se presença de tecido necrótico e células inflamatórias, e o tecido de granulação apresenta poucos fibroblastos, bastante fibroso com uma redução significativa de vasos neoformados (figura 4.1 e 5.5).

**Grupo selênio:** O epitélio encontra-se queratinizado, recobrando toda a extensão da lesão e abaixo dele verifica-se o tecido de granulação que apresenta ausência de células inflamatórias, diminuição do número de fibroblastos e vasos, com áreas bastante fibrosadas (figura 4.2 e 5.6).

**Grupo irradiado:** A extensão da ferida apresenta-se maior em comparação ao grupo controle, onde verifica-se ainda a presença de crosta necrótica e um início da migração do epitélio porém sem recobrir inteiramente a lesão. Não evidencia-se a presença de células inflamatórias e tecido necrótico, e o tecido de granulação apresenta-se menos fibroso com uma maior quantidade de fibroblastos (figura 4.3 e 5.7).

**Grupo selênio irradiado:** A ferida apresenta-se semelhante ao observado no grupo controle, com um recobrimento por epitélio queratinizado, com ausência de crosta, tecido necrótico e células inflamatórias. O tecido de granulação apresenta-se fibroso com uma menor quantidade de fibroblastos e vasos neoformados (figura 4.4 e 5.8).

#### **6.1.4 - 21º dia de reparação tecidual**

**Grupo controle:** Não se observa mais a presença da ferida cirúrgica. O epitélio apresenta-se bem formado, queratinizado, com a mesma espessura do epitélio

**RESULTADOS**

normal periférico, com todas as figuras que estão presentes em um tecido normal. O tecido de granulação está ausente com uma substituição por uma cicatriz que apresenta uma diminuição acentuada de fibroblastos e vasos e uma grande quantidade de fibras colágenas tornando este tecido altamente fibroso. É bem evidenciada a presença dos anexos da pele (figura 4.5 e 6.1).

**Grupo selênio:** Os aspectos morfológicos se encontram semelhantes às observadas no tecido do grupo controle, com ausência da ferida. Há uma substituição do tecido de granulação por uma cicatriz e com o epitélio bem formado de espessura semelhante ao tecido normal (figura 4.6 e 6.2).

**Grupo irradiado:** A ferida ainda é observada tendo em toda sua extensão o recobrimento por epitélio bem espesso. Observa-se a formação de uma cicatriz em seu estado inicial, com presença de maior quantidade de fibroblastos e vasos em relação ao grupo controle e menor quantidade de tecido fibroso (figura 4.7 e 6.3).

**Grupo selênio irradiado:** Não se evidencia mais a presença da ferida e o tecido é semelhante ao analisado no grupo controle. Há presença de uma cicatriz com tecido bastante fibroso e poucos vasos e fibroblastos. O epitélio encontra-se com

**RESULTADOS**

sua espessura normal, bem formado e queratinizado. São também observados os anexos normais da pele (figura 4.8 e 6.4).

## **ASPECTOS QUALITATIVOS**

### **6.2 EXAME DA BIRREFRINGÊNCIA ATRAVÉS DO MÉTODO DE PICROSÍRIUS**

A birrefringência dos feixes de colágeno dos tecidos de granulação dos diferentes grupos foi examinada através de cortes histológicos submetidos ao método do Picrosirius sob microscopia de luz polarizada.

A birrefringência intrínseca de um objeto exprime o seu grau de orientação macromolecular, sem adição de nenhum método artificial, a qual, na grande maioria, é demasiado tênue para produzir observações seguras. Por esse motivo, costuma-se introduzir moléculas de corante que se combinam com as macromoléculas orientadas do objeto, produzindo então uma birrefringência mais intensa, que é denominada birrefringência "de forma". Este tipo de birrefringência permite realizar avaliações mais precisas quanto à organização macromolecular do tecido sob exame.

A birrefringência intrínseca (própria) dos feixes de colágeno pode ser melhor evidenciada, principalmente nos primeiros dias de evolução tecidual, pelo método do Picrosirius, o que a transforma em birrefringência de forma.

É conveniente lembrar que através do exame de birrefringência sob luz polarizada, o brilho dos feixes de colágeno (brilho esse que expressa seu grau de

orientação macromolecular) se torna tanto mais intenso quanto mais numerosos e organizados eles estão.

#### **6.2.1 - 4 dia de reparação tecidual**

A birrefringência exibida pelo tecido de granulação do grupo controle permite observar-se que, aos 4 dias de desenvolvimento, o tecido exibe ainda pequena quantidade de feixes de colágeno esparsos, mas já denotando um certo grau de orientação macromolecular, conforme observado nas figuras 7.1 e 9.1. Esta birrefringência vai se tornando melhor visualizada de acordo com o passar do tempo.

Os tecidos de granulação dos grupos selênio e selênio irradiado, com pequenas variações sem relevância dentro dos padrões de brilho, exibem um grau de birefringência dos feixes de colágeno bastante semelhante àquele do grupo controle. (figuras 7.2, 7.4, 9.2 e 9.4).

O tecido de granulação do grupo irradiado ( figuras 7.3 e 9.3), entretanto, não exibiu nenhum grau de birrefringência, sugerindo que os feixes de colágeno existentes em muito pequena quantidade no local, ainda não apresentam um grau de orientação macromolecular suficiente para mostrar o brilho característico.

### **6.2.2 - 7º dia de reparação tecidual**

Aos 7 dias de desenvolvimento, a malha de feixes de colágeno dos tecidos de granulação de todos os grupos, como esperado, mostrou-se mais evoluída e conseqüentemente mais densa, resultando em um aumento do brilho da birrefringência dos tecidos. Os aspectos da birrefringência foram semelhantes nos grupos controle, selênio e selênio irradiado ( figuras 7.5, 7.6, 7.8, 9.5, 9.6 e 9.8). O exame do grupo irradiado mostrou que, embora já exibindo uma certa quantidade de feixes de colágeno organizados, o tecido de granulação é menos desenvolvido que os demais, sendo portanto menos brilhante em relação à sua birrefringência (figuras 7.7 e 9.7).

### **6.2.3 - 13º dia de reparação tecidual**

A mesma ordem nos aspectos da birrefringência dos tecidos de granulação repetiu-se aos 13 dias de reparação tecidual, com o natural aumento do fibrosamento e por conseguinte do brilho dos tecidos, mas sempre mostrando uma trama menos densa e um menor brilho do tecido de granulação do grupo irradiado em relação aos demais ( figuras 8.1, 8.2, 8.4, 10.1, 10.2 e 10.4)

#### **6.2.4 - 21° dia de reparação tecidual**

No último dia de avaliação do processo de reparação tecidual, as diferenças da birrefringência entre os diversos grupos eram menos evidente, embora mais intensa para os grupos controle, selênio e selênio irradiado quando comparado com o grupo irradiado (figuras 8.5, 8.6, 8.8, 10.5, 10.6 e 10.8).

## **ASPECTOS QUALITATIVOS**

### **6.3 - EXAME DO DICROÍSMO LINEAR PELO AZUL DE TOLUIDINA**

O dicróismo, segundo BENNETT (1967), pode ser definido como um fenômeno onde a absorção da luz de um determinado comprimento de onda por um objeto transmissor varia com o estado de polarização da luz transmitida.

No dicróismo linear, a absorção da luz varia conforme se muda o azimute de luz polarizada transmitida, com respeito ao eixo do objeto.

Na microscopia de luz polarizada, o dicróismo linear depende do azimute da luz polarizada linear, que é transmitida através do objeto em observação, observando-se as alterações de cor.

O dicróismo pode ser induzido nos tecidos por métodos de colorações apropriados. Corantes orgânicos, tais como Vermelho Congo, Tionina e Azul de Toluidina, ligam-se aos tecidos de tal forma que as moléculas do corante tornam-se suficientemente orientados de forma a favorecer o dicróismo nos ditos tecidos.

Neste trabalho, utilizou-se o Azul de Toluidina a 0,025%, ph 4, para a indução do dicróismo linear nos tecidos oriundos dos diversos grupos, com a finalidade de verificar-se a organização tecidual, através da presença ou ausência da orientação macromolecular do tecido em evolução.

**RESULTADOS**

Neste método de estudo, as moléculas do corante Azul de Toluidina ligam-se às glicosaminoglicanas, produzidas pelos fibroblastos, que por sua vez são ligadas orientadamente às moléculas do colágeno conforme o tecido evolui. O tecido corado, analisado sob a luz polarizada, mostra coloração azul ortocromática quando as fibras colágenas encontram-se paralelas ao plano de polarização da luz; a rotação de 90° ou 180° na platina rotatória do microscópio imprime a coloração rosa metacromática às fibras colágenas orientadas. Esse fenômeno do dicroísmo só se apresenta quando há orientação macromolecular do tecido, caso contrário os tecidos, em qualquer plano de polarização da luz, permanecem com a cor azul ortocromática.

As observações realizadas permitiram verificar-se que o grupo controle apresentou dicroísmo no 7º dia de desenvolvimento do tecido de granulação (figuras 11.1 e 11.2), o mesmo acontecendo com os grupos selênio e selênio irradiado ( figuras 11.3, 11.4, 11.7 e 11.8). Em contrapartida, o grupo irradiado, ao 7º dia, ainda não apresentava o dicroísmo ( figuras 11.5 e 11.6).

Para o grupo irradiado, o fenômeno não foi observado no 13º dia de reparação ( figuras 12.1 e 12.2), apresentando o dicroísmo no 21º dia de reparação ( figuras 12.3 e 12.4).



## 7. DISCUSSÃO

O uso de substâncias que permitam uma diminuição nos efeitos deletérios produzidos pela radiação tem sido amplamente pesquisado, desde o sucesso com o primeiro radioprotetor *in vivo* descrito por PATT et al. em 1949, citado por WEISS (1987). A partir de então, diversas substâncias já foram e estão sendo testadas, podendo-se citar o WR 2721, a vitamina E, o Cobre, o Zinco e os derivados do Selênio, entre eles o Selenito de Sódio, um sal derivado do selênio que apresenta propriedade radioprotetora possivelmente relacionada com a enzima antioxidante glutathiona peroxidase.

A reparação tecidual é resultado de uma seqüência de eventos fisiológicos que se caracteriza, segundo FELIX *et al.* (1990), por três fases distintas: a inflamatória, a proliferativa e a de maturação. Estes eventos promovem, entre outras respostas, o aumento da permeabilidade vascular, vasodilatação, remoção

de resíduos celulares pelos granulócitos, além da reorganização da rede de colágeno pelos fibroblastos, que se apresentam multiplicados.

A grande maioria dos trabalhos revista na literatura pesquisa a cerca das radiações ionizantes utilizando radiação X, no entanto, fez-se à escolha pelo uso da radiação de elétrons, devido o crescente uso deste tipo de radiação nos tratamentos radioterápicos e por serem radiações consideradas diretamente ionizantes. Além disso, de acordo com a energia do feixe, pode-se controlar o poder de penetração deste.

A dose utilizada para este experimento foi de 6,0 Gy, sendo considerada uma alta dose. A utilização desta dose teve como finalidade causar acentuado prejuízo no processo de reparação tecidual, uma vez que ALMEIDA (1997) e MONTEIRO (1999) utilizando uma dose de radiação, também de elétrons, mas bem mais baixa, 1,0 Gy, observaram haver um retardo no processo de cicatrização de feridas em ratos. Já LOURENÇO (2000), que também utilizou uma dose de 1,0 Gy de radiação de elétrons, avaliando, entretanto, o efeito deste tipo de radiação em enzimas que têm participação ativa no processo de reparação tecidual, observou que estas têm seu nível alterado quando o tecido de granulação é irradiado. Também WANG *et al.* (1994) que utilizaram 9,6 Gy de radiação de elétrons, embora realizando irradiação pré-operatória, observaram um considerável retardo na formação do tecido de granulação, com alterações na população de fibroblastos que se encontravam modificados quanto a sua forma, orientação e tamanho, observando-se pouca formação de fibras colágenas.

Os tecidos previamente injuriados foram submetidos à radiação de elétrons somente 3 dias após realizada à cirurgia. Pesquisas anteriormente realizadas por POWERS *et al.* (1967), BAKER & KROCHACK (1989), HALL (1994), ALMEIDA (1997) e MONTEIRO (1999), demonstraram que o tempo transcorrido entre o procedimento cirúrgico e a irradiação influencia no processo de reparação tecidual, sendo que quanto maior o tempo entre esses dois procedimentos, maior será o prejuízo para o tecido neoformado. Isto é decorrente do fato de que o período correspondente à fase inicial da formação do tecido de granulação corresponde ao período mais sensível à radiação ionizante.

Em relação ao tempo escolhido para a administração do radioprotetor de escolha, optou-se pela administração 24 horas antes da irradiação, como observado nos trabalhos de BOREK *et al.* (1986), WEISS *et al.* (1990) e RAFFERTY *et al.* (1998) e WEISS & LANDAUER (2000). Ainda pode-se observar nos resultados de RAFFERTY *et al.* que quando o selenito de sódio foi administrado 24 horas antes da irradiação, este produzia a sua máxima proteção, enquanto que quando administrado posteriormente à irradiação, este apresentava um reduzido efeito radioprotetor.

O processo de reparação tecidual foi avaliado através de 3 métodos, tendo como finalidade observá-lo sob aspectos diferentes: nas lâminas coradas com hematoxilina-eosina, teve-se como finalidade observar a forma estrutural dos tecidos, verificando-se os aspectos histológicos característicos do tecido de granulação, ou seja, os fenômenos exudativos-vasculares, como a proliferação de

pequenos vasos sangüíneos neoformados, a presença de fibroblastos e a formação de fibras colágenas. Outro método utilizado foi a birrefringência, para a observação dos feixes de fibras colágenas, utilizando-se a coloração por picosirius. Por fim, a organização macromolecular desses feixes foi avaliada pela técnica do dicroísmo linear.

Assim sendo, foi possível observar que no 4º dia de reparação tecidual havia uma semelhança entre os grupos analisados, fato este observado devido ao pouco tempo de reparo, com o predomínio de células necróticas, formando uma crosta necrótica sem a presença de epitélio. O tecido de granulação pôde ser observado somente em alguns locais isolados, com a presença de poucos fibroblastos e uma maior quantidade de vasos neoformados, fato que também foi verificado por ALMEIDA (1997), que relata que nos primeiros dias de reparação tecidual a neoformação de fibras colágenas é quase inexistente, o que foi comprovado em nosso experimento com o exame da birrefringência. Uma discreta diferença entre o grupo irradiado e os demais grupos, incluindo o grupo selênio irradiado, pôde ser observado na quantidade de células inflamatórias, mais especificamente os neutrófilos e os linfócitos, que se apresentaram em menor quantidade no grupo irradiado, além de se observar neste grupo presença de hiperemia em alguns vasos. No exame da birrefringência, verificou-se que o grupo selênio irradiado apresentou resultados semelhantes aos grupos controle e selênio, expressando uma pequena quantidade de feixes de fibras colágenas, porém já denotando um certo grau de orientação macromolecular. No entanto, o

grupo irradiado não apresentou nenhum grau de birrefringência, o que sugere que a quantidade de feixes de fibras colágenas é muito pequena, apresentando pequeno grau de orientação macromolecular. Esses fatos evidenciam o início de um retardo no processo de reparação do grupo irradiado, o que foi previamente observado por WANG *et al.* (1994); ALMEIDA (1997) e MONTEIRO (1999), mesmo que nos dois últimos trabalhos tenham sido utilizadas baixas doses de radiação de elétrons.

Após o 7º dia de reparação tecidual, as diferenças entre os grupos tornam-se mais evidentes. A diferença entre os grupos controle e irradiado deu-se principalmente pelo fato de que no grupo irradiado observa-se a presença de necrose interposta entre a crosta e o tecido de granulação, tendo como consequência uma maior quantidade de células inflamatórias. O tecido de granulação encontrava-se presente em todos os grupos, apresentando-se com menor quantidade de vasos e maior proliferação de fibroblastos e fibras colágenas, com exceção do grupo irradiado que apresentava um maior prejuízo no tecido de granulação com um maior número de células inflamatórias, fibroblastos e vasos sanguíneos e, conseqüentemente, uma menor quantidade de fibras colágenas neoformadas.

No exame da birrefringência, os grupos apresentavam uma maior quantidade de fibras colágenas com a presença de feixes de fibras colágenas já apresentando uma certa organização macromolecular em relação ao processo com 7 dias, podendo-se observar a mesma seqüência quanto à intensidade do

brilho representado pela birrefringência dos tecidos, ou seja, os grupos controle, selênio e selênio irradiado apresentavam uma maior intensidade caracterizando uma maior organização destes feixes. No entanto, o grupo irradiado apesar de apresentar uma certa quantidade de feixes de fibras colágenas organizadas, o seu tecido de granulação apresentou-se menos desenvolvido sendo, portanto menos brilhante em relação a sua birrefringência. Isto pode ter sido decorrente de uma inibição na proliferação dos fibroblastos através do uso de radiação ionizante, acarretando um atraso no processo de reparação tecidual, fato que também foi verificado por SILVADO (1992); WANG *et al.* (1994); ALMEIDA (1997) e MONTEIRO (1999). Quando se utilizou a técnica do dicróismo linear, verificou-se que o grupo controle apresentou o dicróismo a partir do sétimo dia de reparação tecidual, ou seja, este grupo apresentou uma maturação tecidual evidente a partir deste período de reparação. Os mesmos resultados foram encontrados para o grupo selênio e para o grupo selênio irradiado, permitindo obter-se duas conclusões, primeiro: demonstra através do grupo ferida e selênio que o selenito de sódio não interfere no processo de reparação tecidual, concordando com os achados de BANG *et al.* (1995); segundo: através do grupo selênio irradiado, que o selênio agiu como elemento radioprotetor no processo de reparação tecidual. WARD *et al.* (1987) e DRAKE *et al.* (1995) citam que o dano provocado pela radiação no processo de reparação tecidual é causado pela ionização de átomos, criando radicais livres. Por sua vez, autores como SHIMAZU *et al.* (1964) e TAPPEL (1965) relacionam a ação radioprotetora do selênio à captura destes radicais. Outro fator que pode ter influenciado para que o grupo selênio irradiado

apresentasse a mesma evolução tecidual em relação ao grupo controle deve-se, possivelmente, pela ação dessa substância no sentido de evitar a inibição da proliferação de fibroblastos causada pela irradiação, o que fica caracterizada pela interação das moléculas de glicosaminoglicanas que já se encontram presentes no tecido, sendo capazes de interagir com o corante metacromático.

As diferenças entre os grupos controle, selênio e selênio irradiado em relação ao grupo irradiado, ainda ficam evidentes quando passados 13 dias de reparação tecidual. Isto se torna claro pela observação no grupo irradiado de um retardo no processo de reparação, caracterizado por apresentar maior extensão da ferida em relação aos demais grupos; presença de tecido necrótico na área da lesão; tecido de granulação menos fibroso com uma maior quantidade de fibroblastos; início da migração epitelial, sem recobrimento total da lesão, com ausência de queratina. Nos demais grupos o processo de reparo está em estágio final, com diminuição da área da ferida, que se apresenta recoberto por epitélio com presença de queratina e ausência de tecido necrótico. O tecido de granulação apresenta-se bastante fibrosado, observando-se pequena quantidade de fibroblastos e vasos neoformados, o que demonstra o estágio avançado da maturação deste tecido, o que pode ser comprovado quando observada uma maior intensidade do brilho representado pela birrefringência. As diferenças de birrefringência entre os grupos seguiu a mesma sequência encontrada nos grupos com 7 dias de reparação, diferindo apenas quanto à intensidade, mostrando haver uma maior organização destas fibras neste período. Quanto ao dicroísmo, ao 13

dias de reparação tecidual, não houve nenhuma mudança em relação ao grupo irradiado, o que demonstra não haver maturação tecidual evidente neste grupo.

Quando se compara o grupo irradiado e o grupo selênio irradiado, fica nítida a diferença de maturação dos tecidos analisados, podendo-se comprovar que o grupo irradiado, no qual administraram-se o selenito de sódio, apresentou novamente um comportamento similar ao grupo controle, demonstrando o efeito radioprotetor desta substância quando analisado o processo de reparo de feridas irradiadas.

A diferença dos resultados obtidos entre os grupos irradiado e irradiado com a administração do selênio, pode estar relacionada com a enzima glutathione peroxidase, que é classificada como antioxidante enzimático. Esta enzima foi primeiramente avaliada por ROTRUCK *et al.* em 1973, levantando a suspeita de que o selênio poderia ser um componente da glutathione peroxidase, podendo isto ser a explicação da sua ação radioprotetora, pois é sabida que o mecanismo primário desta enzima é a degradação do peróxido de hidrogênio nas células, mostrando ser um importante protetor dos lipídios da membrana celular contra a desintegração a partir da oxidação. Neste mesmo ano FLOHE *et al.* classificaram a enzima glutathione peroxidase como uma selenoenzima, comprovando que a deficiência do selênio leva a uma diminuição na atividade desta enzima, considerando o selênio como um componente essencial da glutathione peroxidase, o que posteriormente também foi demonstrado por diversos trabalhos (HAFEMAN *et al.*, 1974; CHOW *et al.*, 1964 e SCOTT *et al.*, 1964, LAWRENCE *et al.*, 1976, LECCIA *et al.*, 1993). Porém, SANDSTRÖN *et al.* (1989), verificaram que o selênio

induz à variação do nível da atividade da enzima glutathiona peroxidase, sem apresentar o efeito na proteção da quebra de DNA e da lise celular provocada pela radiação. Estes autores ainda afirmaram não haver diferença quanto à radiosensibilidade do grupo controle e do grupo tratado com selênio, contrariando a grande diferença da atividade enzimática da glutathiona peroxidase, que apresentava-se bastante aumentada, concluindo que os efeitos radioprotetores do selênio não são devido ao aumento da atividade da enzima glutathiona peroxidase.

Após 21 dias de reparação tecidual, a ferida não se encontrava presente nos grupos controle, selênio e selênio irradiado, porém no grupo irradiado, fica evidente haver um atraso no processo de reparação tecidual, caracterizado pela presença da ferida cirúrgica. Além disso, o epitélio que recobre a área da ferida apresenta-se mais espesso em relação ao epitélio do tecido normal caracterizando a formação de uma cicatriz no estado inicial. O tecido de granulação não está mais presente em nenhum dos grupos, porém algumas alterações ainda são evidentes apenas no grupo irradiado, como a presença de grande número de fibroblastos apresentando, conseqüentemente, uma menor quantidade de tecido fibroso formado, o que pode ser explicado pela inibição na proliferação dos fibroblastos através do uso da irradiação, fato que também foi verificado por SILVADO (1992), ALMEIDA (1997) e MONTEIRO (1999). Porém, o grupo selênio irradiado apresentou, desde a sua fase inicial, um processo de reparo semelhante ao grupo controle, fato que pode ser explicado pela radioproteção deste elemento nos fibroblastos, como verificado anteriormente por LECCIA *et al.* (1993).

Ainda nesta fase, é possível verificar que os demais grupos com exceção do grupo irradiado apresentaram uma acentuada redução na quantidade do número de vasos. Fica evidente que o processo de reparo está em estágio final quando são visualizados os anexos da pele, ou seja, o tecido de granulação que foi substituído por uma cicatriz apresenta agora todas as figuras presentes em um tecido normal. Entretanto, este quadro não foi observado no grupo irradiado, demonstrando novamente a diferença em relação ao grupo selênio irradiado.

As diferenças da birrefringência entre os grupos tornaram-se menores após 21 dias de gênese tecidual, embora menos intensa para o grupo irradiado, que se apresentou com feixes organizados, porém com uma menor maturidade tecidual em relação aos demais grupos.

O fenômeno do dicroísmo, no grupo irradiado, somente foi observado no vigésimo primeiro dia de reparação tecidual, demonstrando que o tecido de granulação apresenta-se extremamente prejudicado quando irradiado com radiação de elétrons, o que não foi observado quando utilizado o selênio, comprovando o efeito radioprotetor deste elemento, concordando com os achados de SANDSTRÖN *et al.* (1989); WEISS *et al.* (1990), que embora não tenha usado o selênio isoladamente, como foi utilizado nesta pesquisa, e sim com o WR2721, concluiu que esse elemento, dentre outros avaliados, de certa forma potencializou o efeito radioprotetor desta substância; LECCIA *et al.* (1993), que cita a ligação entre o selênio e a enzima glutathione peroxidase; LINDH *et al.* (1996) e RAFFETY *et al.* (1998).

Os resultados encontrados em relação à completa reparação no grupo irradiado foram discordantes dos observados por WANG *et al.* (1994) que, utilizando uma dosagem maior em relação a este experimento (9,6 Gy), apresentou um restabelecimento total no processo de reparo no 14<sup>o</sup> dia, enquanto que os resultados deste estudo, até o final do experimento, encontrou-se diferenças morfológicas e estruturais quando comparado o grupo irradiado com os demais grupos. Esta divergência nos resultados deve-se, possivelmente, à metodologia empregada diferentemente para os dois trabalhos. No trabalho de WANG *et al.* a irradiação é realizada antes e, somente sete dias depois, é realizada a cirurgia para a produção das feridas, enquanto que neste trabalho a irradiação é administrada no tecido de granulação, ou seja, a ferida é produzida antes dos animais serem irradiados.

Nestas técnicas utilizadas foi possível avaliar o tecido em reparação dos diversos grupos no seu aspecto estrutural e morfológico, assim como a qualidade do tecido e sua maturação através da quantidade e disposição dos feixes de fibras colágenas, juntamente com o seu grau de orientação macromolecular, o que permitiu observar a presença de um intenso retardo provocado pela irradiação. Também foi possível observar a ação do selenito de sódio no processo de reparação tecidual, quando administrado isoladamente, o qual não exerceu nenhuma influência, quer seja no sentido de retardar ou de acelerar o processo, bem como quando da interação entre este elemento e altas doses de radiação de elétrons, onde demonstrou o seu efeito radioprotetor no processo de reparação,

uma vez que estes grupos assemelhavam-se ao grupo controle, em todas as técnicas microscópicas utilizadas. Isto permite concluir que, como o processo de reparação tecidual é prejudicado com o uso da radiação, a administração do selenito de sódio não tem influência no processo de reparação em si, o que foi observado no grupo ferida e selênio, mas sim no combate aos efeitos teratogênicos da radiação ionizante, caracterizado pela disposição normal dos fibroblastos e das fibras colágenas, observado no grupo selênio irradiado.

Sabe-se que o dano decorrente da ação da radiação ionizante no processo de reparo está relacionado ao fato de que ocorrem interações entre a radiação e os tecidos vivos, provocando a ionização dos átomos. Sendo assim, ocorre a formação de radicais livres que uma vez permanecendo em estado instável, causam danos ao DNA de células da ferida. Uma das principais substâncias formadas é o peróxido de hidrogênio, substância altamente tóxica para as células. A ação do selênio, provavelmente é devido ao fato de que esta substância aumenta o nível da glutathione peroxidase. Por sua vez, esta enzima combate os radicais livres, funcionando como um perfeito antioxidante.

Outra explicação que se pode dar em relação ao efeito radioprotetor do selênio está relacionado à sua ação sobre os fibroblastos. Sabe-se que estas células representam umas das principais, entre tantas, no processo de reparação tecidual, embora seja difícil classificar o grau de importância de todos os elementos que participem deste processo. No entanto, como LO et al (1978) demonstraram haver síntese de reparo do DNA de fibroblastos expostos ao

**DISCUSSÃO**

selenito, pode-se supor que a radiação de elétrons causou um dano no DNA dos fibroblastos, mas o selênio contribuiu reparando este dano.

De tudo isso, fica claro o papel radioprotetor do selenito de sódio, no processo de reparação tecidual. Isto se torna de fundamental importância, devido ao fato de que a utilização de tratamentos combinados, entre radioterapia e cirurgia, é um procedimento que pode ser usado na rotina de centros especializados no tratamento de lesões malignas. A utilização de um elemento radioprotetor, que não interfere no processo de reparação tecidual, sem dúvida nenhuma, é de grande importância.

## **8. CONCLUSÕES:**

**D**os resultados obtidos nesta pesquisa, e dentro das condições experimentais utilizadas, obtiveram-se as seguintes conclusões:

- 1) A utilização de altas doses de radiação de elétrons aplicada nas feridas produzidas artificialmente, provocou um atraso no processo de reparo significativo, em relação ao grupo controle, porém não impediu a cicatrização final destas feridas;
- 2) A utilização do Selenito de Sódio no grupo controle, ou seja, sem a interferência da radiação, não interferiu no processo de reparação tecidual, mostrando-se, em todos os dias analisados, semelhante macroscopicamente e microscopicamente ao grupo controle;

- 3) A aplicação de 2,0 mg de Selenito de Sódio i.p. b.w., utilizado 24 horas antes da irradiação de elétrons, mostrou ser um radioprotetor eficaz, visto que o processo de reparo apresentou-se histologicamente semelhante ao grupo controle em todos os dias analisados;
- 4) A formação das fibras colágenas apresentou-se semelhante nos grupos onde foram administrados o Selenito de Sódio em relação ao grupo controle, o que não foi verificado no grupo irradiado, no qual apresentou uma inibição na proliferação dos fibroblastos e, conseqüente, retardo na formação das fibras colágenas provocando o atraso na reparação tecidual.
- 5) O processo de reparação tecidual nos grupos onde foram administrados o Selenito de Sódio, foi observado estar completamente formado no vigésimo primeiro dia de reparo, assemelhando-se com o grupo controle, não apresentando nenhuma diferença significativa decorrente do uso da irradiação;
- 6) O grupo irradiado apresentou-se, macroscopicamente, com o completo fechamento da ferida no vigésimo primeiro dia de análise, porém o que não correspondeu ao observado microscopicamente, estando o seu processo de reparo em estágio final, porém não completado totalmente.

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS\***

1. AGUILAR, P.B. *Estudo da toxicidade e da proteção hematológica dos efeitos agudos da radiação pela N-acetilcisteína em pacientes submetidos à radioterapia pélvica por câncer do colo ou corpo de útero*. São Paulo, 1999. 126p. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina, Universidade Estadual de São Paulo.
2. ALMEIDA, S.M. *Efeito da radiação de elétrons na reparação tecidual*. Piracicaba, 1997. Tese (Doutorado) - Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas.
3. BAILEY, A.J. Effect of ionizing radiation on connective tissue components. *Int Rev Connect Tissue Res*, New York, v.4, p.233-281, 1968.
4. BAKER, D.G., KROCHAK, R.J. The response of the microvascular system to radiation: a review. *Cancer Invest*, New York, v.7 n.3 p.287-294, 1989.
5. BANG, R.L. et al. Keloid and hypertrophic scars: trace element alteration. *Nutrition*, Burbank, v.11, n.5, p.527-531, 1995.

---

\* De acordo com a NBR 6023, de 1989, da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT). Abreviatura dos periódicos em conformidade com o "Medline".

6. BENNETT, H. S. Methods applicable to the study of both fresh and fixed materials. In: JONES, R. M. (ed) **Mc Clung's handbook microscopical Techniques**. 3 ed. New york: Hafner Publishing, 1967. Cap. 9, p. 591-695.
7. BOREK, C. Molecular mechanisms in cancer induction and prevention. ***Environ Health Perspect***, Research Triangle Park, v.101, Suppl., p.237-245, 1993.
8. BOREK, C. et al. Selenium and vitamin E inhibit radiogenic and chemically induced transformation in vitro via different mechanism. ***Proc Natl Acad Sci***, Washington, v.83, p.1490-1494, 1986.
9. BRECCIA, A. et al. On the chemical radioprotection by organic selenium compounds in vivo. ***Radiat Res***, Charlottesville, v.38, p.483-492, 1969.
10. BURK, R.F. et al. Influence of dietary and injected selenium on whole-body retention, route of excretion, and tissue retention of <sup>75</sup>SeO<sub>3</sub><sup>2-</sup> in the rat. ***J Nutr***, Bethesda, v.102, p.1049-1056, 1972.
11. CAMPOS, F.G.C.M. ***Efeito da glutamina e dieta elementar no intestino irradiado: estudo experimental em ratos***. São Paulo, 1992. 66p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina, Universidade Estadual de São Paulo.
12. CARROLL, M. P. et al. Efficacy of radioprotective agents in preventing small and large bowel radiation injury. ***Dis Colon Rectum***, Baltimore, v.38, n.7, July 1995.
13. CEKAN, E. et al. effects of dietary supplementation with seleniomethionine on the teratogenic effect of ionizing radiation in mice. ***Acta Radiol Oncol***, Stockholm, v.24, p.459-463, 1985.

14. CEKAN, E. et al. Protective effect of selenium against ionizing radiation-induced malformation in mice. *Acta Radiol Oncol*, Stockholm, v.24, p.267-271, 1985.
15. CHOW, C.K. et al. Response of glutathione peroxidase to dietary selenium in rats. *J Nutr*, Bethesda, v.104, p.444-451, 1974.
16. COSTA, C.T.A. *Efeito modulador dos componentes do veneno de abelha sobre os danos citogenéticos induzidos pela radiação gama em ratos wistar*. Ribeirão Preto, 1995. 70p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.
17. DRAKE, D.B. et al. Wound Healing Consideration in Chemotherapy and Radiation Therapy. *Clin Plast Surg*, Philadelphia, v.22, n.1, p.31-37, 1995.
18. ELLENHORN, M.J., BARCELOUX, D.G. *Medical toxicology*: diagnosis and treatment of human poisoning. New York: Elsevier, 1988.
19. EMPERY, L.R. et al. Mucosal protective effects of vitamin E and misoprostol during acute radiation – induced enteritis in rats. *Dig Dis Sci*, New York, v.37, p.205-214, 1992.
20. EWAN, R.C. et al. Elimination of fixed selenium by the rat. *J Nutr*, Bethesda, v.91, p.547-554, 1967.
21. FELIX, V.N. et al. O organismo, a ferida e o processo de cicatrização. *Rev Bras Med*, São Paulo, v.47, n.8, p.355-362, 1990.
22. FLOHE, L. et al. Glutathione peroxidase: a selenoenzyme. *FEBS Lett*, Amsterdam, v.32, n.1, p.132-134, 1973.
23. GRILLO, H.C. et al. Retardation of contraction by local x-irradiation and observations relating to the origin of fibroblasts. *Ann Surg*, Philadelphia

- observations relating to the origin of fibroblasts. *Ann Surg*, Philadelphia, v.154, n.5, p.740-750, 1961.
24. HAFEMAN, D.G. et al. Effect of dietary selenium on erythrocyte and liver glutathione peroxidase in the rat. *J Nutr*, Bethesda, v.104, p.580-587, 1974.
25. HALL, E.J. *Radiobiology for the radiologist*. 4.ed. Philadelphia: J.B. Lippincott, 1994. 478p.*passim*.
26. HAMILTON, J.W. et al. Lipid antioxidant activity in tissues and proteins of selenium-fed animals. *J Nutr*, Bethesda, v.79, p.493-502, 1963.
27. HANSSON, E. et al. Uptake of selenomethionine in the tissue of the mouse studied by whole-body autoradiography. *Biochim Biophys Acta*, Amsterdam, v.115, p.285-293, 1966.
28. HAYES, A.W. *Principles and methods of toxicology*. 3.ed. New York: Raven Press, 1994.
29. HOLLÓ, Z.M. et al. The prevention of x-ray death by selenium salts given after irradiation. *Naturwissenschaften*, Berlin, v.47, p.328, 1960.
30. HOPKINS, L.L. et al. Distribution of microgram quantities of selenium in the tissues of the rat and effects of previous selenium intake. *J Nutr*, Bethesda, v.88, p.61-65, 1966.
31. HURT, H.D. et al. Effect of dietary selenium on the survival of rats exposed to chronic whole body irradiation. *J Nutr*, Bethesda, v.101, p.363-366, 1971.
32. KNUUTILA, S. et al. High dietary selenium increase radiation - induce micronucleus formation in mouse bone marrow. *Hereditas*, Lund, v.102,

p.237-239, 1985.

33. KUMAR, K.S. et al. Radioprotection by antioxidant enzymes and enzyme mimetics. *Pharmacol Ther*, Oxford, v.39, p.301-309, 1988.
34. LAWRENCE, R.A. et al. Glutathione peroxidase activity in selenium-deficient rat liver. *Biochem Biophys Res Commun*, Orlando, v.71, n.4, p.952-958, 1976.
35. LECCIA, M.T. et al. Protective effect of selenium and zinc on uv-a damage in human skin fibroblasts. *Photochem Photobiol*, Oxford, v.58, n.4, p.548-553, 1993.
36. LISON, L. *Histochimie et citochimie animales: principes et méthodes*. Paris: Gauthier-Villais, 1960. v.1, p.280.
37. LO, L. M. et al. The mutagenicity and citotoxicity of selenite, "activated" selenite and selenate for normal and dna repair-deficient human fibroblasts. *Mutat Res*, Amsterdam, v.49, p.305-312, 1978.
38. LOURENÇO, R.L. *Efeito de baixas doses de radiação X em feridas suturadas*. Piracicaba, 1998. Tese (Mestrado) - Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas.
39. MCKEEHAN, W.L., HAMILTON, W.G., HAM, R.G. Selenium in an essential trace nutrient for growth of WI-38 diploid human fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci USA*, Washington, v.73, n.6, p.2023-2027, 1976.
40. MONTEIRO, S.A.C. *Efeito da irradiação por elétrons em feridas e em tecidos de granulação*. Piracicaba, 1999. Tese (Doutorado) - Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas.

41. PATTERSON, B.H. et al. Human selenite metabolism: a kinetic model. **Am J Physiol**, Bethesda, v.257, p.R556-R567, 1989.
42. POWERS, W.E. et al. *Apud* WANG, Q. et al. Radiation therapy and wound healing delay. **Radiology**, Easton, v.89, p.112-115, 1967.
43. RAFFERTY, T.S. et al. Differential expression of selenoproteins by human skin cells and protection by selenium from UVB-radiation-induced cell death. **Biochem J**, London, v.332, p.231-236, 1998.
44. ROTRUCK, J.T. et al. Prevention of oxidative damage to rat erythrocytes by dietary selenium. **J Nutr**, Bethesda, v.102, p.689-696, 1972.
45. ROTRUCK, J.T. et al. Selenium: biochemical role as a component of glutathione peroxidase. **Science**, Washington, v.179, p.558-590, 1973.
46. SANDSTEAD, H.H. et al. Current concepts on trace mineral. **Med Clin North Am**, Philadelphia, v.54, n.6, p.1509-1524, 1970.
47. SANDSTRÖM, B.E., et al. Selenite-Induce variation in glutathione peroxidase activity of three mammalian cell lines: no effect on radiation-induced cell killing or dna strand breakage. **Radiat Res**, Charlottesville, v.117, p.318-325, 1989.
48. SANDSTRÖM, B.E., et al. Selenite-induced increase in glutathione peroxidase activity protects human cells from hydrogen peroxide-induced DNA damage, but not from damage inflicted by ionizing radiation. **Int J Radiat Biol**, London, v.56, n.5, p.837-841, 1989.
49. SCOTT, D.L. et al. The influence of dietary selenium and vitamin E on Glutathione Peroxidase and Glutathione in rat. **Biochim Biophys Acta**, Amsterdam, v.497, p.218-224, 1977.

50. SEGRETO, R.A. ***Efeito radioprotetor WR-2721 sobre as células da medula óssea de camundongos irradiados. Avaliação histométrica, ultra-estrutural e da matriz lipídica.*** São Paulo, 1997. 120p. Tese (Livre Docência) - Universidade Federal de São Paulo - Escola Paulista de Medicina.
51. SHIMAZU, F. et al. Selenoamino acids: decrease of radiation damage to amino acids and proteins. *Science*, Washington, v.143, p.369-371, 1964.
52. SILVADO, R.A.B. ***Aspectos morfológicos e morfométricos da ação dos raios beta em feridas provocadas na pele de ratos.*** São Paulo, 1992. 72p. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de São Paulo - Escola Paulista de Medicina.
53. SWANSON, C.A. et al. Human [74Se] selenomethionine metabolism: a kinetic model. *Am J Clin Nutr*, Bethesda, v.54, p.917-926, 1991.
54. TAPPEL, A.L. Free-radical lipid peroxidation damage and its inhibition by vitamin E and selenium. *Fed Proc*, Bethesda, v.24, p.73-78, 1965.
55. TAVARES, D.C. ***Efeito do aminoácido glutamina sobre a frequência de aberrações cromossômicas induzidas pelas radiações gama em células de mamíferos in vivo e in vitro.*** Ribeirão Preto, 1995. 100p. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.
56. THOMSON, C.D., STEWART, R.D.H. Metabolic studies of [75Se] selenomethionine and [75Se] selenite in the rat. *Br J Nutr*, London, v.30, p.139-147, 1973.
57. THOMSON, C.D., STEWART, R.D.H. The metabolism of [75Se] selenite in young women. *Br J Nutr*, London, v.22, p.47-57, 1974.

young women. *Br J Nutr*, London, v.32, p.47-57, 1974.

58. VILLAR, R.C. *Análise morfológica, morfométrica, ultra-estrutural e bioquímica da medula óssea de camundongos irradiados na presença e na ausência do radioprotetor WR-2721*. São Paulo, 1997. 128p. Tese (Mestrado) - Universidade Federal de São Paulo - Escola Paulista de Medicina.
59. WANG, Q. et al. Electron irradiation slows down wound repair in rat skin: a morphological investigation. *Br J Dermatol*, Oxford, v.130, p.551-560, 1994.
60. WARD, J.F. et al. Radiation and hydrogen peroxide induce free radical damage to DNA. *Br J Cancer*, Basingstoke, v.55, p.105-109, 1987.
61. WATANABE, P.C.A. et al. Efeitos de baixas doses de radiação sobre a gênese e evolução do tecido de granulação. *Rev Odontol USP*, São Paulo, v.8, p.137-143, 1994.
62. WEISS, J. F., LANDAUER, M. R. Radioprotection by antioxidants. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, v.899, p.44-60, 2000.
63. WEISS, J.F. et al. Advanced in radioprotection through the use of combined agent regimens. *Int J Radiat Biol*, London, v.57, n.4, p.709-722, 1990.
64. WEISS, J.F. et al. Selenium pretreatment enhances the radioprotective effect and reduces the letal toxicity of wr-2721. *Free Radic Res Commun*, London, v.3, n.1-5, p.33-38, 1987.
65. ZALKIN, H. et al. Studies of mechanism of vitamin e action.v.selenite and tocopherol inhibition of lipid peroxidation in the chick. *Arch Biochem Biophys*, New York, v.91, p.117-122, 1960.

## 10. ANEXOS



INSTITUTO DE BIOLOGIA  
UNICAMP



CEEA-IB-UNICAMP

Comissão de Ética na Experimentação Animal  
Instituto de Biologia  
Universidade Estadual de Campinas  
CEEA-IB-UNICAMP

### CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 032-1, sobre "Estudo da ação radioprotetora do sódio selenito (selênio) "in vivo""

sob a responsabilidade de Solange Maria de Almeida

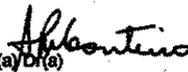
está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA)-IB-UNICAMP em reunião de 04/05/1999. Este certificado expira em 03/05/2000.

### CERTIFICATE

We certify that the protocol nº ....., about " ....."

....., agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA) and was approved by the Biological Institute/UNICAMP Ethical Committee for Animal Research (CEEA) in ...../...../.....

Expiration date ...../...../.....

  
Prof(a) Dr(a)  
Presidente - CEEA/IB/UNICAMP

Campinas, 04 de 05 de 1999

  
Prof(a) Dr(a)  
Secretário(a) - CEEA/IB/UNICAMP

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
INSTITUTO DE BIOLOGIA  
CIDADE UNIVERSITÁRIA, ZEPEDÃO VAZ  
CEP-13.081-970 - CAMPINAS - SP - BRAZIL

TELEPHONE (019) 788.7116  
FAX (019) 289.3124