

MARILIANI CHICARELLI

**REPARAÇÃO TECIDUAL EM RATOS DIABÉTICOS
SUBMETIDOS A BAIXAS DOSES DE RADIAÇÃO DE
ELÉTRONS EM CORPO TODO**

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

**PIRACICABA
2000**



UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE



MARILIANI CHICARELLI

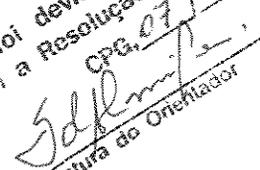
REPARAÇÃO TECIDUAL EM RATOS DIABÉTICOS SUBMETIDOS A BAIXAS DOSES DE RADIAÇÃO DE ELÉTRONS EM CORPO TODO

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

Orientadora: Profa. Dra. Solange Maria de Almeida.
Co-orientador: Prof. Dr. Mário Roberto Vizioli.

Banca Examinadora: Prof. Dr. Claudio de Freitas
Prof. Dr. Francisco Haiter Neto
Profa. Dra. Solange Maria de Almeida

200411125

Este exemplar foi devidamente corrigido,
de acordo com a Resolução CCPG-038/83
CPE. 07/02/2001

Assinatura do Orientador

PIRACICABA
2000

iii



N.º CHAMADA:	
TUNICAMP	
C432r	
V.	Ex.
TOMBO BC/	44740
PROC.	16-392101
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	20/06/01
N.º CPD	

CM00156320-1

Ficha Catalográfica

C432r Chicarelli, Mariliani.
 Reparação tecidual em ratos diabéticos submetidos a baixas doses de radiação de elétrons em corpo todo. / Mariliani Chicarelli. – Piracicaba, SP : [s.n.], 2000.
 xx, 111p. : il.

Orientadores : Profª Drª Solange Maria de Almeida,
 Prof. Dr. Mário Roberto Vizioli.
 Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Diabetes. 2. Cicatrização de feridas. 3. Radiação ionizante. I. Almeida, Solange Maria de. II. Vizioli, Mário Roberto. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. IV. 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

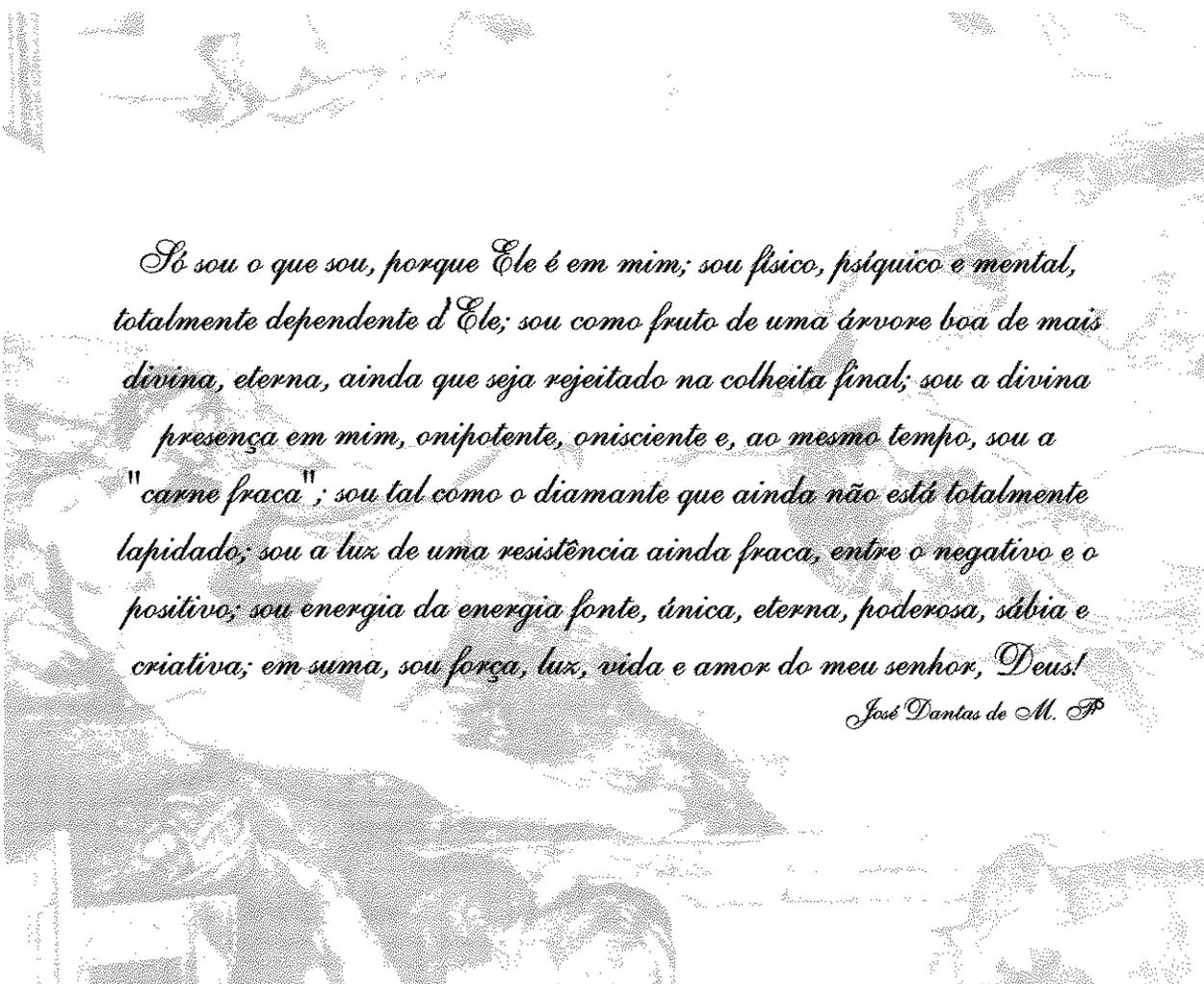


A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Tese de MESTRADO, em sessão pública realizada em 11 de Dezembro de 2000, considerou a candidata MARILIANI CHICARELLI aprovada.

1. Profa. Dra. SOLANGE MARIA DE ALMEIDA

2. Prof. Dr. CLAUDIO DE FREITAS

3. Prof. Dr. FRANCISCO HAITER NETO



Eu sou o que sou, porque Ele é em mim; sou físico, psíquico e mental, totalmente dependente d'Ele; sou como fruto de uma árvore boa de mais divina, eterna, ainda que seja rejeitado na colheita final; sou a divina presença em mim, onipotente, onisciente e, ao mesmo tempo, sou a "carne fraca"; sou tal como o diamante que ainda não está totalmente lapidado; sou a luz de uma resistência ainda fraca, entre o negativo e o positivo; sou energia da energia fonte, única, eterna, poderosa, sábia e criativa; em suma, sou força, luz, vida e amor do meu senhor, Deus!

José Dantas de M. F.

Dedico este trabalho...

À minha família .

*Aos meus pais **Vanilde Chicarelli e Maria Botti Chicarelli**, meus primeiros mestres, a quem tudo devo, sendo os maiores responsáveis pela chegada deste momento, pelos seus sacrifícios, amor e dedicação, bem como presença constante os quais sempre me ajudaram a vencer os desafios da vida.*

*A meu querido irmão **Alessandro Chicarelli**, pela amizade, apoio e incentivo em todos os momentos.*

*Ao **Rosilei Antonio da Silva**, pelo amor, estímulo, compreensão e apoio constante, que foram sem dúvida as armas dessa vitória.*

Minha eterna gratidão.

Agradecimentos Especiais

*A minha orientadora Profa Dra. **Solange Maria de Almeida**, por quem sinto profunda admiração, respeito e gratidão, pela indispensável contribuição no meu processo de aprendizado e crescimento profissional, agradeço ainda pela participação direta e segura na orientação deste trabalho, mostrando seriedade, dedicação e competência, dando apoio e incentivo em todos os momentos.*

*Ao meu co-orientador Prof. Dr. **Mário Roberto Vizioli**, pela valiosa transmissão de conhecimentos, constante atenção, bondade e inestimável apoio em todos os momentos, a minha admiração, o meu respeito e meu eterno agradecimento.*

Meu profundo agradecimento, respeito e admiração.

Agradecimento aos professores

*"Ser mestre não é apenas ensinar.
Ensinar não é apenas transmitir a matéria.
Ser mestre é ser instrutor e amigo, guia e companheiro.
Ser mestre é ser exemplo.
Exemplo de dedicação, de doação, de dignidade pessoal e,
Sobretudo, de amor."*

Ao Prof Dr. Frab Norberto Bóscolo, Prof. Dr. Francisco Haiter Neto, Profa. Dra. Solange Maria de Almeida, Prof. Dr Mário Roberto Vizioli pelas mais diversas contribuições, carinho, atenção e pelos conhecimentos transmitidos durante todo o curso.

Meu profundo agradecimento

Agradecimentos

À grande amiga **Luciane Faria de Araújo**, pela presença constante, por compartilhar todos os momentos alegres e de dificuldades do dia-a-dia, estando sempre pronta a ajudar inclusive nas pequenas coisas, e sobretudo pela sincera amizade, jamais a esquecerei;

Aos amigos **Melissa Damian, Anna Silvia Ganzerli, Elcio Carneiro Jr., Ricardo Matheus**, pelo convívio saudável, pela força e amizade em todos os momentos;

À amiga **Mitsue Fujimaki, Silvana Pasetto e Addah Regina Freire** pelo companheirismo e sincera amizade;

Ao **Flávio Ricardo Manzi** pela valiosa cooperação na realização dessa tese, bem como pela alegria contagiante;

Aos meus amigos de Pós-Graduação: **Ana Emília, Cláudia Haiter, Fabrício Tuji, Marcelo Gonçalves, Márcia Brunelli, José Osmar Vasconcelos, Solange Monteiro, Tasso Shusterschitz**, que tornaram a vida em Piracicaba mais alegre e pela agradável convivência;

Aos funcionários da Radiologia, **Raquel, Gislaine, Giselda**, pela cooperação;

Ao **Waldeck Ribeiro**, pelo carinho e ensinamentos transmitidos;

Ao Físico **José Renato de Oliveira Rocha**, do Centro de Engenharia Biomédica, pela imensurável ajuda quando da irradiação dos animais;

Ao **Wanderlei Francisco Vieira** pela inestimável atenção para com o experimento;

As técnicas **Maria Aparecida Santiago Varella, Ivani Odas Demetrio, Eliene Aparecida Orcini Narvaes Romani** pela amizade e ajuda na confecção das lâminas microscópicas;

Ao Departamento de Bioquímica da FOP-UNICAMP, em especial a **Mariza de Jesus Carlos Soares**, pela atenção e auxílio;

Aos **Funcionários da Biblioteca** da FOP-UNICAMP, pela orientação e cooperação;

Às Disciplinas de **Farmacologia, Histologia, Patologia e Bioquímica da FOP-UNICAMP**, por gentilmente cederem seus laboratórios para a realização da parte prática e análises microscópicas;

À Faculdade de Odontologia de Piracicaba - UNICAMP, nas pessoas do Diretor, Prof. Dr. **Antonio Wilson Sallum**, e Diretor Associado, Prof. Dr. **Frab Norberto Bóscolo** por ter me recebido e dado oportunidade de conviver e aprender com tão experientes profissionais;

À minha instituição de origem, Universidade Estadual de Maringá-UEM, na pessoal da Reitora **Neuza Altoé**, pela concessão do meu afastamento;

À **CAPES** na concessão da Bolsa de Mestrado.

Impossível é deixar de agradecer a todos os que, de maneira direta ou indireta foram de igual modo importantes, contribuindo com um sorriso, um olhar amigo, uma palavra de estímulo mas que, indubitavelmente, propiciaram-me condições de prosseguir e concluir este trabalho.

À Deus, sempre presente.

Meus sinceros agradecimentos.

SUMÁRIO

Lista de Ilustrações.....	1
Lista de Abreviaturas.....	5
Resumo.....	7
Abstract.....	9
I - Introdução.....	11
II - Revista da Literatura.....	15
III - Proposição.....	47
IV - Metodologia.....	49
V - Resultados.....	59
VI - Pranchas.....	69
VII - Discussão.....	87
VIII - Conclusão.....	103
Referências Bibliográficas.....	105

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Prancha 1: Figuras das feridas aos 4 e 7 dias (página 63).
- Prancha 2: Figuras das feridas aos 13 e 21 dias (página 64).
- Prancha 3: Figuras das lâminas na coloração por hematoxilina-eosina pertencentes aos 4 grupos no 4º dia de reparação tecidual. Aumento original 2.5 x1.25 x 10 (página 65).
- Prancha 4: Figuras das lâminas na coloração por hematoxilina-eosina pertencentes aos 4 grupos no 4º dia de reparação tecidual. Aumento original 6.3 x1.25 x 10 (página 66).

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Prancha 5: Figuras das lâminas na coloração por hematoxilina eosina pertencentes aos 4 grupos no 7º dia de reparação tecidual. Aumento original 2.5 x1.25 x 10 (página 67).
- Prancha 6: Figuras das lâminas na coloração por hematoxilina-eosina pertencentes aos 4 grupos no 7º dia de reparação tecidual. Aumento original 6.3 x1.25 x 10 (página 68).
- Prancha 7: Figuras das lâminas na coloração por hematoxilina-eosina pertencentes aos 4 grupos no 13º dia de reparação tecidual. Aumento original 2.5 x1.25 x 10 (página 69).
- Prancha 8: Figuras das lâminas na coloração por hematoxilina-eosina pertencentes aos 4 grupos no 13º dia de reparação tecidual. Aumento original 6.3 x1.25 x 10 (página 70).
- Prancha 9: Figuras das lâminas na coloração por hematoxilina-eosina pertencentes aos 4 grupos no 21º dia de reparação tecidual. Aumento original 2.5 x1.25 x 10 (página 71).
- Prancha 10: Figuras das lâminas na coloração por hematoxilina-eosina pertencentes aos 4 grupos no 21º dia de reparação tecidual. Aumento original 6.3 x1.25 x 10 (página 72).
- Prancha 11: Figuras das lâminas no exame da birrefringência pela técnica do picrosirius, pertencentes aos 4 grupos no 4º dia de reparação tecidual. Aumento original 6.3 x 1.25 x 10 (página 73).

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Prancha 12: Figuras das lâminas no exame da birrefringência pela técnica do picosirius, pertencentes aos 4 grupos no 7º dia de reparação tecidual. Aumento original 6.3 x 1.25 x 10 (página 74).
- Prancha 13: Figuras das lâminas no exame da birrefringência pela técnica do picosirius, pertencentes aos 4 grupos no 13º dia de reparação tecidual. Aumento original 6.3 x 1.25 x 10 (página 75).
- Prancha 14: Figuras das lâminas no exame da birrefringência pela técnica do picosirius, pertencentes aos 4 grupos no 21º dia de reparação tecidual. Aumento original 6.3 x 1.25 x 10 (página 76).
- Prancha 15: Figuras das lâminas no exame do dicroísmo linear pela técnica do Azul de toluidina, pertencentes aos 4 grupos no 4º dia de reparação tecidual. Aumento original 6.3 x 1.25 x 10 (página 77).
- Prancha 16: Figuras das lâminas no exame do dicroísmo linear pela técnica do Azul de toluidina, pertencentes aos 4 grupos no 7º dia de reparação tecidual. Aumento original 6.3 x 1.25 x 10 (página 78).
- Prancha 17: Figuras das lâminas no exame do dicroísmo linear pela técnica do Azul de toluidina, pertencentes aos 4 grupos no 13º dia de reparação tecidual. Aumento original 6.3 x 1.25 x 10 (página 79).
- Prancha 18: Figuras das lâminas no exame do dicroísmo linear pela técnica do Azul de toluidina, pertencentes aos 4 grupos no 21º dia de reparação tecidual. Aumento original 6.3 x 1.25 x 10 (página 80).

LISTA DE ABREVIATURA

LISTA DE ABREVIATURAS

cGy - centéssimo de Gy

GAGs - glicosaminoglicanas

GC - grupo controle

GD - grupo diabético

GDI - grupo diabético irradiado

GI - grupo irradiado

Gy - Gray

HE - hematoxilina-eosina

IDDM - Diabetes mellitus insulino-dependente

NIDDM - Diabetes mellitus não insulino-dependente

kVp - Kilovoltagem pico

MeV - milhão de elétrons volts

Mol - Molaridade

R - Roentgen

rad - radiation absorbed dose

RESUMO

RESUMO

O presente trabalho propôs-se a avaliar o processo de reparação tecidual de feridas, em ratos diabéticos, após exposição à radiação ionizante. Os animais foram divididos em quatro grupos: grupo controle, grupo diabético, grupo irradiado e grupo diabético irradiado. Todos os animais foram submetidos a um processo cirúrgico, no qual foi realizada a produção de uma ferida na região dorsal dos mesmos. Três dias após a cirurgia, os grupos irradiado e diabético irradiado foram submetidos a exposição de 1 Gy de radiação de elétrons, em dose única e corpo todo. Após 4, 7, 13 e 21 dias da produção da ferida, todos os animais foram sacrificados e o tecido correspondente à ferida ou cicatriz, submetidos à análise histológica para avaliação morfológica e ultra-estrutural. Os resultados mostraram que 1 Gy de radiação de elétrons com um feixe de 6 MeV, causou retardo no processo de reparação tecidual, mas não impediu a evolução do processo e quando comparados os dois grupos irradiados,

Reparação tecidual em ratos diabéticos submetidos a baixas doses de radiação de elétrons em corpo todo

RESUMO

o efeito da radiação de elétrons foi mais intenso no processo de reparação dos animais diabéticos.

ABSTRACT

ABSTRACT

The present research proposes to evaluate the repairing process of wound tissue, in diabetic rat, after exposition at ionization radiation. The animals were divided in four groups: control group, diabetic group, irradiated group and diabetic irradiated group. All the animals were submitted to a surgical process, in which was realized the production of a wound in the back region of the animals. Three days after the surgery, the irradiated group and diabetic irradiated group were submitted to the exposition of 1 Gy of electrons radiation, in only dose and all body. After 4, 7, 13 and 21 days of the wound produced, all the animals were sacrificed and the correspondent tissue of the wound or scar, submitted to the histological analysis for morphological and ultra-estrutural evaluation. The results showed that 1 Gy of electrons radiation with one bundle of 6 MeV caused delay in the repairing process of tissue but, didn't impeded the evolution of the repairing process of wound, and when compared the two

Reparação tecidual em ratos diabéticos submetidos a baixas doses de radiação de elétrons em corpo todo

ABSTRACT

irradiated groups, the effect of the electrons radiation was more accentuated in the repairing process of diabetic animals.

INTRODUÇÃO

INTRODUÇÃO

 ação da radiação ionizante sobre as células vem sendo vastamente estudada, principalmente através dos conhecimentos relativos à sua interação com a matéria, onde esta provoca a ionização molecular, acarretando profundas mudanças intracelulares físicas e/ou químicas com a formação de diversos efeitos biológicos, desencadeando alterações celulares morfológicas e funcionais, podendo ser agravados por fatores como dose, tempo de exposição, idade e suscetibilidade dos tecidos expostos, o que torna a Radiobiologia de suma importância.

O processo de reparação tecidual tem sido amplamente estudado ao longo dos tempos, de maneira a tentar desvendar este mecanismo extremamente complexo, comum e fundamental para a restituição da integridade tecidual.

Este processo pode ser dividido em três fases fundamentais: inflamatória, proliferativa e de maturação¹³, cujos processos biológicos mais

INTRODUÇÃO

intensos são o metabolismo do colágeno, a contração da ferida, a epitelialização e a inflamação³.

Entretanto, sabe-se que o processo de reparação tecidual pode ser alterado tanto por fatores externos, por exemplo a radiação ionizante, quanto por algumas condições sistêmicas, como o diabetes mellitus.

Uma vez que a radiação ionizante interfere no processo de reparação tecidual, o efeito desse tipo de radiação na cura de feridas é um problema de grande interesse tanto para o cirurgião quanto para o radiologista. Entretanto, a literatura contém evidências escusas e conflitantes a respeito da ação da radiação sobre a cura de feridas cirúrgicas, principalmente quanto ao uso de baixas doses.

Como citado, outro fator que pode interferir no processo de reparação tecidual é o diabetes mellitus. Este consiste de uma desordem metabólica complexa cujos componentes causam vários efeitos diretos e indiretos na cura de feridas³⁶. O seu aparecimento deve-se à deficiência de insulina atribuída à alteração pancreática, em que há uma menor secreção de insulina ou menor ação hormonal a nível periférico. Esta doença, no homem, é freqüentemente uma das patologias de maior incidência espontânea, mas pode ser experimentalmente induzida por pancreatectomia parcial ou pelo uso de drogas diabetogênicas como Aloxano, Estreptozotocina, Ditzona, entre outras^{11, 24}. As manifestações agudas no diabetes, tais como hipoglicemia, cetoacidose e coma hiperosmolar não cetótico, levam ao comprometimento da fase inflamatória da cicatrização, além de haver uma maior susceptibilidade à infecções graves e comprometimento da força

INTRODUÇÃO

tênsil da cicatriz. De acordo com KAMAL *et al.*²⁹ (1996), a doença é universal, sendo que ela atinge cerca de 6% da população em geral e é a oitava causa de morte nos Estados Unidos da América. FELIX *et al.*¹³ (1990) fizeram uma colocação importante em seu artigo, onde afirmaram que o diabético possui 50% de chance de ser operado ao menos uma vez em sua vida, sendo deste modo, de especial importância o estudo das implicações dessa patologia na cicatrização dos indivíduos acometidos.

Embora existam na literatura estudos relativos as conseqüências das radiações ionizantes e do diabetes mellitus no processo de reparação tecidual, o efeito da radiação de elétrons é pouco conhecido, havendo certa escassez de trabalhos publicados a respeito da utilização de baixas doses e suas implicações em relação a reparação tecidual, e mais ainda, sobre os efeitos combinados da deficiência insulínica e baixas doses de radiação de elétrons.

Assim sendo, é de grande importância pesquisar o efeito de baixas doses de radiação de elétrons associadas ao diabetes, sobre o processo de reparação tecidual, uma vez que todos os indivíduos acometidos por essa, estão sujeitos à exposição à radiação, seja com finalidade de diagnóstico ou terapêutica.

REVISTA DA LITERATURA



revisão da literatura foi subdividida em alguns itens:

- 1- Reparação tecidual;
- 2- Reparação tecidual e radiação ionizante;
- 3- Diabetes;
- 4- Diabetes e reparação tecidual;
- 5- Diabetes e radiação ionizante.

Esta revisão não tem por finalidade esgotar o assunto em todos os itens, mas sim, introduzir o leitor nos seus aspectos mais relevantes.

1 - REPARAÇÃO TECIDUAL

Independente da causa que provocou dano a um tecido, o organismo vivo o restaura por meio de inúmeros processos que tem como objetivo final a reparação tecidual. As tentativas do corpo de restaurar a lesão induzida por uma agressão local, inicia-se muito cedo com o processo de inflamação, resultando finalmente em reparo e substituição de células mortas ou danificadas, por células saudáveis. O novo tecido formado, não necessariamente, terá as mesmas características do tecido substituído, onde em geral, o reparo, segundo ROBBINS *et al.*³⁹ (1986), envolve dois processos distintos:

- 1) REGENERAÇÃO, em que há a substituição do tecido lesado por células parenquimatosas do mesmo tipo, algumas vezes sem deixar traço residual da lesão anterior;
- 2) CICATRIZAÇÃO, onde o tecido lesado é substituído por tecido conjuntivo, que em seu estado permanente constitui uma cicatriz.

A reparação de uma ferida é um fenômeno extremamente complexo que envolve vários processos bem sincronizados, onde estas fases ocorrem de tal forma que uma se sobrepõe ao início da outra.

A resposta inflamatória é uma parte vital no processo de reparação, onde imediatamente após um ferimento ocorre a coagulação ou hemostase, caracterizada pela presença de plaquetas e formação de fibrina, culminando com a maturação dos componentes.

De maneira didática, segundo FELIX *et al.*¹³ (1990), a cicatrização pode ser dividida em três fases fundamentais:

- 1) FASE INFLAMATÓRIA: Acontece durante 3 a 4 dias, em que há fenômenos vasculares, sobressaindo o aumento de permeabilidade vascular provocada pela liberação local de histamina e serotonina, com cerca de 30 minutos de atuação em vênulas, seguido de formação de bradicinina e prostaglandinas, a partir de globulinas plasmáticas, o que permite a chegada de granulócitos e monócitos. Sendo os granulócitos os responsáveis pela retirada do material necrótico, aumentando seu número progressivamente com o tempo.
- 2) FASE PROLIFERATIVA: Sua duração é de 3 a 4 semanas, sendo que nesta fase a lesão é recoberta por tecido epitelial. Por volta do terceiro dia aparecem os fibroblastos, provavelmente originados de células mesenquimais da adventícia e do interstício. Nesta fase os fibroblastos têm participação muito importante, pois apresentam intensa capacidade de síntese protéica e multiplicação celular, produzindo substância fundamental (glicosaminoglicanas, glicoproteínas e mucoproteínas) e colágeno. Ainda neste período ocorre proliferação de capilares à partir de resíduos venulares e à medida que as células endoteliais se multiplicam, atraem-se visando a formação de vasos. Durante toda esta fase ocorre a liberação de mediadores químicos que controlam todo o processo.

3) FASE DE MATURAÇÃO: Continua-se à partir da 4ª semana, havendo um aumento progressivo do colágeno, onde a medida que este é produzido ocorre oclusão da ferida. Os capilares se organizam, os fibroblastos diminuem em número, sendo substituídos por fibrócitos e observa-se ainda queda da produção de substância fundamental. Lentamente, ao longo de um ano, a força de rotura vai aumentando, havendo a organização arquitetural do colágeno.

Apesar da reparação tecidual ser um processo fisiológico habitual e fundamental, ela é extremamente complicada, e desde muito tempo motivou inúmeros pesquisadores a tentarem desvendar todo o seu mecanismo.

Inicialmente os estudos foram realizados em animais de laboratório, onde com o tempo, o significado clínico dos experimentos realizados, passaram a ser questionados por alguns cientistas, sendo então o assunto estudado e defendido por HOLES & HARVEY²⁵ (1935), que continuaram realizando experimentos com finalidade de medirem a força de tensão em reparações de feridas, levando em consideração o tempo de reparação, para observar com exatidão as diferentes fases de cura, e introduziram variáveis controláveis para determinar seu efeito. Através desse experimento puderam concluir que a reparação da ferida ocorre em duas fases, a primeira é a fibroplasia, originária em/e de restos de células indiferenciadas ligadas intimamente ao mesoblasto. A segunda fase, é a de diferenciação, que ocorre como resultado da mesma forma e maneira que a diferenciação original destas estruturas ou seja, do mesoblasto. Puderam concluir

ainda que alterações locais não inibem o crescimento de fibroblastos, mas podem causar retardo no surgimento da fase de fibroplasia, devido a uma reação exsudativa. Os distúrbios na reparação podem ser devidos a alterações sistêmicas profundas, e os fibroblastos originam-se de células surgidas no processo exsudativo inicial e não do tecido adjacente frouxo.

MACDONALD³³, em 1959, com o objetivo de descobrir a origem dos fibroblastos por meio de estudos autoradiográficos e histológicos, pela técnica de hematoxilina-eosina, utilizou-se de 20 ratos, que após a realização de feridas excisionais, estas foram suturadas com fio de seda, e a seguir usado timidina trítida para detectar a formação de novas células. O material foi coletado em tempos variados, entre 2 horas e 14 dias após a cirurgia e a injeção da substância radioativa. Com isso o autor observou que os fibroblastos surgem de células do tecido conjuntivo fixo nas adjacências da adventícia das artérias e veias, em torno dos folículos pilosos e das fibras musculares ou no tecido conjuntivo abaixo da derme adjacente e abaixo das feridas. Não observou fibroblastos oriundos de linfócitos, macrófagos, histiócitos, leucócitos, células endoteliais ou células fixas da porção colagenosa da derme. Portanto, pode concluir que, em pele de ratos os fibroblastos surgem somente de células do tecido conjuntivo fixo e subsequentemente sofreram divisão para formar novos fibroblastos.

Observação na população celular e a formação de fibrilas no tecido conjuntivo por meio da microscopia óptica comum e eletrônica foram realizadas por ROSS & BENDITT⁴⁰ (1961). Para tanto foram utilizados cobaias onde foram

realizadas feridas excisionais, examinadas em períodos compreendendo as 16 horas iniciais até 14 dias após o ferimento. O estudo mostrou que, nas primeiras 24 horas, houve um aumento rápido no número de elementos representativos da fase aguda, sendo que, após o terceiro dia, houve diminuição bastante rápida destes elementos. Por volta do sexto ou sétimo dia houve um grande aumento no número de fibroblastos, sendo a formação ativa do colágeno observada no quinto dia, pelo aparecimento de fibras argirófilas. A presença de fibroblastos foi observado nas primeiras 24 horas através da microscopia eletrônica, os quais apresentavam-se como células grandes, extensas e com retículos endoplasmáticos bem desenvolvidos, sugerindo síntese protéica, e no terceiro dia, a fibrina e muitos leucócitos estavam presentes, além de grande população de macrófagos e pequeno número de fibrilas colágenas extracelulares. Com o aumento da idade, os fibroblastos mantiveram sua morfologia e houve aumento da quantidade de fibras colágenas e diminuição do conteúdo celular.

Tendo em vista que o entendimento da bioquímica da fibrogênese em reparação de feridas havia aumentado, entretanto existindo ainda dúvidas quanto a compreensão do mecanismo de estimulação celular antes do início da fibrogênese e da regulação da proliferação e produção de células a partir deste período, GRILLO²² (1964) resumiu em seu artigo trabalhos anteriores sobre o local de origem dos fibroblastos, e relatou não ser possível estabelecer se são os fibroblastos diferenciados ou as células mesenquimais em repouso que modulam os fibroblastos em resposta às injúrias.

Até 1968 inúmeros estudos ultraestruturais de reparação de feridas haviam proporcionado informações úteis e interessantes quanto à resposta inflamatória e formação do tecido conjuntivo, entretanto, poucas informações estavam sendo avaliadas e obtidas em humanos, o que levou, ROSS & ODLAND⁴¹ (1968), a investigar os vários aspectos de reparação de ferida em humanos, e observar a relação entre células epiteliais e mesenquimais. Para isso examinaram o tecido conjuntivo em 3, 12 e 24 horas e em 2, 3, 5, 7, 14 e 21 dias após ter sido produzida uma ferida em pele de humanos. Os autores concluíram que os dois principais papéis funcionais dos leucócitos neutrofílicos em reparação de feridas são a lise de células e a fagocitose. Puderam concluir ainda, que os monócitos têm significativo papel na ingestão e digestão de proteínas extracelulares, fibroblastos de feridas são derivados de células do tecido conjuntivo perivascular, não estando claro a atividade colagenolítica, nem a relação de interação entre tecido conjuntivo e epidermal.

VIZIOLI⁴⁹, 1971, estudando o tecido de granulação induzido com esponja PVC implantadas subcutâneamente em ratos, onde estes foram sacrificados após 3, 5, 7, 10, 13, 16, 21 e 28 dias da implantação das esponjas, e empregando o dicróismo, pode concluir que o tecido de granulação tem dois aspectos morfológicos diferentes, capsula fibrosa e tecido de granulação interno à esponja, entretanto eles possuem o mesmo comportamento em relação a seu desenvolvimento e como revelado pelo dicróismo, a associação macromolecular

entre glicosaminoglicanas e colágeno, inicia-se no sétimo dia de desenvolvimento e o tecido de granulação alcança a organização final depois de duas semanas.

CATE & FREEMAN⁸, 1974, estudaram o remodelamento do tecido conjuntivo na periferia de feridas de pele em reparação por primeira e segunda intenção. Foram realizadas feridas incisionais e excisionais na pele de ratos adultos e biópsia 14 dias após. Os resultados mostraram que numerosos fibroblastos na zona juncional entre o tecido conjuntivo velho e novo exibiram colágeno intracelular dentro de vesículas, o que indicou que os fibroblastos são capazes de fagocitar e degradar colágeno e tem como papel funcional, provocar remodelamento de tecido conjuntivo.

Considerando a importância dos fibroblastos na síntese do colágeno UZUNIAN⁴⁶ (1979), com o objetivo de obter novas evidências para defender o fenômeno de fibroplasia, realizou feridas excisionais em pele de ratos albinos, realizando biópsias depois de um período de 7, 14 e 21 dias, para a análise microscópica do tecido. Os achados encontrados sugeriram ao autor, serem os fibroblastos responsáveis pela síntese e degradação do colágeno durante o remodelamento, sendo a ação de degradação mais intensa no sétimo dia, diminuindo gradualmente no período subsequente até a estabilização ser alcançada.

Já em 1984, quando praticamente todo o mecanismo de cicatrização já havia sido desvendado, CARRICO *et al.*³ publicaram um artigo, descrevendo processo biológico de reparação tecidual, os autores definiram os tipos de cura de

feridas, discutiram os fatores mais importantes que influenciam o processo, bem como os problemas específicos de reparação. Puderam concluir que, a reparação de feridas é um mecanismo de interação complexo, com vários eventos fisiológicos e bioquímicos. Terminaram afirmando que uma alteração em qualquer processo intrínseco inevitavelmente conduzirá a um processo prolongado de cura ou processo anormal, freqüentemente com efeitos devastadores.

2 - REPARAÇÃO TECIDUAL E RADIAÇÃO IONIZANTE

Após os raios X terem sido descobertos por Wilhelm Conrad Röntgen em 1895, estes passaram a ser amplamente utilizados para fins diagnóstico, terapêutico e pesquisa. Entretanto, após um período relativamente curto de experimentação, observou-se que esta radiação ionizante provocava inúmeros efeitos deletéricos sobre os tecidos, principalmente a alopecia, catarata, dermatite e inflamação do tecido conjuntivo³⁸.

Atualmente, sabe-se que inúmeros fatores prejudicam o processo de reparação tecidual. Dentre eles, a radiação ionizante, onde pesquisas decorrentes de experiências obtidas com animais de laboratório, com pacientes submetidos à radiação com finalidade terapêutica e ainda de indivíduos que sofreram exposições acidentais à radiação ionizante evidenciaram a ocorrência de inúmeras alterações.

Sendo assim, a questão do efeito da radiação X na reparação de feridas é um problema que desperta grande interesse tanto para o cirurgião quanto para o radiologista. Como na literatura existia e existem grandes variações de opiniões sobre o assunto, POHLE *et al.*³⁷, em 1949, estudaram o efeito de baixas doses de radiação X na reparação de feridas de pele de ratos, verificando se pequenas doses estimulavam ou retardavam a processo de reparação. Para o experimento foi realizada uma incisão de 4,0 cm no dorso dos animais que foram divididos em 3 grupos, tendo uma das metades da ferida protegida para servir como controle: o primeiro grupo continha 18 animais subdivididos em 3 grupos que receberam 150 R, 350 R e 700 R imediatamente após o ferimento, sendo verificado durante 14 dias se havia qualquer diferença macroscópica no tempo de reparação. O grupo 2, constituiu-se de 90 ratos também divididos em 3 subgrupos que receberam 150 R, 300 R e 700 R, sendo que metade dos animais de cada subgrupo foram irradiados imediatamente e a outra metade 24 horas após incisão, e sacrificados nos tempos de 3, 5 e 7 dias após a incisão. No 3º grupo, foram utilizados um total de 32 animais divididos em 2 subgrupos que receberam 25 R e 10 R também administrada imediatamente ou 24 horas após a incisão e sacrificados em 3 e 5 dias após o ferimento. Os autores puderam concluir que, embora todas as feridas fossem examinadas diariamente, nenhuma diferença macroscópica no tempo de reparação entre a porção irradiada e controle foi notada, histologicamente não se encontrou efeito de estimulação de reparação, mesmo para baixas doses e finalmente que, quando observou-se ligeira diferença

no processo de reparação à favor da porção irradiada, no caso de pequenas doses, isso provavelmente ocorreu devido a redução na quantidade de exsudato, que diminuiu a quantidade de fibrina para ser substituída pelo tecido cicatricial.

A regeneração de pequenos vasos sangüíneos é um aspecto fundamental de reparação em tecidos após uma injúria. O tecido de granulação, mais precisamente o blastema, é essencialmente uma formação complexa na regeneração capilar. A falta de restauração da continuidade em tecidos pode ser causada por agentes que interferem com a formação de brotos capilares. VAN DEN BRENK⁴⁷ (1959), estudou "in vivo" brotos capilares irradiados com raios X e γ , em doses únicas, que variaram de 200 R a 5000 R, administradas entre o sétimo e décimo dia após o aparecimento do blastema de reparação. O autor não observou alterações no crescimento dos brotos capilares com doses inferiores a 400 R. Com doses entre 400 e 2000 R foi observado considerável dano, particularmente na faixa de 1000 a 2000 R. Já com altas doses (4000 R), observou completa destruição e necrose na porção central do blastema de reparação. Segundo o autor, a exposição de vasos à radiação ionizante não é responsável pelo reparo inadequado subsequente à injúria, mas fatores indiretos, como alteração na forma do tecido, índice celular alterado, fibrinogênese, hialinização no estroma, comuns a todos os tecidos conjuntivos atróficos, podem ser os responsáveis pelas alterações.

Tendo em vista a grande controvérsia em relação à origem dos fibroblastos, quando da formação do tecido de granulação, GRILLO²¹ (1963)

realizou um estudo onde explorou esta questão. Em um grupo de cobaias foram realizadas exposição de 750 R de radiação X na região dorsal sendo que, em 1/3 dos animais, esta foi administrada 20 minutos antes da cirurgia, em outro 1/3, 20 minutos após e no último terço 28 horas após a cirurgia. Cinco dias depois do ferimento, cada animal recebeu intraperitonealmente, uma injeção de timidina tritiada e após 45 minutos os animais foram sacrificados. Por meio da Autorradiografia, não foi encontrada marcação nas paredes capilares do tecido conjuntivo preexistente longe do limite da ferida, nem no núcleo dos leucócitos, células mononucleares ou linfócitos. A timidina tritiada foi incorporada especificamente no ácido desoxirribonucleico, que é formado exatamente antes da divisão celular, havendo ainda grande apreensão de timidina tritiada pelos fibroblastos, no novo tecido de granulação, na área marginal e no leito aberto da ferida. Desta forma o autor pode concluir que os fibroblastos presentes na reparação tecidual, tiveram sua origem principalmente de células do tecido conjuntivo circundante à ferida.

ROSS *et al.*⁴² (1970), também com o objetivo de determinar a origem dos fibroblastos, estudaram a cura de feridas em uma série de ratos parabióticos. O fêmur de um parabionte de cada par de animais foi protegido e receberam 800 R de uma bomba cobalto 60. Três dias após irradiação foram feitas incisões lineares no dorso de cada animal sendo injetada a seguir timidina tritiada, enquanto nos outros animais foram injetadas timidina não marcada. Depois da timidina ter sido liberada do sangue, os animais foram sacrificados em 1, 2 e 6 dias após o

ferimento, sendo a ferida preparada para autoradiografia. Com isso os autores puderam concluir que há evidências de que fibroblastos de feridas não surgem de precursores hematogênicos e, portanto, devem surgir de células do tecido conjuntivo adjacente.

Como um conhecimento elementar da radiação e seus efeitos em tecidos normais são importantes para o entendimento das alterações de reparação que ocorrem em uma ferida irradiada, LUCE³², em 1984, discutiu em seu artigo estes conhecimentos disponíveis, bem como os conhecimentos da radiação no tecido normal. Segundo o autor, as alterações mais significativas nos tecidos irradiados são devidas à diminuição no suprimento sanguíneo pela obliteração dos vasos, sendo que este fator sobrepõe a outras adversidades como, a má nutrição e contaminação dos tecidos. Considerou ainda que as complicações provocadas pela radioterapia (ruptura da carótida nas irradiações de cabeça e pescoço) comprometem mais a sobrevivência de pacientes irradiados quando comparados aos que não receberam radiação. Por fim, sugeriu conduta terapêutica para as úlceras provocadas pela radiação, tais como correções de deficiências sistêmicas, adequada excisão da ferida radionecrótica, e fornecimento permanente de cobertura celular vascularizada.

GUIDUGLI NETO²³ (1987), com o objetivo de observar o efeito de altas doses de radiação no tecido de granulação e avaliar a habilidade de produção de novos capilares pelo endotélio irradiado em ratos, utilizou 40 animais, onde foi realizado uma lesão circular de 1,0 cm de diâmetro, no dorso do animal, sendo

estes submetidos a dose única que totalizou 2000 rads de radiação X. Seis dias após a lesão ter sido realizada, para a proteção do corpo dos animais utilizou proteção de chumbo que tinha uma abertura de 2 cm de diâmetro, permitindo, desta forma, que uma área de tamanho superior a ferida fosse irradiada. Em tempos que variaram de meia hora a 720 horas (30 dias), com o apoio de técnicas morfométricas, foi estudado o volume vascular relativo. Com isso os dados obtidos permitiram admitir que o fenômeno de hipervascularização, se existir, não é originado nos brotos vasculares e alças superficiais do tecido de granulação, no qual na análise dos dados estes mostraram uma diminuição da quantidade de vasos em todos os tempos estudados.

RUDOLPH *et al.*⁴³ (1988), para estudar o efeito da radiação na proliferação de fibroblastos, verificando o porque dos danos causados pela radioterapia, no qual tal ocorrência era atribuída à suspensão das unidades proliferativas epidermais e diminuição na vascularização, devido a oclusão de pequenos vasos, realizaram culturas celulares com amostras obtidas da pele de 4 pacientes que sofreram tratamento radioterápico. Os tecidos foram obtidos de três áreas distintas: úlcera, tecido irradiado sem úlcera e área não irradiada, de outra região do corpo, para servir como controle. Os dados obtidos pelos autores sugeriram que um permanente efeito intrínseco da irradiação em fibroblastos, ou uma amputação seletiva do crescimento de subpopulação de fibroblastos, não é dependente do diminuído abastecimento de sangue, mostrando ainda que,

fibroblastos provenientes de pele irradiada, mas não ulcerada, apresentaram um crescimento significativamente lento em relação ao grupo controle.

Para determinar se a radiação de elétrons afeta diretamente o metabolismo de cartilagens, HUGENBERG *et al.*²⁶, 1989, estudaram a taxa de síntese de glicosaminoglicanas (GAGs) e a degradação em cartilagem articular canina normal. Para tanto "fatias" da cartilagem articular do joelho de cães (synovium) cultivadas foram tratadas similarmente, para determinar o efeito da irradiação na síntese de ácido hialurônico. 24 horas após a exposição de 1.000 rads, 10.000 rads e 50.000 rads, a síntese de 5-GAGs [GAGs marcadas com Na₂³⁵SO₄ - 20μ(i/ml)] pela cartilagem foi 93%, 69% e 37% respectivamente, em comparação aquelas do grupo controle, ou seja cartilagens não irradiadas. O efeito não foi revertido rapidamente, onde 120 horas após exposição a 50.000 rads, a síntese de GAGs permaneceu baixa (28%). Ainda puderam concluir que, em contraposição aos efeitos do metabolismo de GAGs da cartilagem, a radiação nestes níveis, não tem efeito na síntese de ácido hialurônico sinovial.

Como durante a fase inicial de radioterapia podem ocorrer reações inflamatórias agudas, onde a pele geralmente torna-se eritematosa, seca e escamosa, muitas vezes progredindo para quadros ainda mais graves, com surgimento inclusive de úlceras, MILLER & RUDOLPH³⁴ (1990), descreveram as injúrias em peles, provocadas pela irradiação e fizeram uma breve revisão da literatura sobre os danos provocados pela irradiação após o tecido epitelial sofrer radioterapia. Eles afirmaram que o fluxo sangüíneo diminuído não é a única causa

para pobre cicatrização de retalhos de pele que cobrem úlceras de radiação, havendo a necessidade que tais retalhos sejam retirados de regiões distantes da área irradiada, que tenham boa vascularização e forneçam para a lesão uma fonte saudável de fibroblastos perivasculares.

Uma vez que dentro do campo odontológico ainda era e é necessário estudar os efeitos das baixas doses de radiação X na cura de feridas, ABDALA *et al.*¹(1991), com a finalidade de verificar os efeitos dos baixos níveis de radiação X no desenvolvimento do tecido de granulação, induzidos pela implantação de uma esponja de PVC em animais, utilizaram 23 ratos Wistar, divididos em três grupos, onde no grupo I (controle), os animais foram submetidos a implantação de esponja de PVC, e sacrificados aos 4, 7, 14, 21 e 28 dias após implantadas, no grupo II, os animais foram submetidos a mesma condição de implantação e sacrifício, sendo no entanto submetidos a uma dose única de 5,28 R no momento da implantação e no grupo III, também os animais foram submetidos as mesmas condições de implantação e sacrifício, entretanto submetidos à dose de 5,28 R a cada 2 dias após o implante, durante 14 dias, e a cada 4 dias, até completar 28 dias (58,08 R no total). Os autores puderam comprovar nessa pesquisa, que houve inibição parcial na evolução do tecido de granulação, tanto em se tratando da dose única (grupo II), quanto fracionadas (grupo III), demonstrando que a radiação X interfere no processo de reparo, sendo que doses fracionadas produzem efeito cumulativo maior que dose única.

YANASE *et al.*⁵³ (1993), para analisar os efeitos da irradiação na contração de feridas e taxa de crescimento, realizaram culturas de fibroblastos humanos irradiados, onde a preferência pela cultura de tecidos foi justificada pela necessidade de eliminar a possível influência da radiação sobre os vasos. Os fibroblastos foram coletados da mucosa bucal de pacientes submetidos a cirurgia bucal e cultivados em gel de colágeno hidratados, onde foram então submetidos a radiação X no regime dose única de 2, 4, 6, 8 e 10 Gy, sendo os tempos de análise imediatamente, 2 e 8 semanas após a irradiação. Foi observado que a irradiação inibiu o crescimento de fibroblastos e contração de gel de colágeno de um modo dose dependente. Após considerável inibição na segunda semana, foi verificada retomada na taxa de contração na oitava semana. Nos filamentos de actina também ocorreram alterações dose dependente. Portanto os autores concluíram que, a irradiação X parece inibir a contração da ferida por afetar a organização do citoesqueleto dos fibroblastos constituídos pela actina.

A introdução de novas técnicas cirúrgicas e outras modalidades terapêuticas, tem marcadamente influenciado o uso de radiação ionizante em terapias em dermatologia. Radiação X e de elétrons são atualmente usadas somente para um limitado número de indicações em pacientes cuidadosamente selecionados, visto que o acesso cirúrgico como forma de terapia tem ganho popularidade no tratamento de tumores de pele, entretanto, nem todos os dermatologistas estão familiarizados com os benefícios da radiação ionizante para pacientes com neoplasias cutâneas e outras doenças de pele. Assim

GOLDSCHMIDT *et al.*²⁰ (1994), escreveram um artigo revisando as modernas indicações para a terapia com radiação em dermatologia, discutindo importantes fatores físicos e biológicos, efeitos da radiação, medidas de proteção e resultados terapêuticos.

WATANABE *et al.*⁵¹ (1994) , pesquisaram a gênese e a evolução do tecido de granulação induzido experimentalmente em ratos, sob a ação local de baixas doses de radiação X, comparando os possíveis efeitos produzidos, quando da aplicação em dose única e em dose dividida, com o tecido de granulação normal. Para isso, utilizaram-se de animais que foram divididos em três grupos experimentais, sendo eles: controle, dose única (7,0 R) e dose dividida (7,0 R, divididas igualmente em três frações), onde o tecido de granulação foi estudado aos 2, 4, 7, 11, 14, 21 e 28 dias de evolução. Os resultados mostraram que não houve influencia da radiação X na orientação macromolecular dos tecidos irradiados, não havendo alteração na síntese de GAGs, sendo sua formação iniciada por volta do terceiro dia após a ferida, atingindo seu pico ao redor do sétimo e oitavo dias pós-ferimento nos três grupos e finalmente que não houve diferença significativa entre os grupos dose dividida e dose única.

WANG *et al.*⁵⁰ (1994), empreenderam uma investigação da resposta morfológica da reparação de feridas de pele de ratos após radiação de elétrons em corpo parcial e com profundidade de 3 mm. Para tanto, foram feitas incisões na pele dorsal de ratos que tinham sido localmente irradiados com radiação de elétrons, com 9,6 Gy, 7 dias antes do procedimento cirúrgico. Os ratos foram

sacrificados em intervalos de tempo de 1, 3, 7 e 14 dias após ferimento, e as amostras obtidas foram analisadas por Microscopia Óptica e Microscopia Eletrônica de Varredura. Os resultados sugeriram que uma única dose de corpo parcial causou atraso na reparação tecidual até por volta de sétimo dia, havendo uma depressão no número de células inflamatórias e resposta exudativa do tecido, diminuindo a migração epitelial e uma redução no número de fibroblastos, juntamente com um atraso na formação dos feixes de colágeno e reparação tecidual. Contudo, a cura de tecido normal não foi impedida.

ALMEIDA² (1997), com a finalidade de estudar o efeito de baixas doses de radiação de elétrons no processo de reparação tecidual em ratos, trabalhou com feixes de elétrons com energia de 6 MeV, onde administrou uma dose de 1 Gy às feridas produzidas em pele de ratos, imediatamente após terem sido realizadas ou 3 dias após, sendo irradiadas somente 1,0 cm circunjacente a área da ferida. As avaliações foram realizadas pelos métodos histológicos e histoquímicos em diferentes tempos de estudos da reparação tecidual. Deste modo pode concluir que, a incidência de irradiação por elétrons, na dose de 1 Gy, em bordas de feridas causou retardo no processo de reparação, sendo mais acentuada no grupo que sofreu irradiação 3 dias após a abertura da ferida.

MONTEIRO³⁵ (1999), com o objetivo de verificar morfológica e ultraestruturalmente, os possíveis efeitos da radiação de elétrons em baixas doses, sobre o processo de reparo em feridas irradiadas imediatamente após a cirurgia e após 72 horas, utilizou 75 ratos divididos em quatro grupos, onde

realizou feridas excisionais no dorso de cada animal. O grupo controle e o grupo com ferida irradiada imediatamente após a cirurgia foram analisados nos tempos 2, 4, 7, 11, 17 e 21 dias. O grupo controle e irradiado 3 dias após a remoção do tecido, foram analisados nos tempos 5, 7, 10, 14, 17, 20 e 24 dias. Por meio da observações das lâminas histológicas, pode concluir que houve um atraso na reparação do grupo irradiado imediatamente após a cirurgia e principalmente no grupo irradiado 3 dias após a realização da ferida. Ao final do período experimental, todos os tecidos apresentaram características bastante semelhantes, indicando um atraso transitório.

3 - DIABETES

Diabetes mellitus, ou simplesmente diabetes, segundo GUYTON²⁴ (1986) e DOUGLAS¹¹ (1994), é causada pela diminuição dos índices de secreção de insulina pelas células beta das ilhotas de Langerhans, presentes no pâncreas, ou devido a uma menor ação hormonal a nível periférico, sendo que, esta deficiência de insulina, acarreta um grande número de distúrbios, que afetam a utilização e a disponibilidade de glicose pelos tecidos insulino-dependentes.

De acordo com o National Institute of Health, oito tipos de diabetes podem ser reconhecidos, entretanto, as formas mais comuns são, o diabetes mellitus tipo I ou insulino-dependente (IDDM) ou infanto juvenil, que em geral inicia-se nos

primeiros anos de vida, e o diabetes mellitus tipo II ou não insulino-dependente (NIDDM), própria de indivíduos de idade avançada.

O diabetes mellitus tipo I, segundo FLEURY¹⁵ (1995), é a forma mais grave, entretanto menos freqüente, ocorrendo em 5 à 15 % do total dos casos, enquanto o diabetes mellitus tipo II é a forma mais freqüente de diabetes mellitus primária, abrangendo cerca de 85 à 95% do total dos casos.

A hereditariedade desempenha importante papel no aparecimento de ambos os tipos de diabetes. O tipo I costuma ter início rápido e parece resultar da predisposição hereditária ocasionada ou pelo desenvolvimento de anticorpos contra as células beta, causando desta forma, destruição auto-imune ou pela destruição das células beta por enfermidade viral, ou ainda, simplesmente por uma simples degeneração dessas células. Já o diabetes tipo II, parece resultar da degeneração das células beta em conseqüência do envelhecimento mais rápido nas pessoas suscetíveis, que em outras. No caso do diabetes tipo II, como os obesos necessitam de maior quantidade de insulina para o controle metabólico, o fator obesidade acaba por predispor estas pessoas com maior freqüência, em comparação às pessoas normais²⁴.

De acordo com GUYTON²⁴ (1989) e DOUGLAS¹¹ (1994) os sintomas mais precoces do diabetes são: hiperglicemia (mesmo em jejum), a poliúria (eliminação excessiva de urina), polidipsia (ingestão excessiva de água), polifagia (fome excessiva), perda de peso e astenia (falta de energia).

Uma das principais manifestações clínicas do diabetes que mais chama a atenção, é a polifagia, devido à falta de estímulo do centro de saciedade hipotalâmico, decorrente do deprimido consumo de glicose. Já a glicosúria ou eliminação de glicose pela urina, devido ao aumento da taxa de glicose no sangue, provoca o aparecimento da polidipsia e poliúria, enquanto a astenia parece ser causada principalmente pela perda de proteína orgânica^{11, 24}.

O diabetes mellitus, se não detectado e tratado, apresenta complicações, que podem ser de caráter agudo ou crônico. Dentre estas complicações estão, infelizmente, o comprometimento do processo de reparação tecidual.

4 - DIABETES E REPARAÇÃO TECIDUAL

O processo de reparação pode ser alvo de interferências decorrentes de fatores sistêmicos, sofrendo bloqueio ou retardo, onde um destes fatores como frisado no item anterior é o diabetes mellitus.

Segundo FELIX *et al.*¹³ (1990) o indivíduo diabético possui 50% de chance de ser operado ao menos uma vez em sua vida. Sendo assim, o estudo das implicações dessa patologia na reparação, assume peculiar importância, principalmente porque estes indivíduos, apresentam ainda maior susceptibilidade a infecções graves, devido a vários fatores, incluindo a menor quimiotaxia neutrofílica e menor capacidade fagocitária, tornando-se mais suscetíveis a invasão bacteriana e conseqüentes retardos na cicatrização das feridas^{11, 12, 13, 39}.

Conforme diversos autores citaram, tais como VIBERTI⁴⁸ (1983), FELIX *et al.*¹³ (1990), e CECHOWSKA-PASKO *et al.*⁹ (1999), o diabetes mellitus provoca macro e microangiopatias, interferindo no aporte sangüíneo local da lesão, bem como, distúrbios metabólicos, mudanças hemodinâmicas, diminuição de colágeno e GAGs.

Todas estas alterações encontradas em indivíduos diabéticos, despertou e desperta incontáveis pesquisas sobre o assunto.

JUNOD *et al.*²⁸(1967) estudaram a ação da Estreptozotocina nas células- β pancreáticas, onde utilizaram Estreptozotocina administrada em ratos que a seguir foram sacrificados nos tempos de 1, 2, 4, 7, 10 e 16 horas após. Em seguida o pâncreas foi examinado ao microscópio óptico e eletrônico. Através desse experimento puderam concluir que a Estreptozotocina é um agente citotóxico altamente efetivo para as células- β pancreáticas, sendo sua especificidade muito maior do que a da aloxana, onde foi demonstrado haver uma larga margem entre a dose diabetogênica e a toxicidade geral.

Assim sendo, GLICKMAN *et al.*¹⁹ (1967), resolveram estudar os efeitos do diabetes induzido por aloxana sobre a reparação gengival após cirurgia. Para isso eles utilizaram ratos que foram divididos em quatro grupos: animais não diabéticos não operados, não diabéticos mais cirurgia, diabéticos não operados e diabéticos mais cirurgia, após 8 semanas foi realizada nos incisivos superiores e inferiores esquerdos uma recessão da margem gengival. Os animais foram sacrificados em intervalos de 14, 78 e 115 dias após o período inicial. Os maxilares foram fixados,

descalcificados e examinados ao microscópio. Os autores através de suas observações puderam concluir que o diabetes retardou a reparação pela inibição da fibroplasia e da formação de osso, a inflamação produzida por irritação local foi mais dissuasiva para reparação periodontal do que diabetes induzido pela aloxana.

Uma vez que várias funções são atribuídas as GAGs no processo de reparação tecidual das feridas e sabendo-se que a deficiência insulínica interfere acentuadamente na biossíntese deles, CATANZARO-GUIMARÃES^{4,5,6,7} (1968), usando alguns métodos específicos para GAGs, bem como observações do tecido de granulação, realizou inúmeros experimentos e observou uma baixa reatividade de base e substância fibrilar em tecido de granulação de feridas de ratos diabéticos aloxânicos. Ele afirmou que a deficiência de GAGs, como decorrência do quadro metabólico encontrado no diabético, constitui um dos principais fatores do retardamento da fase fibroblástica. Mostrou que as fibras colágenas em tecido de granulação de feridas em ratos diabéticos aloxânicos apresentam-se intensamente coradas. Quando feita extrações enzimáticas, as fibras colágenas pareceram estarem rompidas e tinham perdido muitas das suas reatividades histoquímicas, podendo concluir que em tecido de granulação de feridas de ratos diabéticos aloxânicos, a substância fundamental e fibrilar tem um baixo estado de agregação, tendo uma grande quantidade de material reativo de Schiff nestes sistemas colágenos, mostrando uma alta densidade de grupos reativos que normalmente são relatados em uma formação estrutural anormal; devido

deficiência insulínica. O autor pôde concluir que no diabetes o sistema fibrilar conjuntivo mostrou intensa labilidade aos efeitos da hidrólise ácida e enzimática, denunciando, portanto, um insuficiente estado de organização molecular, afirmou que provavelmente a maior susceptibilidade do colágeno do grupo diabético aos efeitos hidrolíticos, foi devida não só a possíveis defeitos na estrutura da proteína do colágeno, como também à deficiência de aminoácidos e polissacárides responsáveis pela estabilidade físico-química do sistema fibrilar. Pode verificar que, nos animais diabéticos as feridas cirúrgicas sofreram um atraso no processo de oclusão. Onde devido às características estruturais imaturas do tecido de granulação, é possível que o mesmo se comporte como um componente insulínico-sensível no processo de reparação cicatricial.

WERINGER & ARQUILLA⁵² (1981), com o intuito de verificarem se o efeito da insulina, na modulação de eventos celulares e vasculares em cura de feridas, pode ser suprimido em diabéticos, e ainda, se a diminuição nos níveis de insulina pode ser uma causa da diminuta resposta de cura, examinaram feridas em orelhas de hamsters chineses normais e diabéticos não cetônicos por métodos morfológicos e morfométricos, e puderam concluir que seus resultados comprovam a hipótese de que a insulina é um componente necessário para a cura das feridas.

Como é extremamente importante esclarecer as alterações que ocorrem em pequenos vasos, bem como o desenvolvimento de deficiências em diferentes órgãos de indivíduos diabéticos. VIBERTI⁴⁸ (1983), examinou um grupo de 63

pacientes insulino-dependentes com teste Albustix negativo, medindo a taxa de excreção de albumina na urina, e novamente medindo esta taxa com a mesma técnica 14 anos depois, com o objetivo de discutir os fatores hemodinâmicos na gênese de microangiopatia diabética, bem como estabelecer as seqüências de principais eventos (em diabéticos) que vão, desde um aumento da permeabilidade capilar à deficiência de um órgão ou tecido. O autor pode concluir que certos níveis de microalbumina identificam um grupo de pacientes diabéticos com um alto risco de danos nos órgãos e fornece a primeira evidência de uma ligação entre a precoce passagem transglomerular aumentada de albumina e a tardia glomerulopatia severa até a falência do rim. Segundo o autor é impossível sugerir uma seqüência de eventos que poderia conduzir de uma permeabilidade capilar aumentada, até uma severa microangiopatia diabética. A reversão do aumento da permeabilidade capilar pode eliminar um dos mecanismos responsáveis pela microangiopatia diabética.

Devido muitas das complicações crônicas do diabetes mellitus envolverem defeitos no tecido conjuntivo, tais como pobre reparação tecidual, diminuída formação óssea e diminuído crescimento linear, sendo o colágeno o maior componente proteico do tecido conjuntivo, SPANHEIMER *et al.*⁴⁴ (1988), examinaram a produção de colágeno em ratos diabéticos explorando este efeito generalizado no metabolismo do tecido conjuntivo. Para a indução do diabetes em ratos foi utilizado Estreptozotocina, nos quais após instalado o quadro, ossos parietais e cartilagem articular foram removidos e incubados a 37°C com 5 μ Ci I [5

³H] prolina por 2 horas, sendo então quantificada a produção de proteínas colágenas e não colágenas após a separação com colagenase purificada de bactéria. Com isso, puderam concluir que o diabetes está associado a um acentuado decréscimo na produção de colágeno, o qual foi visto precocemente depois da indução de diabetes e foi específico quando comparado com a produção de proteína não colagenosa. Efeitos cumulativos destas marcadas mudanças na produção de colágeno contribuiu para complicações crônicas do tecido conjuntivo em diabéticos.

TENGRUP *et al.*⁴⁵ (1988), utilizaram ratos diabéticos (aloxânicos), nos quais o tecido de granulação foi obtido pela implantação de esponja Ivalon subcutaneamente e analisado 4 e 7 dias posterior a operação, através de métodos bioquímicos quantitativos. O objetivo do experimento foi estudar a formação precoce de tecido de granulação, e metabolismo de Zn e cobre em ratos traumatizados e com indução de diabetes pela Aloxana, sendo esta não controlada. O estudo mostrou que, em ratos diabéticos aloxânicos a formação de tecido de granulação é prejudicada, com uma fase inflamatória prolongada, menor quantidade de colágeno e diminuída vascularização.

Como a cura de perfurações mesentéricas é atrasada em ratos com deficiência insulínica depois de 4 semanas de diabetes induzido por Estreptozotocina, FRANZEN & NORRBY¹⁶ (1988), investigaram a capacidade mitótica de 2 tipos de células predominantes na cura de janelas mesentéricas em ratos, nos quais estimaram o índice de marcação de fibroblastos e células

mesentéricas na fase inicial e tardia da reparação dentro de uma área com 1 cm de largura ao redor da perfuração e centralmente na ferida depois da área ser suturada. O índice mitótico destas células também foram estimados em várias distâncias da perfuração, e observaram que, durante o período precedente a cura pelo fechamento, o índice de marcação de ambos fibroblastos e células mesoteliais foram, contudo, significativamente reduzido em animais diabéticos. A diminuída mitose nestas células de cura de feridas em ratos diabéticos pode assim ser de importância patogênica no atraso da reparação nestes animais.

Como os vários mecanismos envolvidos no diabetes e como estes mecanismos agem provocando alteração, permanecem obscuros, MORAIN & COLEN³⁶ (1990), examinaram como o diabetes afeta a cura de feridas do ponto de vista de alterações na microcirculação, função nervosa e sistema imune, bem como seus componentes conhecidos e envolvidos com o diabetes mellitus, discutindo cada item separadamente, no qual em pacientes diabéticos, pode ser demonstrado que há lesões arteriolares anatômicas, especificamente na artéria tibial e peritoneal, o que pode tornar tais indivíduos susceptíveis a oclusão arterioesclerótica.

Em 1990, FELIX *et al.*¹³ publicaram um trabalho a respeito da cura de feridas e os eventos fundamentais de algumas fases, revendo os principais fatores sistêmicos que potencialmente diminuem ou atrasam a reparação de feridas. Com este propósito, eles discutiram o mecanismo de ação mais comum de alguns fatores, dentre eles o diabetes mellitus.

EHRlichman *et al.*¹² (1991), descrevem a biologia molecular e nutrição de cura de feridas, e otimização e prevenção de problemas relacionados a reparação destas. Alguns dos problemas enumerados foram a: diminuição da distribuição do oxigênio, coberturas das feridas, o efeito da síndrome da imunodeficiência adquirida, quimioterapia e infecção. Os autores descreveram ainda problemas específicos como as feridas irradiadas e o diabetes, no qual em feridas irradiadas acreditam que a deficiência do fechamento destas deva-se principalmente a inadequada vascularização e pobre liberação de oxigênio do tecido danificado, além da radiação provocar diminuição da força de tensão e diminuição da deposição total de colágeno. Quanto ao diabetes mellitus este provoca uma diminuição da função de leucócitos, diminuição da quimiotaxia e fagocitose, sendo muitos dos problemas do diabetes especialmente em extremidades mais inferiores, atribuído à doenças de pequenos vasos.

Com o objetivo de estudar quantitativamente, através de técnicas morfométricas, a influência do diabetes em alguns aspectos das ultra estruturas celulares, ligadas a contração do tecido conjuntivo em feridas obtidas por perfuração mesentérica em ratos, FRAZEN & ROBERG¹⁷ (1995), induziram diabetes mellitus com Estreptozotocina em ratos, onde com o auxílio de um bisturi fizeram uma perfuração na janela mesentérica. Os resultados obtidos sugeriram que há uma reduzida densidade da superfície da membrana plasmática em células diabéticas, com alteração da mobilidade e migração dos fibroblastos, achado este compatível com a reduzida contração de feridas em diabetes.

DEVLIN *et al.*¹⁰ (1996), realizaram um estudo a fim de examinar a reparação dos alvéolos dos dentes molares em ratos diabéticos induzidos pela Estreptozotocina. Os ratos foram divididos em três grupos: grupo controle, grupo diabético e grupo diabético controlado (com insulina). Depois de duas semanas, todos os ratos sofreram extração dos dentes molares sob anestesia, sendo sacrificados em diferentes intervalos de tempo. Por meio das observações histológicas puderam concluir que, em animais diabéticos insulino dependentes não controlados, a formação da estrutura colágena no alvéolo de dentes extraídos é inibida, resultando em atraso na reparação e aumento da destruição alveolar.

Segundo KAMAL *et al.*²⁹ (1996), é importante e necessário uma integração multidisciplinar para tentar entender as diferentes alterações provocadas pelo diabetes, assim, eles escreveram um artigo no qual fizeram uma revisão da literatura sobre a patobiologia do diabetes mellitus com suas implicações cirúrgicas. Os autores descreveram as manifestações clínicas, o mecanismo envolvido no diabetes e as implicações do diabetes em diferentes tecidos. Onde puderam concluir que, o futuro oferece considerável avanço para um melhor entendimento, prevenção e tratamento de complicações crônicas provocadas pelo diabetes mellitus.

CECHOWSKA-PASKO *et al.*⁹ (1999), utilizando Estreptozotocina, induziram diabetes em ratos Wistar, com o propósito de verificar se a diminuição de GAG na pele de ratos com diabetes crônica é resultado da diminuição na biosíntese ou aumento na degradação destas moléculas. Para tanto, eles

realizaram um experimento de marcação com glicosamina radioativa e sulfato. Os autores demonstraram através do experimento, que o diabetes provocou uma diminuição da incorporação de [^{14}C]-glicosamina dentro de ácido hialurônico e GAGs sulfatadas. Os resultados obtidos sugeriram que a supressão das GAGs na pele de ratos diabéticos resultam da diminuição da biossíntese destas e não do significativo aumento da degradação, onde a biossíntese de GAGs sulfatadas está profundamente diminuída. Sendo assim, este fenômeno pode ser um dos fatores que prejudicam a reparação da ferida em indivíduos diabéticos.

Pelo fato de que o exato mecanismo no qual o diabetes atrasa a reparação da ferida ainda não ser conhecido, em 1999, LOOTS *et al.*³¹ estudaram por meio da proliferação de fibroblastos "*in vitro*", este fenômeno, a fim de determinar o potencial de proliferação dos fibroblastos, isolados de um sítio ulcerado de 4 pacientes que apresentavam diabetes mellitus não insulino dependentes. O controle foi realizado por meio de fibroblastos isolados de pele normal da perna de indivíduos voluntários. A capacidade proliferativa foi analisada pela avaliação da incorporação de [^3H] timidina e trypsinização dos fibroblastos através da microscopia óptica e microscopia eletrônica de transmissão. Com isso puderam concluir que, um menor número de fibroblastos na úlcera é causado pela sua proliferação prejudicada, o que provavelmente contribui para uma produção diminuída de proteínas da matriz extracelular, prejudicando a reparação da ferida. Os resultados sugeriram ainda que, alta concentração de glicose pode ser

inibidora da proliferação de fibroblastos, havendo também diminuída capacidade proliferativa e morfologia anormal de fibroblastos.

5 - DIABETES E RADIAÇÃO IONIZANTE

A associação da radiação ionizante e diabetes quanto aos seus comprometimentos na reparação tecidual, não tem sido estudado, onde na literatura encontramos um único artigo de GARDINER *et al.*¹⁸ (1993), que investigaram o efeito combinado de diabetes experimental e radiação em retina, para confirmar se o diabetes mellitus preexistente exacerbava a injúria produzida pela radiação ionizante em retina. Os autores utilizaram ratos diabéticos nos quais, metade de dois grupos de ratos diabéticos induzidos por Estreptozotocina e um grupo de animais normais, tiveram seu olho direito irradiado com radiação X e com 1000cGy e 90 kVp, sendo a prevalência de capilares avasculares da retina quantificado para cada um dos 6 grupos de animais sacrificados 6,5 meses pós irradiação. Os resultados desse estudo sugeriram uma relação cinérgica entre diabetes preexistente e radiação ionizante no desenvolvimento de vasculopatias retinianas, e que a potencialização do dano vascular é dependente da duração do diabetes antes da exposição à irradiação.

PROPOSIÇÃO

PROPOSIÇÃO

Considerando os poucos trabalhos efetuados e descritos na literatura, sobre os efeitos de baixas doses de radiação de elétrons no tecido de granulação e a ínfima quantidade de trabalhos associando o efeito de baixas doses de radiação de elétrons no tecido de granulação em animais com deficiência insulínica, este experimento teve como objetivo:

- 1) avaliar morfológica e ultra-estruturalmente, o efeito de baixas doses de radiação de elétrons no processo de reparação tecidual, quando aplicada em corpo todo, de animais diabéticos.**

METODOLOGIA

Metodologia

AMOSTRA



Presente pesquisa teve início após a aprovação de projeto por parte do Comitê de Ética e Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Piracicaba -FOP- UNICAMP (Protocolo nº 035-1).

Para o desenvolvimento do presente trabalho, foram utilizados 48 ratos machos (*Rattus Norvegicus, Albinus, Wistar*), com idade aproximada de 60 dias, pesando entre 200 a 250 gramas, procedentes do Biotério Central da UNICAMP. Todos os animais foram mantidos desde a fase pré-operatória até o sacrifício, em gaiolas apropriadas, a temperatura e umidade controladas, bem como ração balanceada padrão e água "*ad libitum*", diariamente.

METODOLOGIA

PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

Os procedimentos experimentais consistiram de 8 fases:

- 1- Fase de indução de diabetes mellitus;
- 2- Fase de monitoramento do animal;
- 3- Fase anestésica;
- 4- Fase de depilação;
- 5- Fase cirúrgica;
- 6- Fase de irradiação;
- 7- Fase de obtenção das peças (com sacrifício dos animais);
- 8- Fase de preparação de lâminas histológicas nas colorações hematoxilina-eosina, picrossirius e azul de toluidina.

MATERIAIS

Para a realização das diferentes fases os seguintes materiais foram utilizados:

➤ *FASE DE INDUÇÃO DE DIABETES MELLITUS*

- Streptozotocin (Sigma Chemical Co. St. Louis, MO);
- Seringas hipodérmicas descartáveis para insulina com agulhas intradérmicas;

METODOLOGIA

- Éter etílico P.A;
- Campânula.

➤ **FASE DE MONITORAMENTO DO ANIMAL**

- Kit Glico-fita (Lilly do Brasil),

➤ **FASE ANESTÉSICA**

- Éter etílico P.A ;
- Solução anestésica injetável Hypinol a 3% do Laboratório Fantoveter
Divisão Cristália;
- Seringas Hipodérmicas para insulina com agulhas intradérmicas.

➤ **FASE CIRÚRGICA**

Mesa cirúrgica contendo:

- Campo cirúrgico estéril;
- Solução antisséptica e polvidine;
- Algodão hidrófilo e gaze esterilizados;
- Tesoura reta de ponta fina;
- Pinça reta (anatômica);
- Pinça dente de rato;
- Cabo de bisturi;

METODOLOGIA

- Lâminas de bisturi;
- Gabarito de plástico - retângulo de 2,5 cm x 1,5 cm.

➤FASE DE IRRADIAÇÃO

- Acelerador linear, modelo Mevatron 74, da Siemens;
- Caixas de acrílico para contenção do animal.

➤FASE DE OBTENÇÃO DAS PEÇAS

- Éter etílico P. A ;
- Campânula;
- Cloreto de sódio;
- Solução anestésica injetável Hypinol a 3% do Laboratório Fantoveter
Divisão Cristália;
- Papel filtro;
- Recipientes de vidro para o armazenamento das peças;
- Formol a 10%.

➤FASE DE PREPARAÇÃO DAS LÂMINAS HISTOLÓGICAS

- Álcool 70%;
- Álcool absoluto;
- Solução de xilol;

METODOLOGIA

- Paraplasty plus;
- Micrótomo;
- Estufa;
- Corantes e Reagentes.

MÉTODOS

Grupos experimentais

De forma aleatória a amostra foi dividida em quatro grupos experimentais: controle, irradiados, diabéticos e diabéticos irradiados, contendo um total de 12 animais em cada grupo, devidamente identificados por uma marca código por meio de números e cores, pintados em suas caldas utilizando pincéis atômicos. Todos os animais sofreram cirurgia e para os dois grupos que sofreram irradiação, esta foi realizada três dias após a abertura da ferida. A obtenção das peças para a confecção das lâminas histológicas, foi realizada em 04, 07, 13 e 21 dias à partir da abertura da ferida, sendo sacrificados 3 animais por grupo em cada um dos dias preestabelecidos. Sendo assim, os grupos foram classificados da seguinte maneira:

- Para o grupo controle, sem irradiação após a abertura da ferida (GC):
 - Grupo Controle - 4 dias
 - Grupo Controle - 7 dias

METODOLOGIA

Grupo Controle - 13 dias

Grupo Controle - 21 dias

- Para o grupo normal, irradiado 3 dias após a abertura da ferida (GI):
 - Grupo Irradiado - 4 dias
 - Grupo Irradiado - 7 dias
 - Grupo Irradiado - 13 dias
 - Grupo Irradiado - 21 dias
- Para o grupo diabético, sem irradiação após a abertura da ferida (GD):
 - Grupo Diabético - 4 dias
 - Grupo Diabético - 7 dias
 - Grupo Diabético - 13 dias
 - Grupo Diabético - 21 dias
- Para o grupo diabético, irradiado 3 dias após a abertura da ferida (GDI):
 - Grupo Diabético Irradiado - 4 dias
 - Grupo Diabético Irradiado - 7 dias
 - Grupo Diabético Irradiado - 13 dias
 - Grupo Diabético Irradiado - 21 dias

Indução

Os animais foram pesados em balança de precisão, e as doses da droga a ser injetada foram calculadas para cada animal. A seguir os animais foram anestesiados com Éter etílico P.A. em campânula, sendo o diabetes induzido por

METODOLOGIA

meio de injeção intraperitoneal de Estreptozotocina (Sigma Chemical), dissolvido em citrato de sódio 0,05 Mol. L⁻¹, pH 4,5, para evitar a inativação da Estreptozotocina em pH neutro. A posologia empregada foi de 35 mg/Kg de peso corporal do animal, administrada em dose única, após um período de jejum de 16 horas^{14, 28}. Nos animais do grupo normal os mesmos procedimentos foram realizados, sendo injetado cloreto de sódio à 9%.

Monitoramento do animal

O Monitoramento do estado hiperglicêmico foi executado após decorrido 72 horas da administração da Estreptozotocina¹⁰, sendo realizado pelo método da Glico-fita (Lilly do Brasil), monitorando tanto os animais diabéticos quanto os normais. O mesmo procedimento foi realizado após uma semana para reconfirmação do estado diabético e de normalidade dos demais animais. Sendo o diabetes não controlado até o fim do experimento.

Anestesia e depilação

Quinze dias após a indução do diabetes, os animais foram novamente pesados em balança de precisão e anestesiados por injeção intraperitoneal de Pentobarbital de Sódio a 3%, com dose de 40 mg/Kg por peso corpóreo, seguindo a orientação da Disciplina de Farmacologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba - UNICAMP. A tricotomia foi executada manualmente, a fim de se evitar

METODOLOGIA

irritação química na pele dos animais, sendo esta realizada em uma grande área da região dorsal.

Produção da ferida

Para a produção da ferida foram realizadas 4 incisões, que unidas entre si, produziram uma perda de tecido dérmico de 2,5 X 1,5 cm na região dorsal anterior, a uma distância de aproximadamente 1,0 cm à direita da espinha dorsal, sendo as duas maiores incisões paralelas a esta no sentido crânio-caudal. A profundidade de cada incisão atingiu aproximadamente 0,2 cm, tomando-se o cuidado de após retirado o tecido, observar-se como base da ferida o tecido muscular e nas bordas a presença da derme e epiderme. Para conservar a uniformidade das amostras, todas as feridas foram feitas sempre na mesma região, onde para manter constante o tamanho delas, foi confeccionado um gabarito de plástico, sendo o local da incisão marcado com o auxílio de caneta hidrográfica².

As feridas permaneceram abertas e descobertas não sendo necessário o uso de antibióticos pela observação da inexistência de qualquer indício de infecção.

Irradiação

Na fase de irradiação, ao terceiro dia após o ato cirúrgico, os animais pertencentes aos grupos irradiado e diabético irradiado receberam uma dose

METODOLOGIA

simples de radiação de elétrons em todo o corpo, equivalente a 1,0 Gy, emitida de um acelerador linear, modelo Mevatron 74 da Siemens. Cujas constantes físicas foram: 6 MeV, distância alvo-fonte de 100 cm e profundidade de 1,0 cm.

Obtenção das peças

Os animais dos quatro grupos foram sacrificados em número de 3 aos 4, 7, 13 e 21 dias pós-operatório, para obtenção das peças. Para tanto, os animais foram submetidos a anestesia por Pentobarbital de Sódio à 3%, sendo removido uma porção de tecido contendo a ferida ou cicatriz no centro, circundado por tecido normal (Pranchas 1 e 2). As incisões para a retirada dessas peças, foram realizadas sempre na mesma profundidade das incisões feitas para a produção da ferida. Após removidas, as peças foram devidamente lavadas com solução de cloreto de sódio, secas em papel filtro e mantidas em recipientes contendo solução fixadora de Formol a 10% até a inclusão, permanecendo nesta solução por um período mínimo de 72 horas.

Métodos histológicos

As peças fixadas foram incluídas em paraplasty plus, seguindo a técnica de rotina e processadas em micrótomo, sendo obtidos cortes de 7 μ m de espessura.

Após a montagem das lâminas, os cortes foram divididos em três lotes para a realização dos seguintes procedimentos de coloração:

METODOLOGIA

- **Coloração por hematoxilina-eosina:** A coloração foi realizada de acordo com a técnica de rotina do laboratório de Histologia da FOP- UNICAMP, o que permitiu a observação morfológica do processo de reparo dos diferentes grupos estudados.
- **Exame da birrefringência através do método de Picrosirius:** A técnica de coloração foi realizada de acordo com a rotina do laboratório de Histologia da FOP – UNICAMP, onde esta permitiu avaliar a birrefringência intrínseca (própria) dos feixes de colágeno, no qual podem ser melhor evidenciadas, principalmente nos primeiros dias de evolução tecidual, o que a transforma em birrefringência de forma.
- **Reação histoquímica:** As lâminas foram submetidas à reação histoquímica de metacromasia com azul de toluidina pH 4, em concentração de 0,025%, de acordo com a técnica de LISON³⁰ (1960). Esta técnica permite a observação das glicosaminoglicanas que reagem com o azul de toluidina, pelo dicróismo linear para verificação da orientação macromolecular dos feixes de fibras colágenas.

Todas as observações morfológicas e em polarização foram feitas com o auxílio de um fotomicroscópio "Zeiss - Pol 01" , no qual também foram obtidas as microfotografias.

RESULTADOS

RESULTADOS

Os resultados da análise microscópica do material foram obtidos por meio da realização de uma análise morfológica e qualitativa, que serão descritos neste capítulo.

DESCRIÇÃO MORFOLÓGICA

COLORAÇÃO POR HEMATOXILINA-EOSINA

4º dia de reparação tecidual

Grupo controle (GC): ⇒ Área da ferida bastante ampla, com a presença de crosta, tecido necrótico, grande quantidade de material celular, havendo predomínio de linfócitos e neutrófilos e presença de fibroblastos no tecido conjuntivo, não há evidências de vasos sanguíneos neo formados, epitélio ou anexos da pele (*Fig. 3.1 e 4.1*).

RESULTADOS

Grupo diabético (GD):⇒ Área da ferida bastante ampla, encoberta por uma crosta e grande quantidade de material necrótico, que serve como proteção para o incipiente tecido de granulação. Observa-se grande quantidade de material celular, sendo este maior que no GC, há maior desorganização tecidual, com predomínio de linfócitos e neutrófilos. Ausência de vasos sangüíneos neo formados, epitélio ou anexos da pele (*Fig. 3.2 e 4.2*).

Grupo irradiado (GI):⇒ Presença de crosta, área da ferida tão ampla quanto no GC, tecido necrótico em maior quantidade. As células inflamatórias predominantes são os linfócitos, não havendo diferença entre o tecido de granulação existente neste grupo com o GC correspondente (*Fig. 3.3 e 4.3*).

Grupo diabético irradiado (GDI):⇒ Área da ferida extremamente ampla coberta por uma crosta maior que no GD. Grande quantidade de material necrótico, sendo também maior que no GD. Ausência de epitélio e anexos da pele, havendo um atraso na reparação tecidual deste grupo e do GD em relação aos demais (*Fig. 3.4 e 4.4*).

7º dia de reparação tecidual

GC ⇒ Área da ferida mais reduzida quando comparada ao mesmo grupo aos 4 dias, não sendo observada a presença de crosta; entretanto ainda há tecido necrótico na superfície. O tecido de granulação encontra-se mais organizado, com a presença de muitas células, principalmente fibroblastos. O número de feixes de fibras colágenas é pequeno. Há a presença de grande

RESULTADOS

quantidade de vasos sangüíneos néo formados e ausência de epitélio e anexos da pele (*Fig. 5.1 e 6.1*).

GD ⇒ Não observa-se crosta, mas ainda há presença de tecido necrótico em grande quantidade. O tecido de granulação está mais organizado, entretanto, há predomínio de neutrófilos. Existe a presença de vasos sangüíneos néo formados em grande quantidade e ausência de epitélio e anexos da pele (*Fig. 5.2 e 6.2*).

GI ⇒ Área da ferida menor, presença de tecido necrótico e ausência de crosta. Tecido de granulação bastante celular, portanto menos fibroso. Presença de vasos sangüíneos néo formados em grande quantidade embora em relação aos grupos GC e GD, os vasos néo formados apareçam em menor número. Ausência de epitélio e anexos da pele (*Fig. 5.3 e 6.3*).

GDI ⇒ A crosta ainda se encontra presente, observando-se, grande quantidade de tecido necrótico, tecido de granulação com grande quantidade de material celular e predomínio de neutrófilos. Observa-se a presença de fibroblastos e vasos néo formados, sendo os vasos presentes em menor quantidade que nos GC, GD e GI. Ausência de epitélio e anexos da pele, sendo ainda bastante evidente o atraso de reparação tecidual em comparação com os demais grupos (*Fig. 5.4 e 6.4*).

13° dia de reparação tecidual

RESULTADOS

GC ⇒ Presença do tecido epitelial que encontra-se com espessura aumentada em comparação com o epitélio normal periférico, observando-se o início de queratinização, onde pelas características observadas pode-se concluir que há o início de plena função. Existe grande quantidade de fibroblastos e feixes colágenos finos evidentes, dispostos irregularmente e presença de vasos sanguíneos (*Fig. 7.1 e 8.1*).

GD ⇒ A área da ferida está extremamente reduzida, entretanto ainda observa-se a presença de tecido necrótico. O tecido epitelial encontra-se migrando a partir das margens, para produzir o fechamento completo da ferida que neste estágio ainda não ocorreu. Há reduzido número de células, com grande quantidade de fibroblastos e feixes de fibras colágenas finos e dispostos irregularmente, sendo menos espessos que no GC. Existe a presença de vasos em menor quantidade (*Fig. 7.2 e 8.2*).

GI ⇒ Área da ferida muito reduzida quando comparada ao mesmo grupo aos 7 dias, havendo uma migração do epitélio a partir das bordas, sendo este bastante fino, não recobrimo totalmente a área da ferida. A formação do tecido de granulação encontra-se atrasado em relação ao controle (*Fig. 7.3 e 8.3*).

GDI ⇒ Ferida de tamanho maior que no grupo diabético, presença de fina crosta, com certa quantidade de material necrótico. Ausência de tecido epitelial recobrimo o tecido de granulação, mas este encontra-se migrando a partir das margens. Grande quantidade de vasos, feixes de fibras colágenas finos e

RESULTADOS

irregulares, menor organização tecidual que nos demais grupos, ausência de anexos da pele (*Fig. 7.4 e 8.4*)

21° dia de reparação tecidual

GC ⇒ O tecido epitelial encontra-se queratinizado e bem formado, com espessura igual à do epitélio normal periférico. O tecido já encontra-se maduro, com todas as figuras que estão presentes em tecido normal. Os feixes de fibras colágenas estão bem evidentes e mais grossos, embora encontrem-se ainda mais finos que os feixes presentes no tecido normal circunjacente. Há a presença dos anexos da pele denotando o evidente grau de evolução do tecido de granulação (*Fig. 9.1 e 10.1*).

GD ⇒ Ausência de tecido necrótico, tecido epitelial queratinizado cobrindo todo o tecido correspondente a área da ferida. O tecido encontra-se maduro, com os feixes de fibras colágenas bem evidentes e mais grossos, entretanto, mais finos que o GC. Ainda não são observados anexos da pele (*Fig. 9.2 e 10.2*)

GI ⇒ Observa-se o epitélio mais espesso em comparação com o GC, que apresenta-se queratinizado e recobrindo o tecido de granulação, que possui feixes de fibras colágenas bem evidentes, mas mais finos que o GC (*Fig. 9.3 e 10.3*).

GDI ⇒ Ausência de tecido necrótico, apresentando tecido epitelial queratinizado sobre o tecido que encontra-se maduro, com todas as figuras que

RESULTADOS

estão presentes em tecido normal. Os feixes de fibras colágenas estão bem evidentes e mais grossos, entretanto, mais finos que nos demais grupos, além disso observa-se a ausência de anexos da pele e grande quantidade de vasos com hemácias no seu interior, continuando evidente ainda o atraso na maturação do tecido em comparação com os demais grupos (*Fig. 9.4 e 10.4*).

ASPECTOS QUANTITATIVOS

EXAME DA BIRREFRINGÊNCIA PELA TÉCNICA DO PICROSIRIUS

A propriedade de substâncias que possuem dupla refração é denominada birrefringência, sendo que a chamada birrefringência intrínseca refere-se ao grau de orientação macromolecular de um objeto (tecido), sem adição de nenhum método artificial. Como esta birrefringência na maioria das vezes é tênue, em alguns casos existe a necessidade da adição de corantes, que se combinam com as macromoléculas orientadas do objeto, produzindo assim a birrefringência de forma, que é mais intensa, permitindo a realização de avaliações mais precisas quanto à organização macromolecular do tecido sob exame.

No presente trabalho, o exame de birrefringência foi realizado pelo método do picrosírius. O objetivo desta técnica, segundo JUNQUEIRA *et al.* (1985)²⁷, é verificar a orientação das moléculas de colágeno, especificamente pelo aumento considerável de sua birrefringência, sendo que este método tintorial, quando associado à microscopia de polarização, não somente caracteriza material

RESULTADOS

colagênico como também mostra muito claramente a orientação de feixes de fibras colágenas.

Esta birrefringência de forma dos feixes de fibras colágenas é melhor evidenciada nos primeiros dias de evolução do tecido onde, pelo exame sob luz polarizada, o brilho dos feixes de fibras colágenas, que expressam seu grau de orientação macromolecular, vai se tornando mais intenso à medida que estes tomam-se mais numerosos e maduros.

Desta forma, esta técnica permite avaliar-se qualitativamente o quanto de feixes de fibras colágenas estão presentes nos diferentes grupos, caracterizando o grau de maturação do tecido.

4° dia de reparação tecidual

O exame da birrefringência dos tecidos no 4° dia de reparação tecidual permitiu observar que o GC exibiu um tecido com pequena quantidade de feixes de fibras colágenas esparsos com um certo grau de orientação macromolecular (*Fig. 11.1*), apresentando um maior brilho em comparação com os demais grupos.

O GI (*Fig. 11.3*), exibiu feixes organizados, em menor quantidade que o GC.

Já o GD (*Fig. 11.2*) e GDI (*Fig. 11.4*), apesar de apresentarem um início de formação e orientação dos feixes de fibras colágenas, encontram-se atrasados quando comparados aos grupos anteriores, possuindo o GDI menor quantidade de

RESULTADOS

feixes de fibras colágenas, denotando um maior atraso em relação aos demais grupos.

7° dia de reparação tecidual

Aos 7 dias de desenvolvimento, pode-se evidenciar marcante atraso na evolução dos tecidos dos grupos GI (*Fig. 12.3*), GD (*Fig. 12.2*) e GDI (*Fig. 12.4*) em comparação com o GC (*Fig. 12.1*), que apresenta-se com um brilho mais intenso, denotando um tecido de granulação mais organizado, apresentando feixes de fibras colágenas mais espessos e em maior quantidade

O GI apresentou uma maior quantidade de feixes de fibras colágenas em relação ao 4° dia, embora estes ainda encontrem-se esparsos e finos

O GD apresentou um tecido de granulação bastante atrasado, exibindo birrefringência muito tênue, mas maior que a do GDI, que exibiu brilho de pouca intensidade.

13° dia de reparação tecidual

A mesma ordem marcante nos aspectos de birrefringência dos tecidos de granulação se repetiu, mostrando no GDI sempre uma trama menos densa, com menor intensidade de brilho, apesar do natural aumento na quantidade e espessura dos feixes de fibras colágenas e conseqüentemente aumento do brilho dos tecidos (*Fig. 13.1, 13.2, 13.3, 13.4*).

RESULTADOS

21° dia de reparação tecidual

No último dia de avaliação da birrefringência dos processos de reparação tecidual, as evidências de atraso no desenvolvimento dos tecidos de granulação dos grupos GD, GI e GDI foram bastante marcantes, apesar dos grupos GI (Fig. 14.3) e GD (Fig. 14.2) apresentarem quase a mesma birrefringência, havendo entretanto uma grande diferença desses grupos com o GC (Fig. 14.1).

A principal evidência de menor evolução tecidual foi observada no GDI (Fig. 14.4), que mostrou um tecido de granulação pouco desenvolvido, com trama menos densa e fibrosa, estando portanto, menos brilhante em relação à sua birrefringência.

EXAME DO DICROÍSMO LINEAR PELO AZUL DE TOLUIDINA

O dicróismo está baseado nas teorias de absorção e dispersão luminosa, mas de maneira simplista, é a propriedade que uma determinada substância tem em exibir duas cores, quando coradas com um único corante metacromático, normalmente corantes orgânicos como Vermelho Congo, Tionina e Azul de toluidina, sendo então observados ao microscópio de polarização.

Neste trabalho, o fenômeno de dicróismo linear nos diferentes grupos foi produzido com a utilização de Azul de toluidina a 0,025% e pH 4, onde normalmente as moléculas do corante se ligam às moléculas de GAGs produzidas pelos fibroblastos, ligadas orientadamente às macromoléculas de colágeno.

RESULTADOS

Com a utilização deste corante, o tecido corado, analisado ao microscópio de polarização mostra-se azul ortocromático quando os feixes de fibras colágenas encontram-se paralelas ao plano de polarização da luz. Quando se coloca a platina do microscópio perpendicular ao plano de polarização da luz, os feixes de fibras colágenas exibem coloração rósea metacromática, desde que o tecido em exame possua organização macromolecular.

Utilizou-se o dicroísmo linear porque esse método permite verificar-se o estado estrutural do tecido, ou seja, sua organização macromolecular.

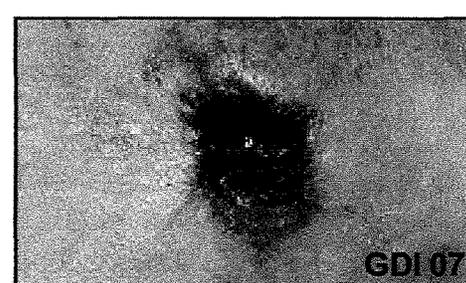
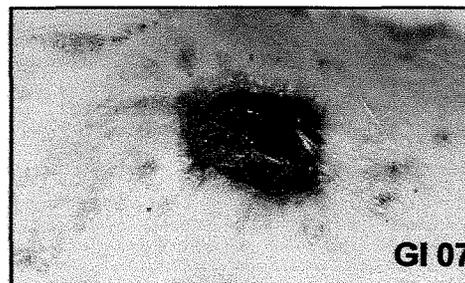
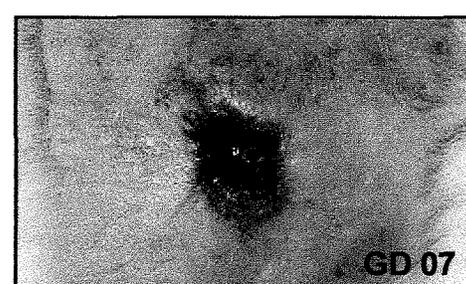
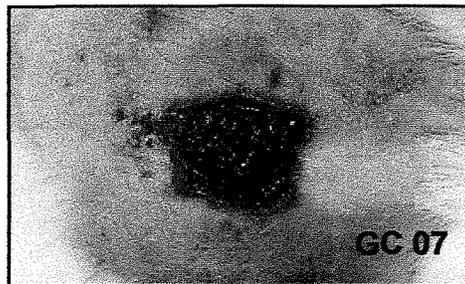
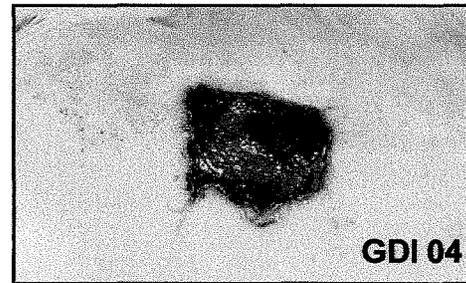
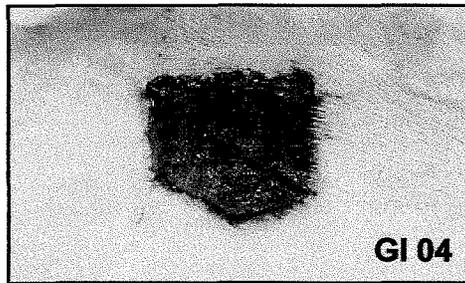
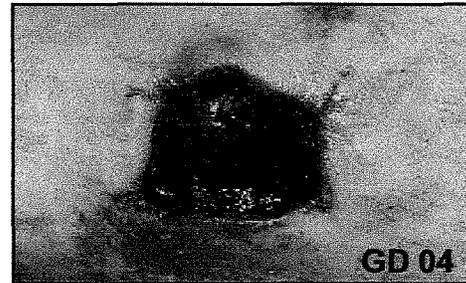
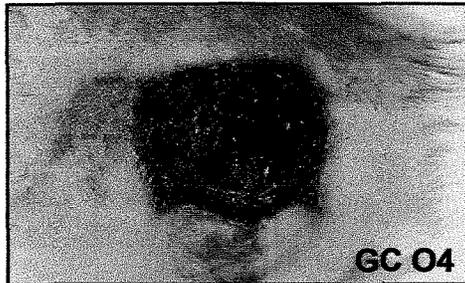
Quanto aos resultados observados, o dicroísmo linear somente pode ser evidenciado no 7º dia de reparação tecidual, sendo que o único grupo a apresentá-lo, embora ainda exibisse uma pequena organização tecidual, foi o GC. Já no 13º dia de gênese tecidual a GI juntamente com o GC exibiram um acentuado dicroísmo linear, o que não ocorreu com os GD e GDI, denotando um atraso na orientação macromolecular do tecido nesses grupos (Pranchas 15, 16 e 17).

No 21º dia pode-se observar que não houve diferença em nenhum dos grupos, os quais todos apresentaram dicroísmo linear, evidenciando o fenômeno de organização tecidual, com orientação macromolecular do tecido de reparação em todos os grupos, apesar de ter sido observado um atraso na organização tecidual dos GD e GDI em comparação com os demais (Prancha 18).

PRANCHAS

PRANCHA 1

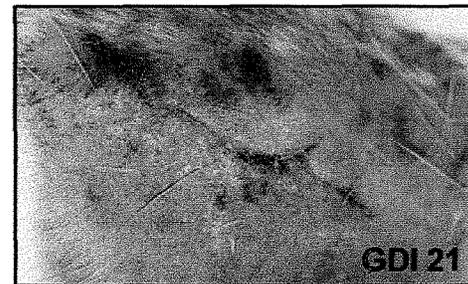
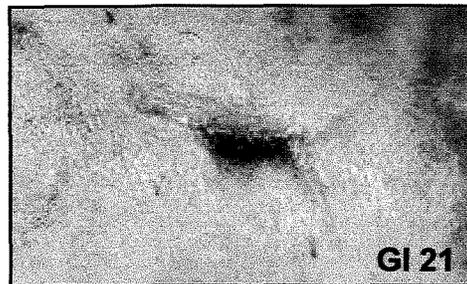
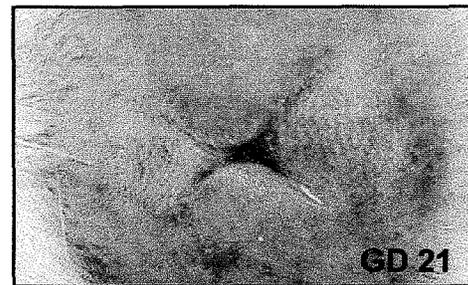
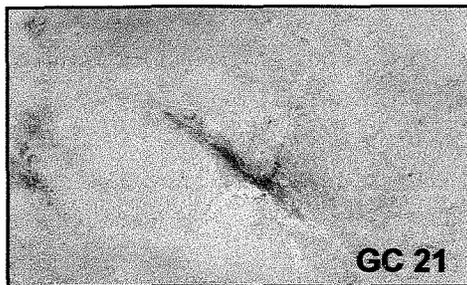
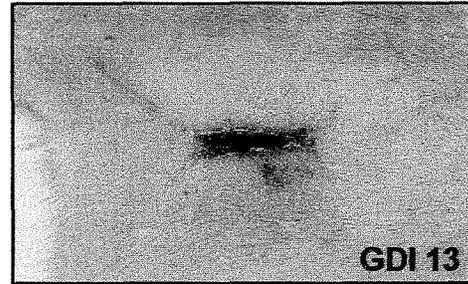
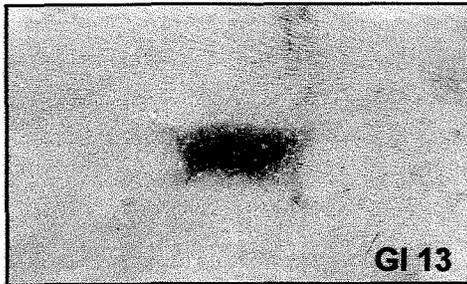
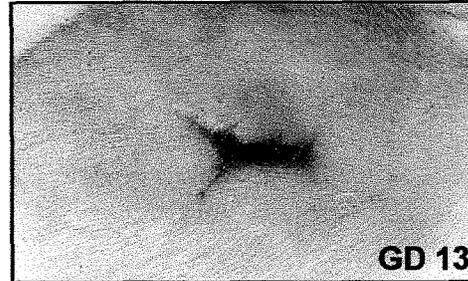
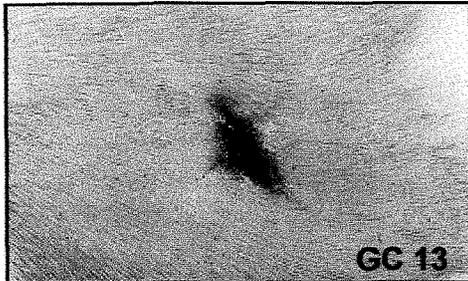
FERIDAS AOS 4 E 7 DIAS



PRANCHAS

PRANCHA 2

FERIDAS AOS 13 E 21 DIAS



PRANCHA 3

4º DIA DE REPARAÇÃO TECIDUAL

COLORAÇÃO POR HEMATOXILINA-EOSINA
Aumento original 2.5 x 1.25 x 10

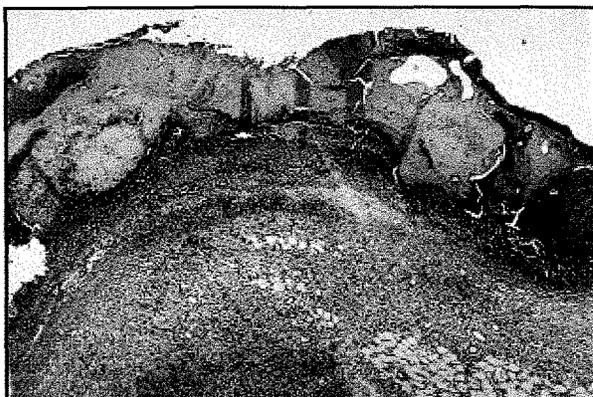


Figura 3.1 - Grupo controle (GC)

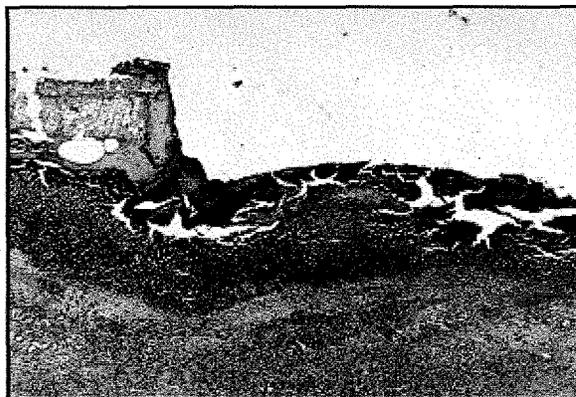


Figura 3.2 - Grupo diabético (GD)



Figura 3.3 - Grupo irradiado (GI)

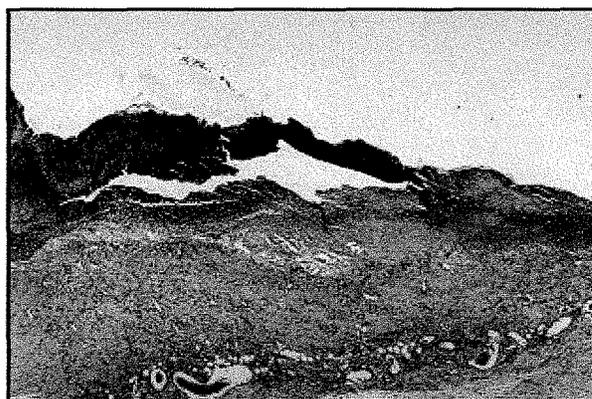


Figura 3.4 - Grupo diabético irradiado (GDI)

PRANCHA 4

4º DIA DE REPARAÇÃO TECIDUAL

COLORAÇÃO POR HEMATOXILINA-EOSINA

Aumento original 6.3 x 1.25 x 10



Figura 4.1 - Grupo controle (GC)



Figura 4.2 - Grupo diabético (GD)

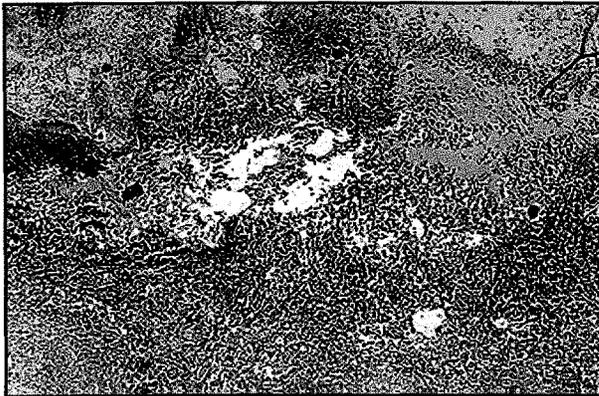


Figura 4.3 - Grupo irradiado (GI)



Figura 4.4 - Grupo diabético irradiado (GDI)

PRANCHA 5

7º DIA DE REPARAÇÃO TECIDUAL

COLORAÇÃO POR HEMATOXILINA-EOSINA

Aumento original 2.5 x 1.25 x 10



Figura 5.1 - Grupo controle (GC)



Figura 5.2 - Grupo diabético (GD)

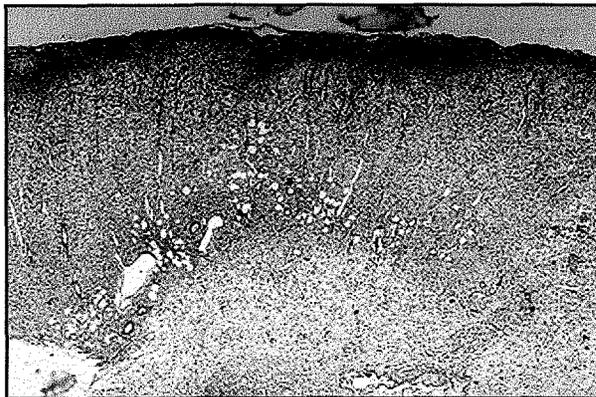


Figura 5.3 - Grupo irradiado (GI)

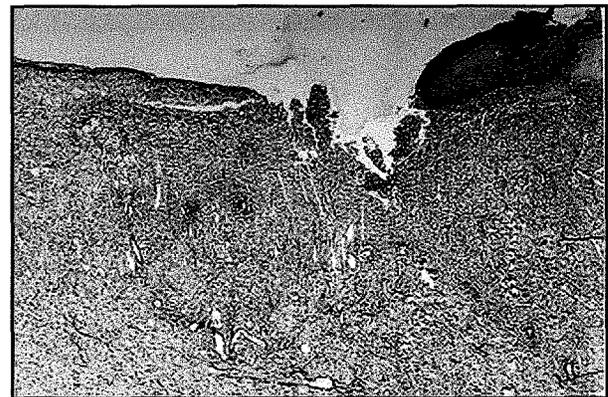


Figura 5.4 - Grupo diabético irradiado (GDI)

PRANCHA 6

7º DIA DE REPARAÇÃO TECIDUAL

COLORAÇÃO POR HEMATOXILINA-EOSINA

Aumento original 6.3 x 1.25 x 10



Figura 6.1 - Grupo controle (GC)



Figura 6.2 - Grupo diabético (GD)



Figura 6.3 - Grupo irradiado (GI)



Figura 6.4 - Grupo diabético irradiado (GDI)

PRANCHA 7

13º DIA DE REPARAÇÃO TECIDUAL

COLORAÇÃO POR HEMATOXILINA-EOSINA

Aumento original 2.5 x 1.25 x 10

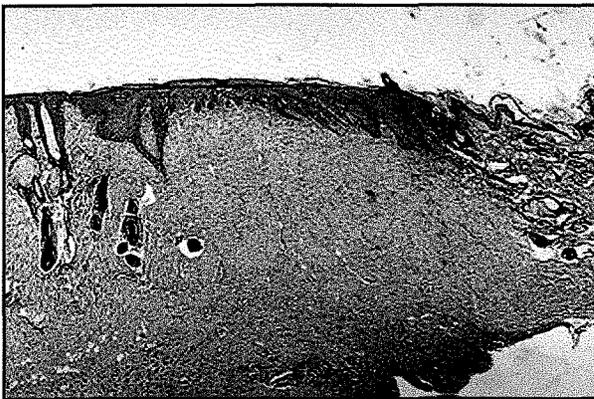


Figura 7.1 - Grupo controle (GC)



Figura 7.2 - Grupo diabético (GD)

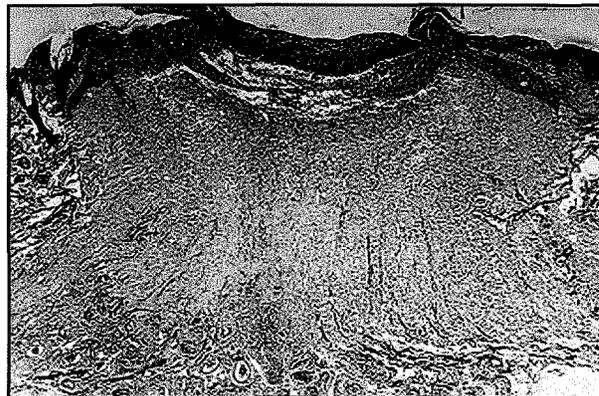


Figura 7.3 - Grupo irradiado (GI)



Figura 7.4 - Grupo diabético irradiado (GDI)

PRANCHA 8

13° DIA DE REPARAÇÃO TECIDUAL

COLORAÇÃO POR HEMATOXILINA-EOSINA

Aumento original 6.3 x 1.25 x 10

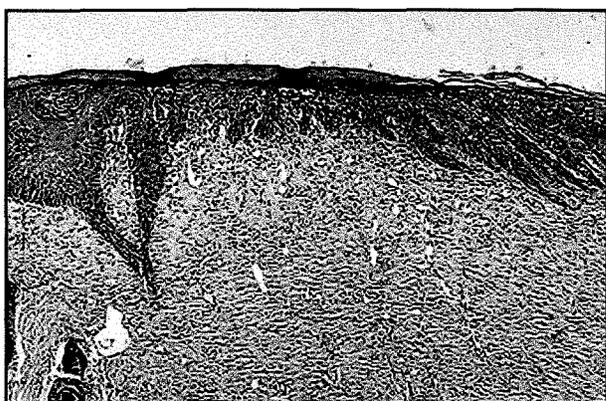


Figura 8.1 - Grupo controle (GC)

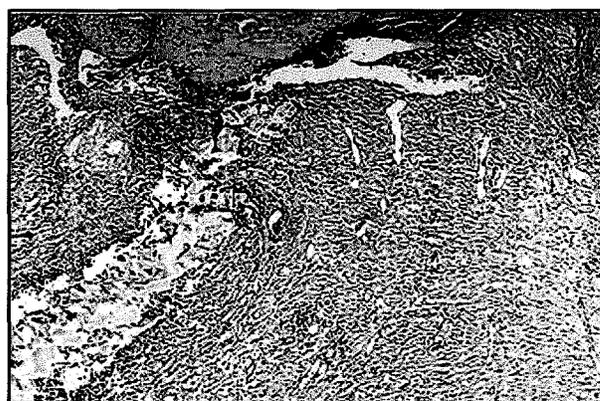


Figura 8.2 - Grupo diabético (GD)

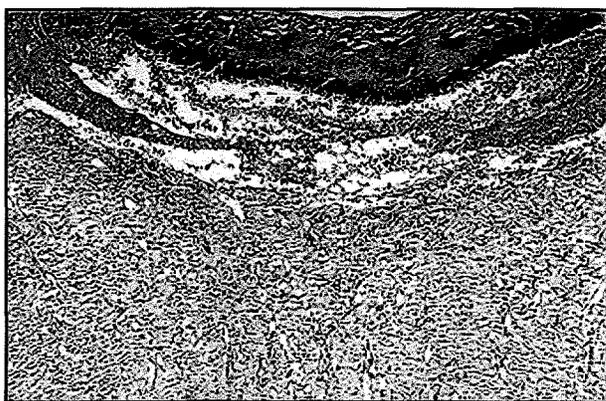


Figura 8.3 - Grupo irradiado (GI)



Figura 8.4 - Grupo diabético irradiado (GDI)

PRANCHA 9

21º DIA DE REPARAÇÃO TECIDUAL

COLORAÇÃO POR HEMATOXILINA-EOSINA

Aumento original 2.5 x 1.25 x 10

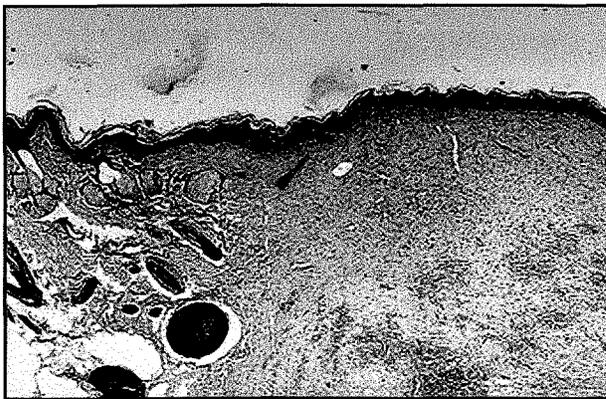


Figura 9.1 - Grupo controle (GC)



Figura 9.2 - Grupo diabético (GD)

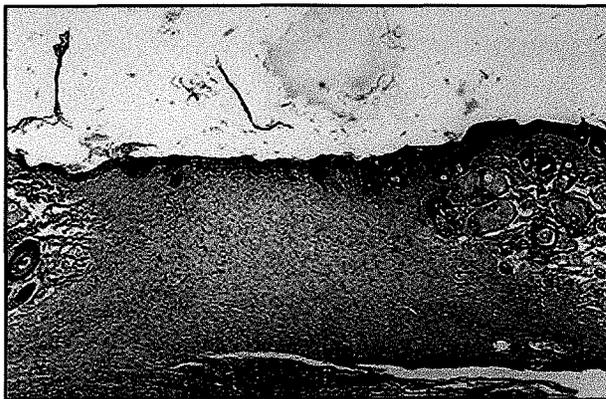


Figura 9.3 - Grupo irradiado (GI)

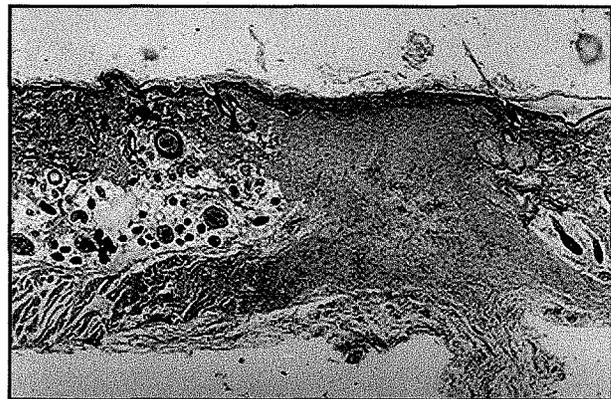


Figura 9.4 - Grupo diabético irradiado (GDI)

PRANCHA 10

21° DIA DE REPARAÇÃO TECIDUAL

COLORAÇÃO POR HEMATOXILINA-EOSINA

Aumento original 6.3 x 1.25 x 10



Figura 10.1 - Grupo controle (GC)



Figura 10.2 - Grupo diabético (GD)

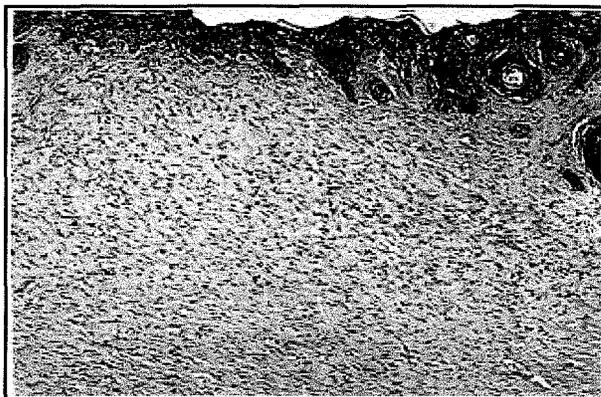


Figura 10.3 - Grupo irradiado (GI)

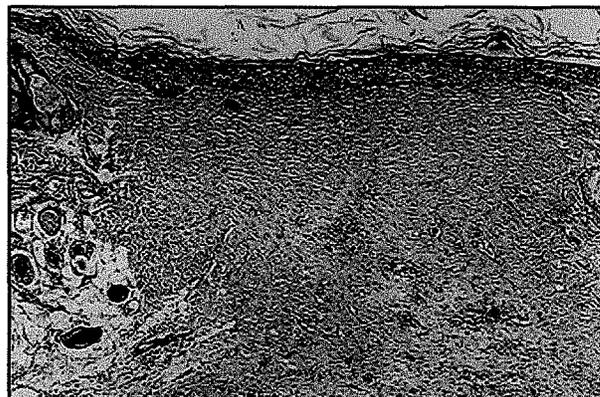


Figura 10.4 - Grupo diabético irradiado (GDI)

PRANCHA 11

4º DIA DE REPARAÇÃO TECIDUAL

EXAME DA BIRREFRINGÊNCIA PELA TÉCNICA DO PICROSIRIUS

Aumento original 6.3 x 1.25 x 10



Figura 11.1 - Grupo controle (GC)



Figura 11.2 - Grupo diabético (GD)



Figura 11.3 - Grupo irradiado (GI)

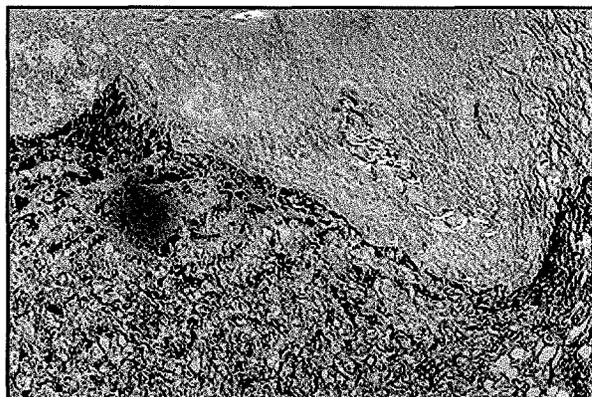


Figura 11.4 - Grupo diabético irradiado (GDI)

PRANCHAS

PRANCHA 12

7º DIA DE REPARAÇÃO TECIDUAL

EXAME DA BIRREFRINGÊNCIA PELA TÉCNICA DO PICROSÍRIUS

Aumento original 6.3 x 1.25 x 10



Figura 12.1 - Grupo controle (GC)



Figura 12.2 - Grupo diabético (GD)



Figura 12.3 - Grupo irradiado (GI)



Figura 12.4 - Grupo diabético irradiado (GDI)

PRANCHA 13

13º DIA DE REPARAÇÃO TECIDUAL

EXAME DA BIRREFRINGÊNCIA PELA TÉCNICA DO PICROSIRIUS

Aumento original 6.3 x 1.25 x 10



Figura 13.1 - Grupo controle (GC)



Figura 13.2 - Grupo diabético (GD)

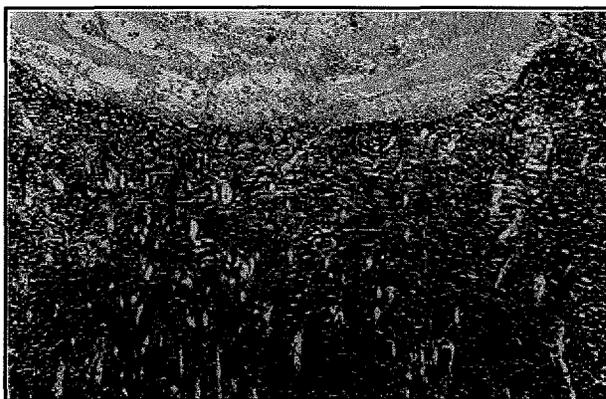


Figura 13.3 - Grupo irradiado (GI)

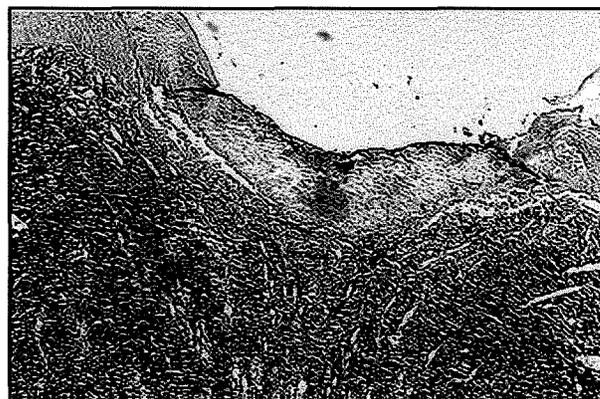


Figura 13.4 - Grupo diabético irradiado (GDI)

PRANCHA 14

21° DIA DE REPARAÇÃO TECIDUAL

EXAME DA BIRREFRINGÊNCIA PELA TÉCNICA DO PICROSIRIUS

Aumento original $6.3 \times 1.25 \times 10$



Figura 14.1 - Grupo controle (GC)

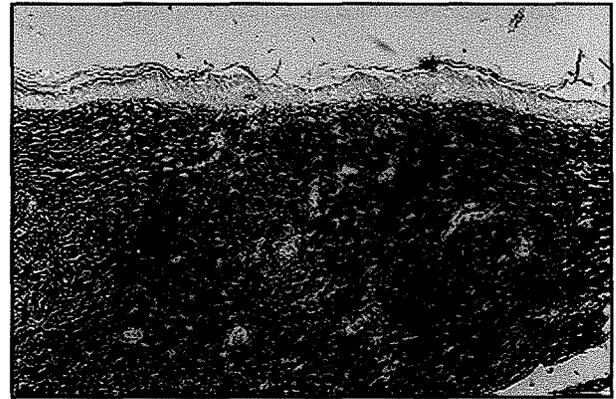


Figura 14.2 - Grupo diabético (GD)

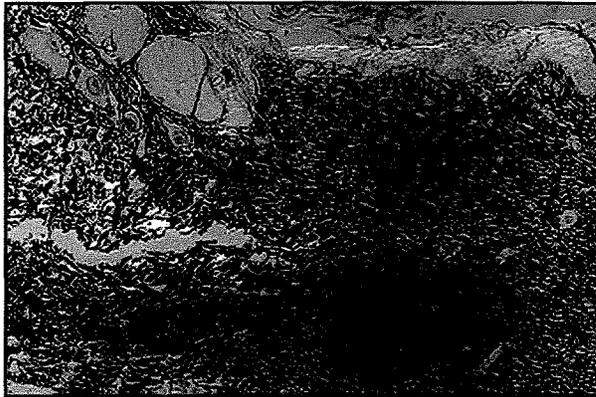


Figura 14.3 - Grupo irradiado (GI)

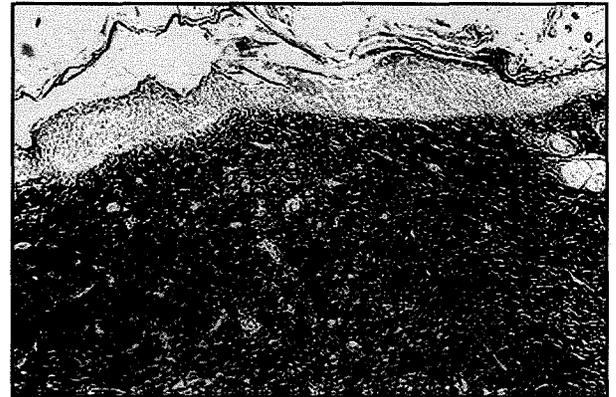


Figura 14.4 - Grupo diabético irradiado (GDI)

PRANCHA 15
4º DIA DE REPARAÇÃO TECIDUAL
EXAME DE DICROÍSMO LINEAR PELA TÉCNICA DO AZUL DE TOLUIDINA
Aumento original 6.3 x 1.25 x 10



Figura 15.1 - Grupo controle (GC)

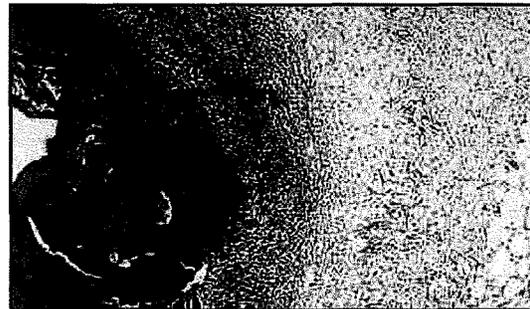


Figura 15.2 - Grupo controle (GC)

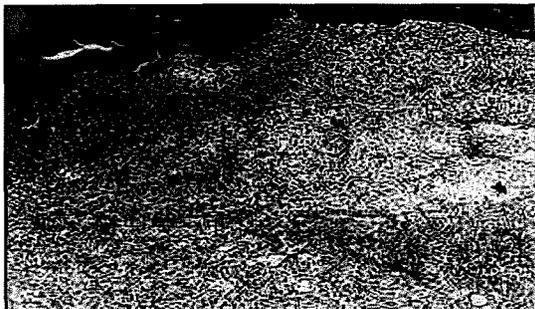


Figura 15.3 - Grupo diabético (GD)



Figura 15.4 - Grupo diabético (GD)

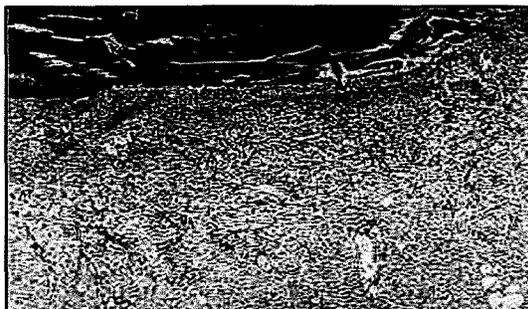


Figura 15.5 - Grupo irradiado (GI)



Figura 15.6 - Grupo irradiado (GI)



Figura 15.7 - Grupo diabético irradiado (GDI)



Figura 15.8 - Grupo diabético irradiado (GDI)

PRANCHA 16
7° DIA DE REPARAÇÃO TECIDUAL
EXAME DE DICROÍSMO LINEAR PELA TÉCNICA DO AZUL DE TOLUIDINA
Aumento original 6.3 x 1.25 x 10

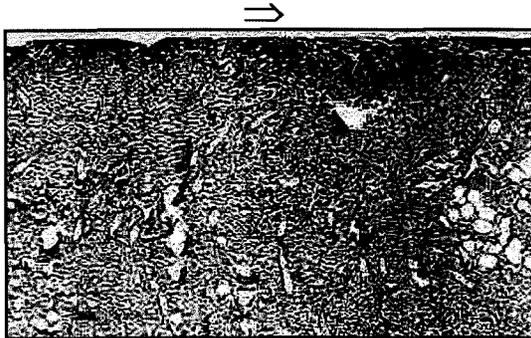


Figura 16.1 - Grupo controle (GC)

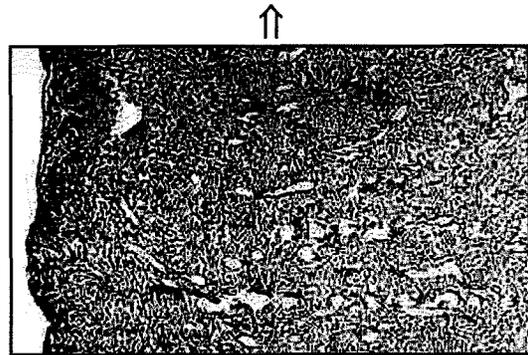


Figura 16.2 - Grupo controle (GC)

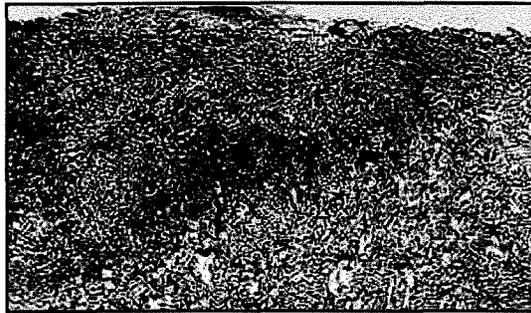


Figura 16.3 - Grupo diabético (GD)



Figura 16.4 - Grupo diabético (GD)



Figura 16.5 - Grupo irradiado (GI)



Figura 16.6 - Grupo irradiado (GI)

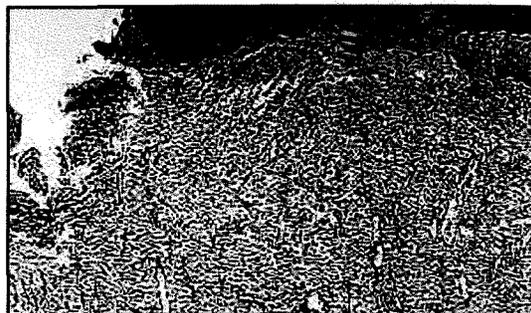


Figura 16.7 - Grupo diabético irradiado (GDI)



Figura 16.8 - Grupo diabético irradiado (GDI)

PRANCHA 17
13º DIA DE REPARAÇÃO TECIDUAL
EXAME DE DICROÍSMO LINEAR PELA TÉCNICA DO AZUL DE TOLUIDINA
Aumento original 6.3 x 1.25 x 10

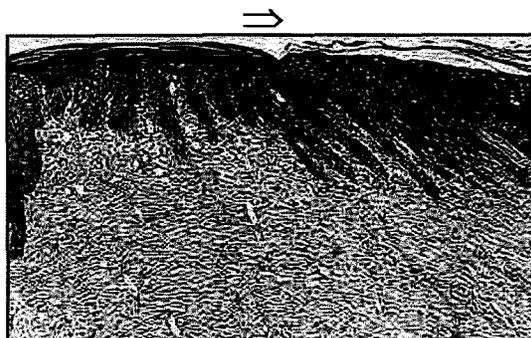


Figura 17.1 - Grupo controle (GC)

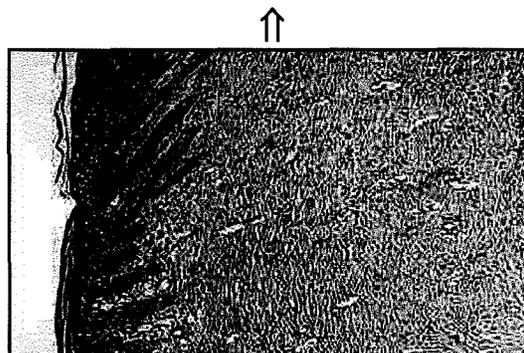


Figura 17.2 - Grupo controle (GC)

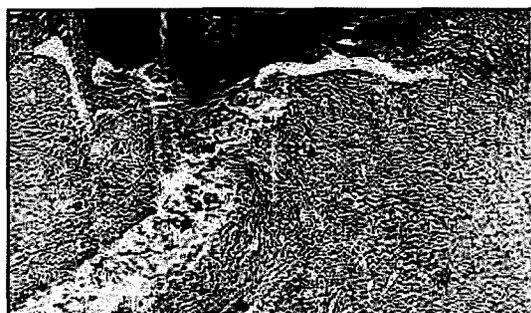


Figura 17.3 - Grupo diabético (GD)

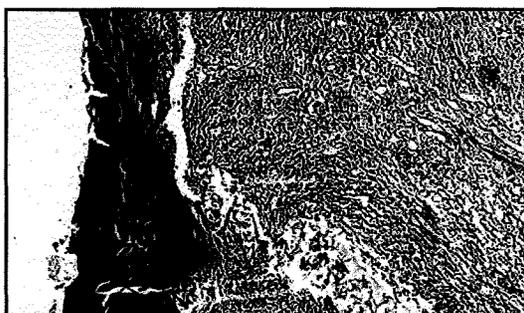


Figura 17.4 - Grupo diabético (GD)



Figura 17.5 - Grupo irradiado (GI)



Figura 17.6 - Grupo irradiado (GI)

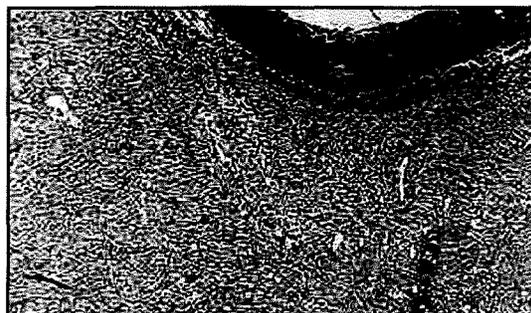


Figura 17.7 - Grupo diabético irradiado (GDI)



Figura 17.8 - Grupo diabético irradiado (GDI)

PRANCHA 18
21º DIA DE REPARAÇÃO TECIDUAL
EXAME DE DICROÍSMO LINEAR PELA TÉCNICA DO AZUL DE TOLUIDINA
Aumento original 6.3 x 1.25 x 10

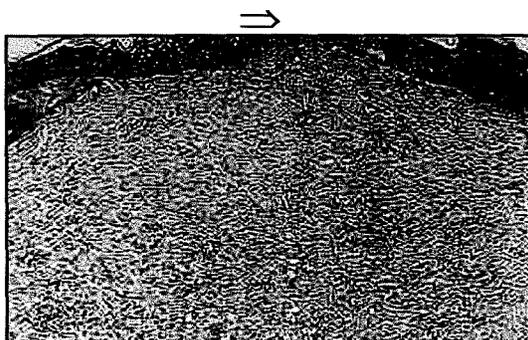


Figura 18.1 - Grupo controle (GC)

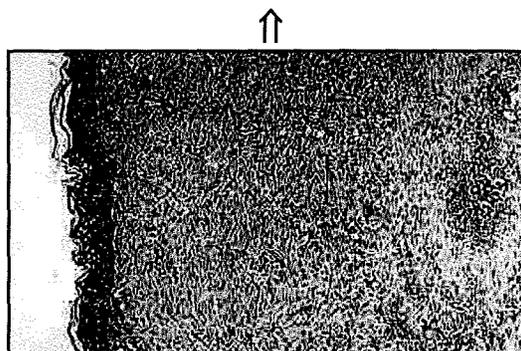


Figura 18.2 - Grupo controle (GC)

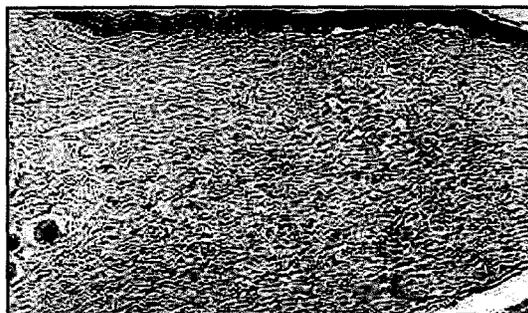


Figura 18.3 - Grupo diabético (GD)



Figura 18.4 - Grupo diabético (GD)

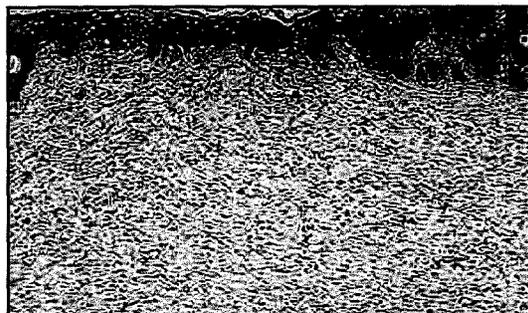


Figura 18.5 - Grupo irradiado (GI)



Figura 18.6 - Grupo irradiado (GI)

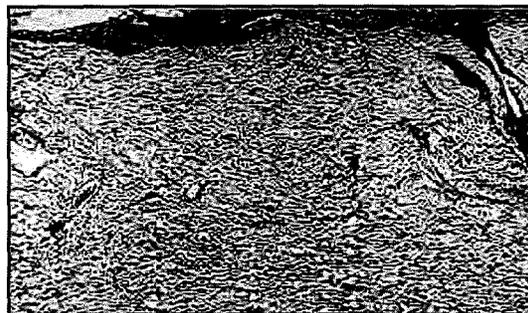


Figura 18.7 - Grupo diabético irradiado (GDI)

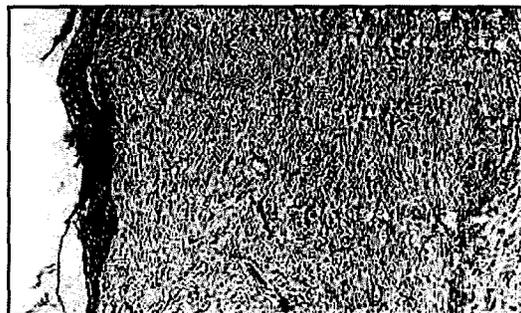


Figura 18.8 - Grupo diabético irradiado (GDI)

DISCUSSÃO

DISCUSSÃO

A reparação tecidual é um processo pelo qual células danificadas são substituídas por células funcionais, às vezes através da regeneração, mas mais freqüentemente, através da cicatrização, restabelecendo assim se não total, pelo menos parcialmente a função do órgão lesado. Entretanto, ela é uma conseqüência de uma série de eventos, no qual fatores extrínsecos e intrínsecos contribuem para acelerar ou retardar o processo.

Quando ocorre uma agressão, o tecido lesado responde com o aumento da permeabilidade das paredes dos vasos sangüíneos, vasodilatação, processos exsudativos e diapedese de elementos celulares, que agem devido a ação fagocitária e mediante a liberação de substâncias que promovem ou contribuem para que o processo de reparação ocorra. Apesar destes fenômenos serem complexos e aparentemente desorganizados, eles estão bem sincronizados, onde um evento se sobrepõe ao início do outro^{3, 13}.

DISCUSSÃO

Dentre os fatores intrínsecos que interferem na reparação tecidual está o diabetes mellitus, que acarreta uma série de alterações em diferentes fases da reparação enquanto a radiação ionizante, que é considerada um fator extrínseco, ao agir sobre a pele promove alterações que podem variar desde um simples eritema, até uma necrose do tecido irradiado.

Para a observação da ação de um fator intrínseco (diabetes) e um fator extrínseco (radiação) em conjunto, sendo que o diabetes é uma doença que acomete uma grande parcela da população e a radiação é muito utilizada no diagnóstico e tratamento de lesões, no presente trabalho utilizou-se animais diabéticos com feridas que sofreram irradiação de elétrons.

Para a irradiação das feridas nesta pesquisa, a radiação de eleição foi o feixe de elétrons, por ser ionizante e sendo assim produzir efeitos biológicos, igualmente como a radiação X. Além disso, diferentemente desta, permite um melhor controle da profundidade de penetração, com pequena ou nenhuma exposição dos tecidos além da profundidade alvo, produzindo ainda uma dose relativamente homogênea e constante na área irradiada^{20, 50}.

A dose de 1 Gy foi usada neste experimento por ser considerada baixa. Isto pode ser justificado pelo fato de que a grande maioria de trabalhos com radiações ionizantes utilizam altas doses. Pouquíssimos trabalhos utilizaram baixas doses, sendo observado por ALMEIDA² (1997) e MONTEIRO³⁵ (1999), que baixas doses de radiação de elétrons retarda o processo de reparação tecidual.

DISCUSSÃO

A escolha de feridas excisionais em ratos, como modelo experimental, foi realizada devido a facilidade de obtenção destes animais e seu pequeno porte, que acaba por facilitar o manuseio e a acomodação. Além disso, segundo observações feitas por HOWES & HARVEY²⁵ (1935) e ROSS & ODLAND⁴¹ (1968), estes animais mostram similaridade nas respostas inflamatórias e na fibrogênese apresentadas no homem.

A grande preocupação dos radiologistas, quanto ao melhor momento para a administração da radiação ionizante, quando precedida por cirurgia, está relacionada à intensa atividade metabólica do tecido em formação que requer suprimento sangüíneo nutricional fornecido pela vascularização.

Optou-se por aguardar 3 dias após a realização da ferida para então irradiar os animais, uma vez que ALMEIDA² (1997) e MONTEIRO³⁵ (1999) em seus experimentos, concluíram que há uma maior influência no processo de reparação se a radiação for ministrada 3 dias após a abertura da ferida, onde segundo as autoras, isso ocorre devido a ferida encontrar-se não mais na fase aguda do processo, mas na fase em que está ocorrendo síntese protéica, característica de processos proliferativos, sendo esta fase de proliferação celular e fibrosa, o período mais crítico em relação aos procedimentos de irradiação.

Quanto a droga de escolha para a indução do diabetes, foi preferido a Estreptozotocina, pois segundo JUNOD *et al.*²⁸ (1967), esta tem uma ação citotóxica específica, rápida e irreversível sobre as células- β pancreáticas, provocando um aumento dos níveis de glicose no sangue em cerca de 1 hora e

DISCUSSÃO

após 10 horas a hiperglicemia torna-se permanente, estando a taxa de insulina abaixo de 5% depois de 24 horas. Um fator muito importante levado em consideração foi o fato de que o limite entre a efetividade da droga e a dose letal é grande, diferente da Aloxana, outra droga diabetogênica, em que o limite é pequeno, ocorrendo reações tóxicas e morte do animal com maior frequência.

Como vimos o diabetes mellitus situa-se entre uma das maiores causas de morte nos países ocidentais, e apesar dos progressos importantes em seu controle clínico, ainda não foi possível controlar de fato suas conseqüências letais.

A maior disponibilidade de glicose nos tecidos determina uma série de alterações e perturbações funcionais que afetam uma grande diversidade de tecidos como a retina, vasos sangüíneos, fibroblastos, tecido renal, entre outros.

As principais alterações provocadas no indivíduo diabético e que comprometem em muito a reparação tecidual são desconhecidas, mas algumas delas são:

- Tendência à lesões vasculares, devido a alterações bioquímicas inúmeras que ocorrem nas membranas basais, incluindo um maior espeçamento difuso, pela maior quantidade e síntese de colágeno tipo IV e redução nas proteoglicanas, ocasionando deste modo insuficiência do suprimento sangüíneo e deficiência de granulócitos circulantes no local da lesão;
- Alteração do metabolismo e conseqüente desequilíbrios metabólicos da célula, com depressão dos fibroblastos;

DISCUSSÃO

- Aumento do gliconeogênese no local da lesão proporcionando material nutritivo para o crescimento bacteriano;
- Formação defeituosa de anticorpos, por motivos ainda não determinados;
- Quimiotaxia deficiente, que além de interferir no processo de inflamação, predispõe a infecção;
- Defeitos funcionais nos neutrófilos, que apresentam quimiotaxia diminuída e capacidade fagocitária reduzida, sendo ineficazes na morte bacteriana intracelular, bem como na fagocitose de células mortas e exsudato, interferindo deste modo na reparação.

Por meio de estudos de tecidos normais irradiados, sabe-se que a radiação ionizante atua como um fator injuriante, portanto, em tecidos que tenham sofrido uma injúria prévia, é de se esperar que a radiação ionizante exerça um efeito prejudicial, no sentido de interferir no processo de reparação tecidual, onde estas observações foram feitas por vários autores^{1, 12, 34, 37, 47, 50, 51}. Entretanto não se sabe qual o efeito da radiação quando existem feridas prévias em indivíduos diabéticos.

Sendo assim, nesta pesquisa, animais diabéticos, que apresentavam tecidos previamente injuriados, foram submetidos à ação da radiação de elétrons no corpo todo, 3 dias após a realização da injúria.

O exame histológico na coloração por hematoxilina-eosina, mostrou que para o grupo controle, a evolução do tecido de granulação procedeu-se, em

DISCUSSÃO

termos de seqüência das etapas, de forma padrão a de um processo de reparação tecidual. Nos primeiros dias de evolução tecidual foi evidente a predominância dos fenômenos exudativos-vasculares, com a presença de uma crosta de tecido necrótico superficial, recobrando tecido edemaciado e com grande quantidade de células polimorfonucleares. A néo formação de feixes de fibras colágenas neste início de evolução do processo de reparo foi quase inexistente, sendo confirmado pelo exame de birrefringência do tecido onde pode-se observar pequeno brilho, e pelo dicroísmo linear onde no 4º dia ainda não havia uma organização macromolecular dos feixes de fibras colágenas. Esta descrição coincide com a divisão de FELIX *et al.*¹³ (1990), onde os autores citaram que nos primeiros quatro dias do processo de reparação, predominam os fenômenos vasculares e também com os achados de ROSS & BENDITT⁴⁰ (1961) que observaram haver nas primeiras 24 horas um rápido aumento no número de elementos representativos da fase aguda, sendo que após o 3º dia, há uma diminuição destes elementos, mas ainda presentes em grande quantidade.

Portanto, no grupo controle, que corresponde ao grupo em que nenhum fator, quer seja no sentido de favorecer, quer seja no sentido de prejudicar o processo de reparação tecidual foi imposto, este processo seguiu um padrão normal e bem definido, com todos os eventos que ocorrem na fase inicial da reparação tecidual.

Para os grupos irradiado e diabético, bem como diabético irradiado, os mesmos aspectos observados no grupo controle foram encontrados, notando-se

DISCUSSÃO

que os fenômenos de necrose tecidual e exsudativo-vasculares foram bastante evidentes, enquanto a néo formação de tecido e de vasos sangüíneos não estiveram presentes. Entretanto, embora ocorrendo os mesmos eventos, pode-se observar um atraso no processo de reparo do grupo diabético irradiado em comparação com os demais grupos, sendo este confirmado tanto no dicróismo linear quanto na birrefringência. Segundo VIBERT⁴⁸ (1983), FELIX *et al.*¹³ (1990) e CECHOWSKA-PASKO *et al.*⁹ (1999), o diabetes interfere no aporte sangüíneo local da lesão, o que pode explicar o retardo em relação ao grupo controle. TENGRUP *et al.*⁴⁵ (1988) citaram que o diabetes prolonga a fase inflamatória do processo de reparo. Esta citação corresponde exatamente ao que foi observado nesta pesquisa. Somada as ações do diabete no processo de reparo, têm-se a radiação, o que levou ao maior retardo no grupo diabético irradiado.

A partir do 7º dia, o grupo controle já mostrou vasos sangüíneos néo formados, com uma certa organização do tecido de granulação, dando início à formação de epitélio, que se completou no 13º dia. Estes achados coincidem com os achados de VIZIOLI⁴⁹ (1971). As observações da birrefringência confirmam a presença de um tecido de granulação mais organizado, apresentando feixes de fibras colágenas mais espessas e em maior quantidade, sendo observado um dicróismo linear do tecido do grupo controle já à partir do 7º dia, onde segundo VIZIOLI⁴⁹ (1971), denota a associação macromolecular entre GAGs e colágenos.

Nos tecidos do grupo irradiado, os achados coincidem com os de WANG *et al.*⁵⁰ (1994), ALMEIDA² (1997) e MONTEIRO³⁵ (1999) onde no 7º dia

DISCUSSÃO

houve um atraso na organização tecidual havendo a presença de menor quantidade de fibroblastos e conseqüentemente atraso na formação dos feixes de fibras colágenas. Apesar de haver a presença de vasos sangüíneos, estes eram em menor quantidade que o grupo normal.

Esta menor quantidade no número de vasos sangüíneos é semelhante aos achados observados por VAN DEN BRENK⁴⁷ (1959), LUCE³² (1984), GUIDUGLI NETO²³ (1987), RUDOLPH *et al.*⁴³ (1988), MILLER & RUDOLPH³⁴ (1990), ALMEIDA² (1997) e MONTEIRO³⁵ (1999), embora alguns destes autores como VAN DEN BRENK⁴⁷ (1959), LUCE³² (1984), RUDOLPH *et al.*⁴³ (1988), MILLER & RUDOLPH³⁴ (1990), por meio de suas observações concluíram que esta menor quantidade de vasos sangüíneos ou a diminuição do aporte sangüíneo para a lesão, não são os únicos responsáveis pelo retardo do processo de reparação, embora contribuam para dificultar a cicatrização, no qual agem conjuntamente com fatores indiretos, como alteração na forma do tecido, índice celular alterado, fibrinogênese e hialinização do estroma.

De qualquer forma, como o retardo no processo de reparação tecidual na presente pesquisa, ocorreu no grupo irradiado, os quais sempre mostraram menor proliferação de vasos sangüíneos néo formados, em relação ao grupo controle, pode-se presumir que os danos causados na proliferação de vasos sangüíneos interferem na reparação, mesmo não sendo o único fator responsável.

No grupo diabético e diabético irradiado, a presença de poucos vasos sangüíneos e a observação do atraso de reparação continuaram evidentes no 7º

DISCUSSÃO

dia, sendo que era de se esperar que os animais do grupo diabético apresentassem uma alteração de reparação, onde nossas observações estão de acordo com TENGRUP *et al.*⁴⁵ (1988) e EHRLICHMAN *et al.*¹² (1991) onde seus estudos demonstraram que a formação do tecido de granulação fica prejudicada, não só pela menor quantidade de colágeno, mas também pela diminuição da vascularização. MORAIN & COLEN³⁶ (1990) demonstraram que em pacientes diabéticos há lesões arteriolares anatômicas que acabam por comprometer a microcirculação.

O processo de reparação tecidual neste experimento progrediu, tanto para o grupo controle, quanto para os demais, embora tenha ocorrido uma organização tecidual mais lenta principalmente no grupo diabético irradiado, onde no 13º dia e 21º dia ainda era evidente o atraso da reparação neste grupo sendo que, aos 21 dias não havia a presença de anexos da pele e o tecido epitelial encontrava-se espesso. Na birrefringência pode-se observar um atraso na organização dos feixes de fibras colágenas que apresentavam-se com menor intensidade de brilho em comparação aos demais, apesar de já apresentarem um dicroísmo linear. Assim sendo, é possível afirmar que para a dose estudada, a radiação de elétrons interferiu retardando, mas não impedindo o processo de reparação tecidual.

Há portanto uma concordância destes achados com os realizados por ALMEIDA² (1997) e MONTEIRO³⁵ (1999), que apesar de não terem utilizado animais diabéticos e terem irradiado somente as feridas, estas encontraram um

DISCUSSÃO

atraso da reparação no grupo irradiado até o 24º dia. Onde pode-se concordar com as autoras quando estas atribuem o retardo na reparação tecidual a uma possível depressão da resposta do exsudato tecidual e células inflamatórias, retardo na migração epitelial, e também possível diminuição de fibroblastos, juntamente com um atraso na formação dos feixes de fibras colágenas, onde no caso do grupo diabético, devido a doença, estes fatores tornam-se mais evidentes, sendo ampliados pela radiação.

Não pode-se deixar de lembrar e discutir o fato de que dentre todas as células que participam do processo de reparo, os fibroblastos, sem dúvida, são os mais importantes, pois são capazes de produzir fibras e matriz extracelular, sendo o processo de reparação tecidual concluído quando o colágeno produzido, atinge sua maturação e restabelece a homeostasia do organismo lesado. Portanto, em feridas irradiadas é extremamente importante verificar a população de fibroblastos de forma a avaliar indiretamente a produção de colágeno, e assim o processo de reparação tecidual.

Na presente pesquisa, a proliferação de fibroblastos mostrou-se bastante diminuída no grupo diabético, entretanto sabe-se que nestes indivíduos a quantidade de fibroblastos está reduzida. O mesmo pode ser observado no grupo irradiado e diabético irradiado, onde desta forma, pode-se supor que o atraso na reparação tecidual pode ter sido também decorrente de danos causados pela radiação a estas células. Sendo assim, algumas considerações devem ser feitas

DISCUSSÃO

em relação ao comportamento e local de origem dos fibroblastos, bem como a interferência exercida pelo diabetes nesta células.

Segundo MACDONALD³³ (1959), GRILLO²¹ (1963), GRILLO²² (1964), ROSS & ODLAND⁴⁰ (1968), ROSS *et al.*⁴² (1970), os fibroblastos não surgem de precursores hematogênicos e sim de células do tecido conjuntivo circundante e subsequente sofrem divisão para formar novos fibroblastos. CATE & FREEMAN⁸ (1974) e UZUNIAN⁴⁶ (1979) acrescentaram que os fibroblastos são importantes na síntese do colágeno, sendo capazes de fagocitar e degradar colágeno, promovendo o remodelamento do tecido conjuntivo.

Estudos realizados por GLICKMAN *et al.*¹⁹ (1967), FRAZEN & NORRBY¹⁶ (1988), DEVLIN *et al.*¹⁰ (1996) e LOOTS *et al.*³¹ (1999) em animais diabéticos permitiram aos autores concluir que o diabetes retarda a reparação pela inibição da fibroplasia, havendo uma diminuída mitose dos fibroblastos, sendo observado por WERINGER & ARQUILLA⁵² (1981) e FRAZEN & ROBERG¹⁷ (1995) que há uma reduzida densidade da superfície das membranas plasmáticas em células diabéticas que acabam por alterar a mobilidade e migração dos fibroblastos interferindo na reparação. Em contrapartida, SPANHEIMER *et al.*⁴⁴ (1988) concluíram que após 2 semanas de indução de diabetes, a produção de colágeno já encontra-se reduzido em cerca de 52% ou seja metade da sua produção, e CATANZARO-GUIMARÃES^{4, 5, 6, 7} (1968) demonstrou que estas fibras colágenas no tecido de granulação apresentam a substância fundamental e fibrilar com um baixo estado de agregação.

DISCUSSÃO

No presente experimento pode-se observar a queda de produção de colágeno e sua desorganização ao analisar o tecido através de sua birrefringência, onde os tecidos diabéticos e diabéticos irradiados apresentaram menor brilho e menor quantidade de feixes de fibras colágenas, apresentando-se bastante atrasados em comparação ao grupo controle, sendo que o grupo diabético irradiado em todos os períodos mostrou-se o mais prejudicado com um brilho sempre menor, apresentando feixes de fibras colágenas em menor quantidade e espessura.

Como a radiação foi administrada no corpo todo do animal, pode-se supor que as células precursoras de fibroblastos ativos, sofreram uma ação direta da radiação de elétrons, bem como em algum fator ativador sistêmico dos fibroblastos. Sendo assim, o atraso observado na reparação tecidual pode ser também decorrente de danos provocados indiretamente nos demais mecanismos presentes na reparação, que resulta em uma menor quantidade de colágeno produzido ou num atraso na maturação desse colágeno. YANASE *et al.*⁵³ (1993), concluíram que a radiação inibe o crescimento de fibroblastos afetando a organização do citoesqueleto constituídos por actina, que também tem seus filamentos alterados.

Vale salientar que os fibroblastos, além de sintetizarem o colágeno, também produzem GAGs. Como a organização de colágeno sob a forma de fibras só ocorre quando as GAGs mais a proteína se combinam, uma alteração na produção de GAGs afetará a organização macromolecular do tecido. Segundo

DISCUSSÃO

CATANZARO-GUIMARÃES^{4, 5, 6, 7} (1968) e CECHOWSKA-PASKO *et al.*⁹ (1999) a deficiência de insulina interfere acentuadamente na biossíntese das GAGs, provocando uma diminuição desta, constituindo tal deficiência um dos principais fatores de retardo da fase fibroblástica, prejudicando a reparação da ferida.

Todavia, é sabido que a formação normal de GAGs no tecido de granulação inicia-se por volta de 2 a 4 dias e segundo VIZIOLI⁴⁹ (1971) há uma associação macromolecular entre as GAGs e colágeno, onde o tecido de granulação alcança a organização final por volta do 18º e 21º dia de evolução. Este resultado pode ser comprovado na presente pesquisa por meio da observação do tecido no dicroísmo linear e na birrefringência, onde o grupo controle já apresentava um intenso brilho (birrefringência) no 4º dia e dicroísmo linear no 7º dia.

Entretanto HUGENBERG *et al.*²⁶ (1989) e ALMEIDA² (1997) após a irradiação das feridas, puderam concluir, que a radiação pode provocar atraso na síntese de GAGs. O que pode ser confirmado em nossa pesquisa, uma vez que já no 7º dia houve um dicroísmo linear do grupo controle, com um atraso no grupo irradiado onde o dicroísmo linear foi observado no 13º dia, sendo evidenciado um maior atraso no grupo diabético e diabético irradiado que somente apresentaram dicroísmo linear no 21º dia.

Com isso pode-se sugerir que o atraso na organização macromolecular observado no grupo irradiado, diabético e diabético irradiado ocorreu devido as alterações provocadas tanto pela radiação quanto pelo diabetes na síntese das

DISCUSSÃO

GAGs, onde esta deficiência foi agravada, quando se administrou irradiação no grupo diabético tendo uma diminuição ainda maior em sua síntese, provocando assim o maior atraso na organização macromolecular.

Em contrapartida, os resultados obtidos neste estudo são contrários aos achados de WATANABE *et al.*⁵¹ (1994) onde estes demonstraram que não houve influência da radiação X na orientação macromolecular dos tecidos irradiados, não havendo alteração na síntese de GAGs, isso talvez pelo fato de terem utilizado radiação X onde não é possível controlar a profundidade de exposição, a dose de irradiação ministrada foi extremamente baixa, em média 0,07 Gy e terem administrado a radiação logo após a produção da ferida.

Segundo ROSS & ODLAND⁴¹ (1968) os leucócitos neutrofílicos na reparação das feridas são os responsáveis pela lise de células e fagocitose, onde os monócitos tem papel significativo na ingestão e digestão de proteínas extracelulares, além é claro da importância dos fibroblastos responsáveis pela síntese e degradação do colágeno durante o remodelamento. Como no diabetes todas estas funções estão inibidas, isso acaba por atrasar o processo de reparação. No caso da irradiação do corpo todo, pode-se supor que a radiação tenha atuado também sobre todas estas células, interferindo ainda mais no processo de reparação. GARDINER *et al.*¹⁸ (1993) sugeriram que há uma relação cinérgica entre diabetes pré existente e radiação ionizante no desenvolvimento de vasculopatia retiniana, o que vem ao encontro dos resultados aqui obtidos.

DISCUSSÃO

Os resultados encontrados nesta pesquisa mostraram que baixas doses de radiação de elétrons quando administrada em corpo todo interfere no processo de reparação tecidual, tanto no grupo normal quanto em diabéticos, sendo os danos potencializados quando da associação diabetes e radiação.

Apesar da maior preocupação de quem utiliza esse tipo de radiação, seja com fins terapêuticos ou diagnóstico, dizer respeito à elevadas doses, deve-se ressaltar contudo que pequenas exposições podem também causar danos que culminarão em complicações futuras, principalmente em pacientes diabéticos, que como pode-se constatar, sofrem ainda mais os efeitos deletérios causados pela irradiação.

Contudo, apesar do futuro oferecer considerável avanço para um melhor entendimento, prevenção e tratamento das complicações provocadas pelo diabetes, praticamente inexistem experimentos sobre o efeito da radiação nestes indivíduos, sendo importante que se realize estudos sobre o assunto de maneira a esclarecer e desvendar os mecanismos da ação da radiação no tecido diabético.

CONCLUSÕES

CONCLUSÕES

*D*os resultados obtidos nesta pesquisa, dentro das condições experimentais utilizadas, pode-se concluir que:

1 - A radiação de elétrons causou um retardo no processo de reparação tecidual, em animais não diabéticos e diabéticos, mas não impediu a evolução do processo.

2 - Quando comparados os dois grupos irradiados, o efeito da radiação de elétrons foi mais marcante no processo de reparação dos animais diabéticos, mostrando que a interação diabetes mais radiação interfere em maior grau no processo de reparação tecidual do que quando os dois fatores ocorrem isoladamente.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

1. ABDALA, C.M. *et al.* Estudo histológico da gênese e evolução do tecido de granulação sob efeito de baixas doses de radiação X. **Rev Fac Odontol Univ Sao Paulo**, São Paulo, v.5, n.2, p.90-95, jul./dez. 1991.
2. ALMEIDA, S.M. **Efeito da radiação de elétrons na reparação tecidual.** Piracicaba, 1997. 103p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas.
3. CARRICO, T.J., MEHRHOF JR., A.I., COHEN, I.K. Biology of wound healing. **Surg Clin North Am**, Philadelphia, v.64, n.4, p.721-733, Aug. 1984.
4. CATANZARO-GUIMARÃES, S.A. Estudo da argirofilia das fibras colágenas após a extração das frações solúveis no tecido de granulação cicatricial em ratos diabéticos aloxânicos. **Estomatol Cult**, Bauru, v.2, n.2, p.29-39, jul./dez. 1968.
5. _____. Estudo histoquímico da fração glicoprotídica no tecido de granulação cicatricial em ratos diabéticos aloxânicos. **Estomatol Cult**, Bauru, v.2, n.1, p.15-25, jan./jun. 1968.

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

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

6. CATANZARO-GUIMARÃES, S.A. Estudo histoquímico dos mucopolissacarídeos ácidos no tecido de granulação cicatricial em ratos diabéticos aloxânicos. **Estomatol Cult**, Bauru, v.2, n.1, p.47-60, jan./jun. 1968.
7. _____. Estudo morfológico do processo de reparação cicatricial em ratos diabéticos aloxânicos. **Estomatol Cult**, Bauru, v.2, n.2, p.41-47, jul./dez. 1968.
8. CATE, A.R., FREEMAN, E. Collagen Remodelling by fibroblasts in wound repair. Preliminary observations. **Anat Rec**, New York, v.179, n.4, p.543-546, Aug. 1974.
9. CECHOWSKA-PASKO, M., PALKA, J., BANKOWSKI, E. Decreased biosynthesis of glycosaminoglycans in the skin of rats with chronic diabetes mellitus. **Exp Toxicol Pathol**, Jena, v.51, n.3, p.239-243, Mar. 1999.
10. DEVLIN, H., GARLAND, H., SLOAN, P. Healing of tooth extraction sockets in experimental diabetes mellitus. **J Oral Maxillofac Surg**, Philadelphia, v.54, n.9, p.1087-1091, Sept. 1996.
11. DOUGLAS, C.R. **Tratado de fisiologia aplicado às ciências da saúde**. São Paulo : Robe Editorial, 1994. p.1204.
12. EHRLICHMAN, R.J. *et al.* Common complications of wound healing. **Surg Clin North Am**, Philadelphia, v.71, n.6, p.1323-1351, Dec. 1991.
13. 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, ago. 1990.
14. FERRAZ, M. *et al.* Sorbitol accumulation in rats kept on diabetic condition for short and prolonged periods. **Acta Pharmacol Sinica**, China, v.18, n.4, p.309-311, July 1997.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

15. FLEURY, H.M. **Avaliação radiográfica dos efeitos interativos da condição diabética e doença periodontal associada à placa bacteriana em ratos Wistar Albinos.** Piracicaba, 1995. 77p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas.
16. FRANZEN, L., NORRBY, K. Mitogenesis in wound-healing cells in diabetic rats. **APMIS**, Copenhagen, v.96, n.6, p.519-524, June 1988.
17. FRANZEN, L.E., ROBERG, K. Impaired connective tissue repair in streptozotocin-induced diabetes slows ultrastructural signs of impaired contraction. **J Surg Res**, San Diego, v.58, n.4, p.407-414, Apr. 1995.
18. GARDINER, T.A., AMOAKU, W.M.K., ARCHER, D.B. The combined effect of diabetes and ionising radiation on the retinal vasculature of the rat current. **Curr Eye Res**, Oxford, v.12, n.11, p.1009-1014, Nov. 1993.
19. GLICKMAN, I., SMULOW, J.B., MOREAU, J. Postsurgical periodontal healing in aloxan diabetes. **J Periodontol**, Chicago, v.38, n.2, p.93-99, Mar./Apr. 1967.
20. GOLDSCHMIDT, H., BRENEMAN, J.C., BRENEMAN, D.L. Ionizing radiation therapy in dermatology. **J Am Acad Dermatol**, Saint Louis, v.30, n.2, p.157-182, Feb. 1994.
21. GRILLO, H.C. Derivation of fibroblasts in the healing wounds. **Arch Surg**, Chicago, v.88, p.218-224, Feb. 1964.
22. _____. Origin of fibroblasts in wound healing: an autoradiographic study of inhibition of cellular proliferation by local x-irradiation. **Ann Surg**, Philadelphia, v.157, n.3, p.453-467, Mar. 1963.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

23. GUIDUGLI NETO, J. The effect of Roentgen radiation on the capillary sprouts and superficial loops of granulation tissue I. Quantitative study of the vascular volume. **Rev Fac Odontol Univ Sao Paulo**, São Paulo, v.1, n.4, p.6-8, out./dez. 1987.
24. GUYTON, A. **Tratado de fisiologia**. 6.ed. Rio de Janeiro : Guanabara, 1986. p.1402.
25. HOWES, E.L., HARVEY, S.C. The clinical significance of experimental studies in wound healing. **Ann Surg**, Philadelphia, v.102, n.5, p.941-946, Nov. 1935.
26. HUGENBERG, S.T., MYERS, S.L., BRANDT, K.D. Suppression of glycosaminoglycan synthesis by articular cartilage, but not of hyaluronic acid synthesis by synivium, after exposure to radiation. **Arthritis Rheum**, Atlanta, v.32, n.4, p.468-474, Apr. 1989.
27. JUNQUEIRA, L.C., CARNEIRO, J. **Histologia básica**. 9.ed. Rio de Janeiro: Guanabara, 1999. p.427.
28. JUNOD, A. *et al.* Studies of the diabetogenic action of streptozotocin. **Proc Soc Exp Biol Med**, New York, v.126, n.6 p.201-205, June 1967.
29. KAMAL, K., POWELL, R.J., SUMPIO, B.E. The pathobiology of diabetes mellitus: implications for surgeons. **J Am Coll Surg**, Chicago, v.183, n.3, p.271-289, Sept. 1996.
30. LISON, L. **Histoquímica et citoquímica animais** : principes et méthodes. Paris : Gauthier-villais, 1960. v.1, p.280.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

31. LOOTS, M.A.M. *et al.* Cultured fibroblasts from chronic diabetic wounds on the lower extremity (non-insulin-dependent diabetes mellitus) show disturbed proliferation. **Arch Dermatol Res**, Berlin, v.291, n.2/3, p.93-99, Feb./Mar. 1999.
32. LUCE, E.A. The irradiated wound. **Surg Clin North Am**, Philadelphia, v.64, n.4, p.821-829, Aug. 1984.
33. MACDONALD, R.A. Origin of fibroblasts in experimental healing wounds: autoradiographic studies using tritiated thymidine. **Surgery**, Saint Louis, v.46, n.2, p.376-382, Aug. 1959.
34. MILLER, S.H., RUDOLPH, R. Healing in the irradiated wound. **Clin Plast Surg**, Philadelphia, v.17, n.3, p.503-508, July 1990.
35. MONTEIRO, S.A.C. **Efeito da irradiação por elétrons em feridas e em tecido de granulação**. Piracicaba, 1999. 99p. Tese (Doutorado) - Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas.
36. MORAIN, W.D., COLEN, L.B. Wound healing in diabetes mellitus. **Clin Plast Surg**, Philadelphia, v.17, n.3, p.493-501, July 1990.
37. POHLE, E.A., RITCHIE, G., MOIR, W.W. Studies of the effect of Roentgen rays on healing of wounds III – Histological changes in skin wounds in rats following postoperative irradiation with very small and moderate doses. **Radiology**, Oak Brook, v.52, n.2, p.707-713, May 1949.
38. RAVELI, D.B. *et al.* Influência da radiação X na cronologia do processo de reparo em feridas de extração dental. Estudo histomorfométrico em ratos. **Rev Fac Odontol Univ São Paulo**, São Paulo, v.4, n.2, p.119-125, abr./jun. 1990.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

39. ROBBINS, S.L., COTRAN, R.S., KUMAR, V. **Patologia estrutural e funcional**. 3.ed. Rio de Janeiro : Guanabara, 1986. p.1404.
40. ROSS, R., BENDITT, E.P. Wound healing and collagen I- Sequential changes in components of guinea pig skin wounds observed in the electron microscope. **J Biophys Biochem Cytol**, New York, v.11, n.3, p.677-700, Mar. 1961.
41. _____, ODLAND, G. Human wound repair II. Inflammatory cells, epithelial mesenchymal interrelations, and fibrogenesis. **J Cell Biol**, New York, v.39, n.1, p.152-168, Oct. 1968.
42. _____, EVERETT, B., TYLER, R. Wound healing and collagen formation VI- The origin of the wound fibroblast studied in parabiosis. **J Cell Biol**, New York, v.44, n.3, p.645-654, Mar. 1970.
43. RUDOLPH, R. *et al.* Slowed growth of cultured fibroblasts from human radiation wounds. **Plast Reconstr Surg**, Baltimore, v.82, n.4, p.669-675, Oct. 1988.
44. SPANHEIMER, R.G., UMPIERREZ, G.E., STUMPF, V. Decreased collagen production in diabetic rats. **Diabetes**, New York, v.37, n.4, p.371-376, Apr. 1988.
45. TENGRUP, I., HALLMANS, G., ÅGREN. M.S. Granulation tissue formation and metabolism of zinc and copper in aloxan-diabetic rats. **Scand J Plast Reconstr Surg**, Stockholm, v.22, n.2, p.41-45, Feb. 1988.
46. UZUNIAN, A. Electron microscopy of collagen resorptin by fibroblasts in wound repair of the albino rat skin. **Rev Bras Pesqui Med Biol**, São Paulo, v.12, n.4/5, p.347-350, ago. 1979.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

47. VAN DEN BRENK, H.A.S. The effect of ionizing radiations on capillary sprouting and vascular remodelling in the regeneration repair blastema observed in the rabbit ear chamber. **Am J Roentgenol**, Springfield, v.81, n.5, p.859-884, May 1959.
48. VIBERT, G.C. Increased capillary permeability in diabetes mellitus and its relationship to microvascular angiopathy. **Am J Med**, New York, v.30, n.11, p.81-84, Nov. 1983.
49. VIZIOLI, M.R. Macromolecular organization of rat sponge-induced granulation tissue as revealed by dichroism. **Acta Anat (Basel)**, Basel, v.80, n.10, p.73-80, Nov. 1971.
50. WANG, Q. *et al.* Electron irradiation slows down wound repair in rat skin: A morphological investigation. **Br J Dermatol**, Oxford, v.130, n.5, p.551-560, May 1994.
51. WATANABE, P.C.A. *et al.* Efeitos de baixas doses de radiação sobre a gênese e evolução do tecido de granulação. **Rev Odontol Univ Sao Paulo**, São Paulo, v.8, n.2, p.137-143, abr./jun. 1994.
52. WERINGER, E.J., ARQUILLA, E.R. Wound healing in normal and diabetic hamsters. **Diabetologia**, New York, v.21, n.4, p.394-401, Oct. 1981.
53. YANASE, A. *et al.* Irradiation effects on wound contraction using a connective tissue model. **Ann Plast Surg**, Boston, v.3, n.5, p.435-440, May 1993.