

RÍVEA INÊS FERREIRA

***EFEITO DA IRRADIAÇÃO LOCAL POR ELÉTRONS
NO PROCESSO DE REPARAÇÃO TECIDUAL,
EM RATOS DIABÉTICOS***

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

Piracicaba

2001

RÍVEA INÊS FERREIRA

**EFEITO DA IRRADIAÇÃO LOCAL POR ELÉTRONS
NO PROCESSO DE REPARAÇÃO TECIDUAL,
EM RATOS DIABÉTICOS**

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

Orientadora: Profa. Dra. Solange Maria de Almeida

Banca Examinadora:

Profa. Dra. Mari Eli Leonelli de Moraes

Profa. Dra. Silvana Pereira Barros

Profa. Dra. Solange Maria de Almeida

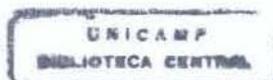
Este exemplar foi devidamente corrigido,
de acordo com a Resolução CCPG-036/83

CPG 22/03/2001


Assinatura do Orientador

**Piracicaba
2001**

iii



547411003

UNIDADE	BC
N.º CHAMADA:	F/UNICAMP
	F413e
V.	Ex.
TOMBO BC/	45200
PROC.	16-392/01
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	07/10/01
N.º CPD	

CM00157751-2

Ficha Catalográfica

F413e	<p>Ferreira, Rívea Inês. Efeito da irradiação local por elétrons no processo de reparação tecidual, em ratos diabéticos. / Rívea Inês Ferreira. -- Piracicaba, SP : [s.n.], 2001. xxii, 144p. : il.</p> <p>Orientador : Profª. Drª. Solange Maria de Almeida. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.</p> <p>1. Radiação ionizante. 2. Diabetes mellitus. 3. Radiobiologia. I. Almeida, Solange Maria. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.</p>
-------	---

Ficha catalográfica elaborada pela 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 20 de Fevereiro de 2001, considerou a candidata RÍVEA INÊS FERREIRA aprovada.

1. Profa. Dra. SOLANGE MARIA DE ALMEIDA

Handwritten signature of Solange Maria de Almeida in black ink, written over a horizontal line.

2. Profa. Dra. MARI ELI LEONELLI DE MORAES

Handwritten signature of Mari Eli Leonelli de Moraes in black ink, written over a horizontal line.

3. Profa. Dra. SILVANA PEREIRA BARROS

Handwritten signature of Silvana Pereira Barros in black ink, written over a horizontal line.

Dedico este trabalho a

meus pais, ARACI e VALTER, que, com abnegação, desprendimento e muito carinho, me mostraram o valor de uma família.

minha irmã SANDRA, mais do que professora, sempre foi uma educadora. Exemplo vivo de um coração que nunca se cansa de ajudar...

meus irmãos, SÉRGIO e RICARDO, com quem aprendi que a perseverança, a força de vontade e o equilíbrio, mesmo nas situações mais hostis, são virtudes indispensáveis àqueles que almejam uma vitória.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

A DEUS, fonte de luz, equilíbrio e esperança nos momentos mais difíceis deste trabalho.

À Profa. Dra. SOLANGE MARIA DE ALMEIDA, não só pela orientação competente desta dissertação, mas, principalmente, por oferecer o estímulo necessário à busca do crescimento e evolução espirituais. Agradeço-lhe, de coração aberto e limpo, todos os ensinamentos acerca do relacionamento humano...

Ao Prof. Dr. FRAB NORBERTO BÓSCOLO, pela confiança depositada no meu trabalho, o que contribuiu imensamente para o meu desenvolvimento profissional. Admiro profundamente este professor que é um verdadeiro MESTRE, não apenas, pura e simplesmente, pelo vasto conhecimento sobre Odontologia, mas também pela capacidade de conjugar educação, gentileza e humildade na transmissão dos ensinamentos.

Ao Prof. Dr. MÁRIO ROBERTO VIZIOLI, pessoa experiente e disciplinada, que transcende as vaidades materiais e direciona sua vida em prol da difusão de seus conhecimentos e ajuda aos seus semelhantes. Meu eterno agradecimento pelo auxílio na realização desta pesquisa.

Ao Prof. Dr. FRANCISCO HAITER NETO, pela transparência com que repassa os ensinamentos e, sobretudo, pelo exemplo de profissionalismo e ética dentro e fora do ambiente acadêmico.

Ao Prof. Dr. AGENOR MONTEBELO FILHO, pela paciência e dedicação com que se dispõe a ensinar, sempre que é solicitado.

AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Odontologia de Piracicaba, nas pessoas de seu Diretor Prof. Dr. **ANTÔNIO WILSON SALLUM** e Diretor Associado Prof. Dr. **FRAB NORBERTO BÓSCOLO**, local que me propiciou crescimento científico e moral.

À Comissão dos Cursos de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, nas pessoas da Profa. Dra. **ALTAIR ANTONINHA DEL BEL CURY**, Coordenadora; Prof. Dr. **LOURENÇO CORRER SOBRINHO**, Coordenador Suplente; Sra. **SÔNIA MARIA LORDELLO ARTHUR**, Secretária Geral; e Srta. **ÉRICA ALESSANDRA PINHO**, Secretária, pela competência e presteza, que são fundamentais ao estabelecimento de cursos de Pós-Graduação bem conceituados e respeitados.

À CAPES, importante órgão de fomento à pesquisa, que substancialmente contribuiu para a execução deste trabalho, concedendo-me a bolsa de estudos.

Ao bioterista Sr. **WANDERLEI FRANCISCO VIEIRA**, do Biotério da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, pela valiosa colaboração no tratamento e manejo dos animais durante toda a fase experimental deste trabalho.

Às disciplinas de **BIOQUÍMICA, FARMACOLOGIA, FISIOLOGIA e PATOLOGIA**, da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, por terem colocado a nossa disposição recursos que facilitaram bastante a parte prática desta dissertação.

Ao físico **JOSÉ RENATO DE OLIVEIRA ROCHA**, do Centro de Engenharia Biomédica da UNICAMP, pela disponibilidade e boa vontade durante a fase de irradiação dos animais.

À Srta. **MARILENE GIRELLO**, bibliotecária da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, pela atenção e paciência que demonstrou na revisão do item referências bibliográficas.

Ao Prof. **DARIO RUBENS DE SOUZA LAMEIRA**, pela rapidez e eficiência na correção ortográfica e gramatical desta dissertação.

À Sra. **IVANI ODAS DEMÉTRIO**, do laboratório de HISTOLOGIA da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, pelo processamento das amostras teciduais e confecção das lâminas histológicas.

Aos amigos **MARCELO GONÇALVES, ANDRÉA GONÇALVES, SOLANGE APARECIDA CALDEIRA MONTEIRO, MÁRCIA REGINA BRUNELLI e SANDRA REGINA DA SILVA**, pela ternura e compreensão que sempre dedicaram a minha pessoa. Estes profissionais exemplares se constituem num referencial de sabedoria, ética e boa educação.

Aos colegas dos cursos de Pós-Graduação na Área de Radiologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, especialmente MARILIANI CHICARELLI e FLÁVIO RICARDO MANZI, pela cooperação no desenvolvimento deste trabalho.

Aos funcionários RAQUEL MARCONDES CÉSAR, GISLAINE LOPES CAMPOS, GISELDA GONÇALVES e WALDECK RIBEIRO, da disciplina de Radiologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, que trabalham, eficientemente, para o bom andamento dos cursos.

A meus professores da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal da Bahia, principais responsáveis pela minha formação de cirurgiã-dentista, especialmente: PAULO SÉRGIO CAMPOS FLORES, JANE LUZIA FREIRE MATOS, EDMAR JOSÉ BORGES DE SANTANA, ANTÔNIO FERNANDO PEREIRA FALCÃO, TELMA MARTINS DE ARAÚJO, SÍLVIA REGINA DE ALMEIDA REIS, IZABEL REGINA FISCHER RUBIRA, VIVIANE ALMEIDA SARMENTO, MARCOS ALAN VIEIRA BITTENCOURT, ALESSANDRA CASTRO ALVES, ELIZABETH MARIA COSTA DE CARVALHO, GISELA ESTELA RAPP, URBINO DA ROCHA TUNES, ELIANE SANTOS SOUZA, IZABEL VIANA, SÍLVIO ALBERGARIA e KÁTIA MARIA GUANAES SILVA. Além do respeito, minha eterna gratidão...

“O importante não é se algo já está feito, mas, que temos infinitas possibilidades de escolha. Nossas escolhas nos levam a experiências que nos fazem compreender que não somos as criaturas pequenas que parecemos ser. Somos expressões interdimensionais da vida, espelhos do espírito.”

Richard Bach

SUMÁRIO

LISTA DE ILUSTRAÇÕES.....	1
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	9
RESUMO.....	11
ABSTRACT.....	13
1. INTRODUÇÃO.....	15
2. REVISTA DA LITERATURA.....	19
2.1 EFEITO DAS RADIAÇÕES IONIZANTES SOBRE A REPARAÇÃO TECIDUAL.....	19
2.2 O PROCESSO DA CICATRIZAÇÃO NO QUADRO CLÍNICO DA DIABETES MELLITUS.....	45
3. PROPOSIÇÃO.....	61
4. METODOLOGIA.....	63
5. RESULTADOS.....	81
6. DISCUSSÃO.....	111
7. CONCLUSÕES.....	129
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	131
APÊNDICE 1.....	141
APÊNDICE 2.....	143

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1:** punção na veia peniana, durante a fase de indução da diabetes mellitus. 78
- Figura 2:** apresentação da GLICO-FITA[®] (Lilly do Brasil). 78
- Figura 3:** área e base da ferida excisional, realizada no dorso dos animais. 79
- Figura 4:** animal posicionado para a irradiação. 79
- Figura 5:** fotomicrografias das amostras teciduais no 4º dia pós-operatório, submetidas à coloração por HE. **A:** animal-controle (*aumento original 2,5 x 1,25 x 10*); **B:** animal-controle (*aumento original 6,3 x 1,25 x 10*); **C:** animal normal irradiado (*aumento original 2,5 x 1,25 x 10*); **D:** animal normal irradiado (*aumento original 6,3 x 1,25 x 10*). 93
- Figura 6:** fotomicrografias das amostras teciduais no 4º dia pós-

operatório, submetidas à coloração por HE. **A:** animal diabético (*aumento original 2,5 x 1,25 x 10*); **B:** animal diabético (*aumento original 6,3 x 1,25 x 10*); **C:** animal diabético irradiado (*aumento original 2,5 x 1,25 x 10*); **D:** animal diabético irradiado (*aumento original 6,3 x 1,25 x 10*).

94

Figura 7: fotomicrografias das amostras teciduais no 7º dia pós-operatório, submetidas à coloração por HE. **A:** animal-controle (*aumento original 2,5 x 1,25 x 10*); **B:** animal-controle (*aumento original 6,3 x 1,25 x 10*); **C:** animal normal irradiado (*aumento original 2,5 x 1,25 x 10*); **D:** animal normal irradiado (*aumento original 6,3 x 1,25 x 10*).

95

Figura 8: fotomicrografias das amostras teciduais no 7º dia pós-operatório, submetidas à coloração por HE. **A:** animal diabético (*aumento original 2,5 x 1,25 x 10*); **B:** animal diabético (*aumento original 6,3 x 1,25 x 10*); **C:** animal diabético irradiado (*aumento original 2,5 x 1,25 x 10*); **D:** animal diabético irradiado (*aumento original 6,3 x 1,25 x 10*).

96

Figura 9: fotomicrografias das amostras teciduais no 13º dia pós-operatório, submetidas à coloração por HE. **A:** animal-

controle (*aumento original 2,5 x 1,25 x 10*); **B**: animal-controle (*aumento original 6,3 x 1,25 x 10*); **C**: animal normal irradiado (*aumento original 2,5 x 1,25 x 10*); **D**: animal normal irradiado (*aumento original 6,3 x 1,25 x 10*).

97

Figura 10: fotomicrografias das amostras teciduais no 13º dia pós-operatório, submetidas à coloração por HE. **A**: animal diabético (*aumento original 2,5 x 1,25 x 10*); **B**: animal diabético (*aumento original 6,3 x 1,25 x 10*); **C**: animal diabético irradiado (*aumento original 2,5 x 1,25 x 10*); **D**: animal diabético irradiado (*aumento original 6,3 x 1,25 x 10*).

98

Figura 11: fotomicrografias das amostras teciduais no 21º dia pós-operatório, submetidas à coloração por HE. **A**: animal-controle (*aumento original 2,5 x 1,25 x 10*); **B**: animal-controle (*aumento original 6,3 x 1,25 x 10*); **C**: animal normal irradiado (*aumento original 2,5 x 1,25 x 10*); **D**: animal normal irradiado (*aumento original 6,3 x 1,25 x 10*).

99

Figura 12: fotomicrografias das amostras teciduais no 21º dia pós-operatório, submetidas à coloração por HE. **A**: animal diabético (*aumento original 2,5 x 1,25 x 10*); **B**: animal

diabético (*aumento original 6,3 x 1,25 x 10*); **C**: animal diabético irradiado (*aumento original 2,5 x 1,25 x 10*); **D**: animal diabético irradiado (*aumento original 6,3 x 1,25 x 10*). 100

Figura 13: fotomicrografias das amostras teciduais no 4º dia pós-operatório, submetidas à coloração por picrosirius. **A**: animal-controle; **B**: animal normal irradiado; **C**: animal diabético; **D**: animal diabético irradiado. *Aumento original 6,3 x 1,25 x 10*. 101

Figura 14: fotomicrografias das amostras teciduais no 7º dia pós-operatório, submetidas à coloração por picrosirius. **A**: animal-controle; **B**: animal normal irradiado; **C**: animal diabético; **D**: animal diabético irradiado. *Aumento original 6,3 x 1,25 x 10*. 102

Figura 15: fotomicrografias das amostras teciduais no 13º dia pós-operatório, submetidas à coloração por picrosirius. **A**: animal-controle; **B**: animal normal irradiado; **C**: animal diabético; **D**: animal diabético irradiado. *Aumento original 6,3 x 1,25 x 10*. 103

Figura 16: fotomicrografias das amostras teciduais no 21º dia pós-operatório, submetidas à coloração por picrosirius. **A**: animal-controle; **B**: animal normal irradiado; **C**: animal

diabético; **D**: animal diabético irradiado. *Aumento original*
6,3 x 1,25 x 10.

104

Figura 17: fotomicrografias das amostras teciduais no 4º dia pós-operatório, submetidas à reação histoquímica com o azul de toluidina. **A:** animal-controle (⇨, paralela ao plano de polarização da luz); **B:** animal-controle (⇩, perpendicular ao plano de polarização da luz); **C:** animal normal irradiado (⇨, paralela ao plano de polarização da luz); **D:** animal normal irradiado (⇩, perpendicular ao plano de polarização da luz). *Aumento original 6,3 x 1,25 x 10.*

105

Figura 18: fotomicrografias das amostras teciduais no 4º dia pós-operatório, submetidas à reação histoquímica com o azul de toluidina. **A:** animal diabético (⇨, paralela ao plano de polarização da luz); **B:** animal diabético (⇩, perpendicular ao plano de polarização da luz); **C:** animal diabético irradiado (⇨, paralela ao plano de polarização da luz); **D:** animal diabético irradiado (⇩, perpendicular ao plano de polarização da luz). *Aumento original 6,3 x 1,25 x 10.*

105

Figura 19: fotomicrografias das amostras teciduais no 7º dia pós-operatório, submetidas à reação histoquímica com o azul de toluidina. **A:** animal-controle (⇨, paralela ao plano de

polarização da luz); **B**: animal-controle (\downarrow , perpendicular ao plano de polarização da luz); **C**: animal normal irradiado (\rightarrow , paralela ao plano de polarização da luz); **D**: animal normal irradiado (\downarrow , perpendicular ao plano de polarização da luz). *Aumento original 6,3 x 1,25 x 10.*

106

Figura 20: fotomicrografias das amostras teciduais no 7º dia pós-operatório, submetidas à reação histoquímica com o azul de toluidina. **A**: animal diabético (\rightarrow , paralela ao plano de polarização da luz); **B**: animal diabético (\downarrow , perpendicular ao plano de polarização da luz); **C**: animal diabético irradiado (\rightarrow , paralela ao plano de polarização da luz); **D**: animal diabético irradiado (\downarrow , perpendicular ao plano de polarização da luz). *Aumento original 6,3 x 1,25 x 10.*

106

Figura 21: fotomicrografias das amostras teciduais no 13º dia pós-operatório, submetidas à reação histoquímica com o azul de toluidina. **A**: animal-controle (\rightarrow , paralela ao plano de polarização da luz); **B**: animal-controle (\downarrow , perpendicular ao plano de polarização da luz); **C**: animal normal irradiado (\rightarrow , paralela ao plano de polarização da luz); **D**: animal normal irradiado (\downarrow , perpendicular ao plano de polarização da luz). *Aumento original 6,3 x 1,25 x 10.*

107

Figura 22: fotomicrografias das amostras teciduais no 13º dia pós-operatório, submetidas à reação histoquímica com o azul de toluidina. **A:** animal diabético (↔, paralela ao plano de polarização da luz); **B:** animal diabético (↕, perpendicular ao plano de polarização da luz); **C:** animal diabético irradiado (↔, paralela ao plano de polarização da luz); **D:** animal diabético irradiado (↕, perpendicular ao plano de polarização da luz). *Aumento original 6,3 x 1,25 x 10.*

107

Figura 23: fotomicrografias das amostras teciduais no 21º dia pós-operatório, submetidas à reação histoquímica com o azul de toluidina. **A:** animal-controle (↔, paralela ao plano de polarização da luz); **B:** animal-controle (↕, perpendicular ao plano de polarização da luz); **C:** animal normal irradiado (↔, paralela ao plano de polarização da luz); **D:** animal normal irradiado (↕, perpendicular ao plano de polarização da luz). *Aumento original 6,3 x 1,25 x 10.*

108

Figura 24: fotomicrografias das amostras teciduais no 21º dia pós-operatório, submetidas à reação histoquímica com o azul de toluidina. **A:** animal diabético (↔, paralela ao plano de polarização da luz); **B:** animal diabético (↕, perpendicular ao plano de polarização da luz); **C:** animal

diabético irradiado (\Rightarrow , paralela ao plano de polarização da luz); **D**: animal diabético irradiado (\Downarrow , perpendicular ao plano de polarização da luz). *Aumento original 6,3 x 1,25 x 10.*

108

Figura 25: aspecto macroscópico das feridas no 4º dia pós-operatório. **A:** animal-controle; **B:** animal normal irradiado; **C:** animal diabético; **D:** animal diabético irradiado.

109

Figura 26: aspecto macroscópico das feridas no 21º dia pós-operatório. **A:** animal-controle; **B:** animal normal irradiado; **C:** animal diabético; **D:** animal diabético irradiado.

109

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

cGy:	centésimo de Gray
DMID:	diabetes mellitus insulino-dependente
DMNID:	diabetes mellitus não insulino-dependente
DNA:	ácido desoxirribonucleico
GAGs:	glicosaminoglicanas
Gy:	Gray
HE:	hematoxilina-eosina
IL-1 β :	interleucina-1 β
kVp:	quilovoltagem-pico
LET:	transferência linear de energia

MeV: mega-elétron-volt

PVC: policlorovinil

R: Röntgen

rad: *radiation absorbed dose*

RNA: ácido ribonucleico

SPF: livre de patógenos específicos

Sv: Sievert

SZ: estreptozotocina

TNF- α : fator de necrose tumoral- α

RESUMO

As radiações ionizantes e certos estados patológicos, como a diabetes mellitus, determinam alterações nos fenômenos biológicos do reparo tecidual. O presente trabalho experimental teve por finalidade pesquisar o efeito da irradiação por elétrons sobre os componentes do tecido de granulação, na pele de ratos diabéticos. Para tanto, 48 ratos da linhagem Wistar foram separados em 4 grupos: animais-controle, animais normais irradiados, animais diabéticos e animais diabéticos irradiados. Inicialmente, o estado diabético foi induzido por meio da administração intravenosa de estreptozotocina. Após 15 dias da indução, todos os animais foram submetidos a um ato cirúrgico para a realização de uma ferida excisional, na região dorsal anterior. No 3º dia pós-operatório, apenas uma área que compreendia cerca de 1cm, lateralmente a cada margem do ferimento, foi irradiada com uma dose única de 1,0Gy, por feixes de elétrons com 6MeV de energia. A reparação tecidual foi estudada aos 4, 7, 13 e 21 dias que sucederam a cirurgia, por microscopias ópticas comum e de polarização.

Empregou-se as técnicas de coloração por hematoxilina-eosina, visando à observação das características morfológicas do tecido de granulação, e, picrosirius, com a finalidade de identificar e avaliar a maturação do colágeno neoformado. Para a detecção do dicróismo linear, que se relaciona à organização macromolecular dos feixes de fibras colágenas, uma parte das amostras teciduais foi submetida à reação histoquímica com o azul de toluidina a 0,025%, em pH 4,0. A avaliação, essencialmente qualitativa, das amostras teciduais permitiu concluir-se que: 1. A irradiação local causou um retardo na cicatrização, por atrasar os eventos proliferativos. Contudo, não impediu que o processo de reparo culminasse na restauração tecidual; 2. Os desequilíbrios metabólicos inerentes à diabetes atuaram em sinergismo com a irradiação no retardo da reparação tecidual, não somente por adiarem a fase proliferativa, mas também por condicionarem a persistência da fase inflamatória; 3. A irradiação e o estado diabético ocasionaram uma redução no conteúdo de colágeno, do tecido de granulação, que foi mais acentuada para os animais diabéticos irradiados.

Palavras-chave: radiação ionizante; reparação tecidual; diabetes mellitus; radiobiologia.

ABSTRACT

Ionizing radiations and certain pathologic states, such as diabetes mellitus, have major impact on the biologic phenomena of tissue repair. The aim of the present experimental research was to investigate the effect of electron irradiation on skin granulation tissue components, in diabetic rats. In this study, 48 Wistar rats were divided into 4 groups: control animals; normal irradiated animals; diabetic animals and diabetic irradiated animals. First, diabetes mellitus was induced, in the last two groups, by a single intravenous injection of streptozotocin. Fifteen days later, all the animals underwent a surgery in order to make an excisional wound in the anterior dorsal skin. On the third day post-operation, only an area approximately 1cm wide around the wounds was exposed to 1Gy of 6MeV electron beam radiation, delivered in a single dose. Wound healing was examined at 4, 7, 13, and 21 day time intervals after wounding by ordinary and polarized light microscopies. Hematoxylin and eosin staining was used for the study of morphological aspects of the newly formed granulation tissue. For specific

identification and evaluation of collagen maturation, some tissue sections were stained with picosirius red. In order to detect the linear dichroism, that is related to the macromolecular organization of collagen fibers, other tissue sections were stained with 0.025% toluidine-blue aqueous solution, at pH 4.0. Based upon the essentially qualitative evaluation of granulation tissue, it was possible to conclude that: 1. Local irradiation caused a delay in wound healing, as a consequence of the retardation in the proliferative events. However, all the wounds ultimately have closed; 2. Diabetes associated dysfunctions and electron irradiation acted synergistically in delaying tissue repair, not only by postponing proliferative phase, but also by prolonging inflammatory phase; 3. Irradiation and diabetic state determined a decrease in collagen content, in the granulation tissue, which was more pronounced in diabetic irradiated animals.

Key words: ionizing radiation; wound healing; diabetes mellitus; radiobiology.

1. INTRODUÇÃO

A utilização das radiações ionizantes com finalidade de diagnóstico ou terapêutica, por mais benefícios que venha trazer, pode implicar em significantes danos biológicos passíveis de serem agravados a depender do estado geral de saúde do paciente. Esta constatação tem motivado o desenvolvimento de pesquisas que visam a avaliar o efeito dessas radiações em situações de distúrbios crônico-degenerativos ou metabólicos ^{5, 28, 30}.

Entendendo as radiações como um fenômeno de transmissão de energia através do espaço e da matéria, é aceito que estão separadas em dois grandes grupos: as radiações eletromagnéticas, como os raios X e ultravioleta, e as partículas ou corpusculares, por exemplo os raios alfa. A emissão de elétrons também é uma forma de radiação corpuscular que apresenta menor poder de penetração, se comparada a fótons de raios X de mesma energia. Em radioterapia, os feixes de elétrons são muito úteis para o tratamento de lesões superficiais ou de profundidade média ^{2, 7, 27, 30, 46, 50, 66}.

Os efeitos das radiações ionizantes sobre os tecidos vivos podem ser considerados diretos ou indiretos. Serão diretos, se a ação deletéria recair diretamente nas biomoléculas, levando as células a alterações morfológicas e funcionais, e, às vezes, até à morte. Os efeitos indiretos ocorrem sempre que as biomoléculas são alteradas por reações com radicais livres decorrentes da ação inicial da radiação, sendo que as células também sofrem as conseqüências da formação de substâncias incompatíveis com a sua fisiologia. Ambos os tipos de radiação ionizante produzem grandes quantidades de radicais livres, contudo, é importante distinguir-se a maneira como se processam as ionizações. A radiação X, ao interagir com a matéria, tem sua energia transmitida por meio das ionizações promovidas pelas partículas carregadas, que são geradas a partir da radiação primária. Por outro lado, o feixe de elétrons é considerado uma forma de radiação diretamente ionizante, uma vez que suas partículas determinam ionizações ao perder energia ².

A lei de Bergonié e Tribondeau, estabelecida em 1906, determina uma relação diretamente proporcional entre a radiosensibilidade celular e a capacidade mitótica, ocorrendo o inverso quanto ao grau de diferenciação das células envolvidas. Desse modo, se uma avaliação minuciosa do comprometimento de tecidos íntegros tem sido difícil após as irradiações, devido ao menor índice mitótico dos mesmos, o estudo da interação matéria-energia no processo de reparo tecidual pode mostrar-se satisfatório, tendo em vista que a

reparação compreende uma série multifacetada de alterações celulares metabólicas e proliferativas.

A reparação tecidual ocorre às expensas de uma interação complexa de eventos fisiológicos, bioquímicos e mecânicos. À luz do conhecimento atual, pode-se descrever o processo de reparo dividindo-o nas seguintes fases: hemostasia; inflamação; proliferação; epitelização e remodelamento^{10, 16, 19, 22, 44, 65}. Aos fenômenos que visam à hemostasia, seguem-se as modificações vasculares caracterizadas por dilatação e aumento da permeabilidade, elevação do fluxo sanguíneo, exsudação plasmática e diapedese. Durante as fases proliferativa e de epitelização, ocorre intensa angiogênese, aparecem os fibroblastos, tem início a biossíntese de colágeno no tecido de granulação e a ferida é recoberta por epitélio. Na fase de remodelamento, há uma queda na produção de substância fundamental, os feixes de fibras colágenas aumentam em tamanho, conferindo maior resistência tênsil ao sítio da ferida, os capilares se organizam e os fibroblastos diminuem em número^{10, 16, 19}.

Os fibroblastos são células essenciais à reparação tecidual, pois relacionam-se à síntese de colágeno e substância fundamental, representada pelas glicosaminoglicanas, proteoglicanas e glicoproteínas. A contração de feridas tem sido atribuída à atividade fibroblástica^{16, 34, 66}. Fibroblastos ricos em actina, os miofibroblastos, se alinham ao longo das margens do ferimento, gerando uma tensão sincronizada que resulta na oclusão do mesmo¹⁶. Em se tratando dos agentes que interferem na cicatrização, diversas investigações científicas

comprovaram o efeito inibitório direto das radiações ionizantes sobre a proliferação dos fibroblastos ^{7, 21, 30, 31, 33, 57, 66}, o que contribui para um atraso no processo de reparo.

A diabetes mellitus, uma desordem de homeostasia da glicose, também tem sido associada clínica e experimentalmente à reparação anormal de feridas ^{11-14, 18, 24, 25, 41, 61}. Constataram-se alterações nas funções dos leucócitos polimorfonucleares e macrófagos, no metabolismo do colágeno e das glicosaminoglicanas, na taxa de endotelização, na espessura do revestimento capilar e na quantidade de tecido de granulação neo-sintetizado ^{15, 18, 70}. A produção das fibrilas colágenas é inibida em estados hiperglicêmicos que fazem parte do quadro clínico da diabetes mellitus ^{18, 59, 61}. Em adição, o decréscimo na quantidade de ligações cruzadas das fibrilas as torna mais susceptíveis à lise pela colagenase ¹⁸.

Embora as conseqüências prejudiciais do emprego das radiações ionizantes durante o processo de reparo tecidual e a influência desfavorável da diabetes mellitus sobre os eventos da cicatrização tenham sido tema de vários estudos, sabe-se muito pouco acerca dos efeitos combinados da irradiação por elétrons e desta síndrome metabólica. Portanto, seria de grande importância no campo da radiobiologia, ciência da radiologia que é comum às especialidades médica e odontológica, a execução de um trabalho experimental correlacionando a ação de uma baixa dose da radiação de elétrons ao estado fisio-patológico da diabetes mellitus, no transcurso da reparação tecidual, na pele.

2. REVISTA DA LITERATURA

2.1 EFEITO DAS RADIAÇÕES IONIZANTES SOBRE A REPARAÇÃO TECIDUAL

POHLE *et al.*⁵⁴, em 1931, iniciaram um estudo sistemático com o objetivo de verificar a ação de raios X, com diferentes comprimentos de onda, sobre a reparação de feridas produzidas pré e pós-irradiação na pele de ratos. O grupo de animais que receberam a irradiação pré-operatória foi separado de forma que uma parte dos integrantes teve duas porções da pele expostas a 1.000R produzidos com 100kVp; e a outra parte fora similarmente irradiada com a mesma dose de raios X produzidos com 140kVp, sendo os respectivos comprimentos de onda equivalentes a 0,34 e 0,18Å. Nesse grupo, as incisões foram realizadas 1, 3, 7, 10, 14, 21 e 30 dias após a irradiação. No grupo que recebeu a irradiação pós-operatória, a área da pele englobando as incisões foi exposta aos raios X imediatamente, 24 e 48 horas após a cirurgia. A

partir de observações macro e microscópicas, os autores concluíram que a irradiação pré-operatória não influenciou a reparação tecidual. Por outro lado, a exposição pós-operatória retardou o processo de reparo, particularmente no subgrupo de 24 horas. Além disso, não foi constatada uma influência definida do comprimento de onda dos raios X sobre a cicatrização das incisões.

Em 1949, POHLE *et al.*⁵³ desenvolveram uma pesquisa a fim de estudar o efeito de baixas doses de radiação X no reparo tecidual. Nesse experimento, ratos foram submetidos a uma incisão na linha média dorsal e, então, divididos em 3 grupos. Os animais do grupo 1 tiveram metade da extensão de suas incisões irradiada com doses de 150, 350 e 700R, imediatamente após o ato cirúrgico. O grupo 2 era composto por ratos subdivididos equitativamente de modo a receberem doses de 150, 300 e 700R, em uma extensão de 2cm nas suas incisões, imediatamente e 24 horas após a cirurgia. O sacrifício desses animais ocorreu aos 3, 5 e 7 dias do ferimento. No grupo 3, os animais foram expostos a 10 e 25R na metade caudal de suas feridas. O ato da irradiação foi planejado de acordo com o ocorrido no grupo 2, entretanto, o sacrifício se deu aos 3 e 5 dias pós-operatórios. Além do estudo macroscópico diário, as amostras teciduais dos grupos 2 e 3 foram avaliadas microscopicamente. Esses autores concluíram que, macroscopicamente, não houve diferença significativa no processo de reparação ao longo dos ferimentos. Histologicamente, não se detectou qualquer indício de um suposto efeito estimulante da radiação X, mesmo nas incisões que receberam

as doses mais baixas, contrariando o que havia sido sugerido por alguns pesquisadores anteriormente.

Segundo VAN DEN BRENK ⁶³, em 1959, a regeneração de pequenos vasos sangüíneos é um aspecto fundamental da reparação tecidual que se segue a injúrias. Assim, visando a avaliar a influência das radiações X e gama sobre os fenômenos de remodelamento e regeneração vasculares, esse pesquisador desenvolveu um trabalho experimental *in vivo*. Pequenas câmaras foram implantadas nas orelhas de coelhos, objetivando induzir a formação de tecido de granulação, e, após 7 a 10 dias do aparecimento inicial do referido tecido, os animais foram separados de modo que doses únicas, variando de 200 a 5.000R, foram aplicadas às câmaras. Por meio da avaliação microscópica, constatou-se que uma dose única de raios X ou gama menor que 400R não determinou alterações observáveis no crescimento de brotos capilares. Contudo, doses variando de 400 a 2.000R causaram considerável dano imediato aos brotos. As doses que excederam o intervalo limiar ocasionaram a parada completa do crescimento dos brotos capilares, com graus variados de destruição do tecido de reparo, formado previamente à irradiação.

Dando continuidade aos estudos sobre a contração de feridas, GRILLO & POTSAID ³⁴ (1961) pesquisaram o efeito da radiação X sobre os componentes do tecido neo-formado nas margens de feridas. Nesse trabalho, porquinhos da Índia foram distribuídos em grupos de modo a receberem uma dose única de 750R

de radiação X um dia antes, imediatamente, 12, 24 e 36 horas; 2, 3, 4, 5 e 7 dias após um ato cirúrgico, para a produção de feridas excisionais na pele, em ambos os lados do tronco. A irradiação compreendeu somente uma área da pele, localizada no lado direito, que continha a porção central e as margens das feridas. Em um outro grupo, os animais sofreram dois ferimentos no lado direito e foram divididos em 3 subgrupos: um subgrupo, tratado igualmente àqueles porquinhos feridos em ambos os lados; e outros 2 subgrupos, que foram similarmente irradiados 36 horas após a cirurgia, no ferimento mais anterior e mais posterior, respectivamente. Nos dois grupos supracitados, estudou-se a contração das feridas por meio da planimetria. Verificou-se um pico de retardo máximo, na contração dos ferimentos, em animais irradiados 36 horas após a cirurgia. Efeitos relativamente menos danosos foram observados nos grupos irradiados 24 horas antes ou de 5 a 7 dias após o ato cirúrgico. Dessa forma, os pesquisadores concluíram que doses moderadas de radiação X podem retardar significativamente a contração das feridas sem, entretanto, inibir este processo.

Em 1963, GRILLO ³³ avaliou quantitativamente a proliferação de fibroblastos. Para tanto, porquinhos da Índia foram submetidos a um ato cirúrgico para a produção de 2 feridas excisionais, no lado esquerdo do tronco. Parte desses animais recebeu uma dose única de 750R de raios X no ferimento mais anterior. Os 3 intervalos de exposição foram: 20 minutos antes, 20 minutos e 28 horas após a cirurgia. O estudo da reparação tecidual se deu por meio da avaliação histológica, 20 minutos, 6, 18 e 28 horas após o ato cirúrgico em

animais irradiados 20 minutos antes da cirurgia e não irradiados e, às 6, 18 e 28 horas pós-operatórias, em animais que foram irradiados aos 20 minutos do término da cirurgia. Cinco dias após o procedimento cirúrgico, integrantes de todos os grupos da pesquisa receberam uma injeção de timidina tritiada, para que se realizassem radioautografias. A timidina radioativa é incorporada especificamente no DNA replicado. As radioautografias mostraram que numerosas células endoteliais, identificadas como paredes capilares em formação, foram marcadas pela timidina tritiada. Este achado contrastou com a inatividade das paredes capilares no tecido conjuntivo preexistente, além das margens das feridas, e em secções de tecido normal. Os autores constataram que houve uma redução significativa na proliferação de fibroblastos e células endoteliais, devida à irradiação pós-operatória. Em adição, foi possível concluir que o efeito da radiação sobre a proliferação fibroblástica resultou de influências exercidas em células residentes no tecido conjuntivo adjacente à ferida.

BACCHETTI & SINCLAIR ³, em 1971, desenvolveram um experimento para estudar a ação dos raios X sobre a síntese de DNA, RNA e proteínas em células de hamsteres irradiadas em fases distintas do ciclo mitótico. Para tanto, as culturas celulares receberam uma dose única de raios X equivalente a 710rad. Os processos de síntese macromolecular, nas populações celulares controle e experimental, foram monitorados por meio de radioautografias com a utilização dos seguintes traçadores: timidina, uridina e leucina marcadas com trítio. Verificou-se que as células irradiadas na fase S do ciclo mitótico pareciam

sintetizar uma quantidade normal de DNA, embora o fizessem com uma cinética diferenciada em relação às células-controle. Por outro lado, as células expostas à radiação X nas fases G_1 e G_2 foram levemente estimuladas e retardadas no início da síntese de DNA, respectivamente. Sob essas condições experimentais, não houve indícios de que uma quantidade anormal de DNA tivesse sido produzida. No que concerne à síntese de RNA e proteínas, constatou-se que as células irradiadas, em quaisquer das fases do ciclo mitótico, foram induzidas a sintetizar quantidades superiores destas macromoléculas, sendo que os efeitos mais pronunciados foram observados em G_1 e relacionaram-se à síntese proteica.

O trabalho de REINHOLD & BUISMAN ⁵⁶ (1973) visou a determinar a curva de sobrevivência do endotélio capilar em ratas, frente à radiação X. A metodologia empregada incluía a administração subcutânea de substâncias, como o ácido úrico e o lactato de lítio, com o propósito de induzir a proliferação capilar, após a irradiação local com uma dose única de 500rad ou 2 doses, com este mesmo valor, em um intervalo de 24 horas. Para a avaliação quantitativa, foram determinadas as medidas da concentração local de um traçador intravascular, no 12º dia que sucedeu a irradiação. Foi possível observar que, nas preparações não-irradiadas, o tecido subcutâneo estava repleto de capilares; entretanto, as amostras irradiadas apresentaram uma redução na quantidade de vasos sanguíneos neo-formados. A radiosensibilidade, característica refletida pela curva de sobrevivência, foi maior nas amostras teciduais provenientes de animais que foram expostos a uma dose total equivalente a 1.000rad. Com base em outros

ensaios sobre a curva de sobrevivência dos diversos tecidos animais, os autores puderam concluir que a radiosensibilidade das células do endotélio, nessas condições experimentais, não foi essencialmente diferente em comparação com a pele, o intestino ou a cartilagem.

VAN DEN BRENK *et al.*⁶⁴, em 1974, realizaram uma série de experimentos com o objetivo de estudar o efeito de doses únicas e fracionadas de radiação X sobre a contração de feridas na pele de ratos, considerando as formas de irradiação pré e pós-operatória. Para determinar as taxas de contração dos ferimentos produzidos em áreas da pele parcialmente protegidas e previamente irradiadas, empregou-se doses únicas e duplas de 4.000 ou 8.000R. As pesquisas que visaram a comparar a influência do fracionamento da dose envolveram a administração das 2 frações iguais de radiação X em um intervalo de 24 horas, previamente ao ato cirúrgico. O efeito da variação no período de tempo entre a irradiação e a cirurgia foi estudado por meio de mensurações efetuadas na pele, que foi exposta a uma dose única de 1.500R e, subseqüentemente, sofreu ferimentos circulares a intervalos variando de 0 a 14 dias após a irradiação. No que concerne à irradiação pós-operatória, as feridas circulares foram expostas de 3 maneiras diferentes: sendo totalmente irradiadas, e, tendo suas bases ou margens sido protegidas. Nessas condições experimentais, a pele foi exposta a uma dose única de 1.500R, imediatamente após a produção dos ferimentos. As medidas do maior e menor eixo das feridas foram registradas a cada 2 ou 3 dias. A partir dos referidos experimentos, constatou-se que a irradiação pré-operatória,

da pele parcialmente protegida, não causou reduções significantes nas taxas de contração das feridas. Por outro lado, o fracionamento das doses aplicadas à pele intacta reduziu o efeito prejudicial nos mecanismos de contração. Quanto ao intervalo de tempo entre a irradiação e a produção das feridas, verificou-se uma recuperação considerável na capacidade de contração com um maior adiamento da cirurgia, nesse caso 14 dias. A exposição à radiação X logo após a cirurgia, antes da formação do tecido de granulação, causou um atraso no início do processo de contração das feridas. Os autores comentaram que este retardo dura até que a população celular sobrevivente tenha proliferado o bastante para elevar as taxas de contração aos níveis de normalidade. A proteção das margens dos ferimentos resultou em uma taxa de contração similar àquela das feridas não irradiadas. Porém, a proteção limitada à base dos ferimentos resultou em um período de contração, a 50% do diâmetro inicial, semelhante ao intervalo observado para as feridas não protegidas.

O processo de restauração das camadas endoteliais também foi investigado por SHOLLEY *et al.*⁵⁸ (1977), em um estudo *in vitro*. Nesse trabalho, colônias de células endoteliais humanas foram expostas a doses únicas de raios X equivalentes a 250, 500, 750 e 1.000rad. Após 24 horas da irradiação, as culturas celulares foram incubadas em um meio contendo timidina tritiada e, subsequente, preparadas para a obtenção de radioautografias. Em outro experimento desse estudo, as culturas celulares foram expostas a 1.500rad aproximadamente 1 hora antes de passarem por uma manobra que visou a

provocar uma ruptura no aglomerado de células. As análises destas culturas ocorreram após 48 e 72 horas da produção dos defeitos mecânicos. Os resultados das avaliações mostraram que, 24 horas após a irradiação, as percentagens de células em processo de síntese de DNA foram reduzidas tanto nas regiões centrais como nas áreas periféricas das culturas. Doses de 750 e 1.000rad cessaram a produção de DNA nas áreas centrais e reduziram-na severamente na periferia. Em relação ao fechamento dos defeitos mecânicos, as observações após um período de 72 horas permitiram-lhes inferir que havia uma semelhança muito grande no quadro de repopulação da fenda, nas culturas controles e irradiadas. Dessa forma, os autores concluíram que a repopulação de pequenos defeitos, nas colônias endoteliais, continuou se processando às expensas da migração celular.

No ano de 1984, discutindo a ação das radiações ionizantes utilizadas em radioterapia, particularmente representadas pelos raios X e elétrons, sobre o processo de reparo, MOORE ⁵⁰ explicou que, na fase inicial da reparação – em que ocorre um aumento da permeabilidade capilar, com a formação de um coágulo fibrinoso – a irradiação determina poucas alterações, além de uma redução no número de células inflamatórias. Entretanto, se uma ferida for irradiada vários dias após o ato cirúrgico, com o estabelecimento do tecido de granulação, observa-se um decréscimo na proliferação capilar e no crescimento fibroblástico. A síntese, bem como a maturação do colágeno são retardadas. Com doses baixas a moderadas de radiação, estes eventos resultam principalmente em retardo na

cicatrização, sendo que a ferida torna-se morfológicamente normal após um certo período de tempo. O efeito é dose-dependente, portanto, doses progressivamente mais altas causam maior depleção de capilares e fibroblastos, e, um maior atraso no reparo tecidual. Doses únicas menores que 300rad não determinam um retardo significativo na reparação, enquanto que, com 1.000rad já se começa a detectar alterações morfológicas e bioquímicas no ferimento, embora estas possam ser mínimas.

Ainda em 1984, FRANKLIN & COULTAS²³, descreveram o processo de reparação tecidual na pele previamente irradiada, por meio de um trabalho experimental que envolveu a avaliação histológica de componentes dérmicos e epidérmicos. Nesse estudo, camundongos receberam doses únicas de 10, 20 e 35Gy de raios X no pavilhão externo das orelhas. Imediatamente e nos intervalos de 1, 2, 3 e 7 dias após a irradiação, os animais foram submetidos a um procedimento cirúrgico para a produção de uma excisão, com a forma de um "V", que dividia as orelhas em duas metades iguais. Os animais irradiados foram sacrificados aos 5, 11 e 24 dias após o ato cirúrgico, juntamente com os respectivos controles. Constatou-se que a reparação tecidual foi retardada por todas as doses de radiação e as feridas irradiadas com 35Gy exibiram uma ruptura secundária ao 11º dia pós-operatório, não apresentando preenchimento dérmico durante toda a fase experimental. O reparo tecidual em feridas irradiadas com 10Gy foi comparável ao ocorrido nos ferimentos não irradiados, contudo, as características dos tecidos estudados foram diferentes. Os autores puderam

concluir que o preenchimento dérmico está substancialmente completo por volta do 7º dia após a cobertura epitelial, ressaltando que, para minimizar os efeitos deletérios sobre a consolidação dérmica, a irradiação deveria ser postergada até, pelo menos, 1 semana após o fechamento macroscópico da ferida.

De acordo com BARTON *et al.*⁶ (1985), doses superficiais de radiação X acima de 2Gy determinam uma resposta eritematosa, mas, abaixo destas não existem efeitos visíveis. Esses pesquisadores acrescentaram que, embora os efeitos radiobiológicos das doses suberitematosas tenham uma certa relevância, freqüentemente têm sido relatados como desconhecidos ou não detectáveis. Com o objetivo de estudar os efeitos dos raios X, aplicados em doses suberitematosas, esses autores desenvolveram uma pesquisa bifásica em humanos. Para tanto, 11 pacientes voluntários foram selecionados dentre as pessoas que eram submetidas à radioterapia. Na primeira etapa desse trabalho, 5 indivíduos receberam uma dose única de 0,1; 0,5; 1 e 2Gy em áreas-teste da pele, que foram removidas 6 dias após a irradiação, juntamente com as áreas-controle dos membros contralaterais. As áreas da pele estudadas localizavam-se na porção interna dos braços. Na segunda fase, 6 pacientes tiveram as 4 áreas-teste expostas à dose de 1Gy e avaliadas 1, 3, 7 e 14 dias após a irradiação. Verificou-se o índice de marcação tecidual na epiderme, por meio de radioautografias; o produto da descamação forçada da pele e a atividade da esterase não-específica que, na camada granulosa, é considerada um indicador da liberação de enzimas lisossômicas durante a diferenciação celular. O índice de marcação tecidual

apresentou um decréscimo altamente significativo com o emprego de doses equivalentes a 0,5 e 1Gy, em comparação com as áreas-controle. Quanto ao produto da descamação forçada, ocorreu uma diminuição nos números de células liberadas da camada córnea com doses de 1 e 2Gy. A dose de 1Gy causou uma redução significativa na atividade da esterase não-específica. Os autores puderam demonstrar que a exposição da pele humana a doses de 0,5 a 1Gy é suficiente para reduzir significativamente a proliferação celular na camada basal. Em adição, foi possível caracterizar algumas alterações funcionais, após 3 dias da aplicação de uma dose única equivalente a 1Gy de raios X, em 3 estágios do processo de queratinização.

Em 1987, GUIDUGLI NETO ³⁵ avaliou a habilidade proliferativa do endotélio de brotos e alças capilares superficiais que receberam uma alta dose de radiação X. Nesse trabalho experimental, ratos foram submetidos a uma cirurgia para a produção de uma ferida excisional, na pele da porção dorsal. Após 6 dias do ato cirúrgico, metade dos animais teve suas feridas irradiadas com uma dose única de 2.000rad. Os ratos controles e irradiados foram sacrificados ½, 1, 3, 6, 12 e 24 horas e 3, 7, 15 e 30 dias posteriormente à irradiação. As amostras teciduais foram devidamente processadas e, com o auxílio de um microscópio óptico, procedeu-se à contagem dos capilares. Considerando apenas a quantidade de vasos superficiais, esse autor constatou um baixo volume vascular relativo, do início até o 7º dia de observação, em ambos os grupos. Todavia, o volume vascular relativo foi menor nos ferimentos irradiados em todos os momentos,

exceto no 30º dia. Com base nos resultados desse experimento, foi possível concluir que a irradiação do tecido de granulação é sucedida por uma diminuição na quantidade de vasos sangüíneos.

Nesse mesmo ano, KRISHNAN *et al.*⁴³ pesquisaram as alterações que ocorrem na permeabilidade vascular dos músculos em decorrência da irradiação. Para tanto, coelhos foram separados em grupos que receberam doses únicas de 2, 4, 6, 8, 10, 12, 15, 20, 25 e 30Gy de radiação X em uma área do tecido muscular esquelético, presente nas patas anterior e posterior de um dos lados. A fim de estudar a permeabilidade vascular instantaneamente, durante a irradiação, metade dos animais de cada grupo recebeu uma injeção intravenosa contendo albumina marcada com iodo-125 e sódio-22, imediatamente antes de se administrar a radiação. A outra metade dos animais passou pelo mesmo tratamento de 16 a 24 horas após a irradiação. Coelhos de todos os subgrupos foram sacrificados aos 2 minutos; de 16 a 24 horas; 10, 30, 90 e 120 dias posteriormente à irradiação, para a coleta de amostras de sangue e do tecido muscular. Procedeu-se ao exame histológico das amostras de músculo esquelético, com o propósito de observar modificações nas fibras musculares, no interstício e nos vasos sangüíneos. Os resultados indicaram que o extravasamento de albumina marcada aumentou, imediatamente após a irradiação, com doses tão baixas quanto 2Gy e continuou aumentando com doses mais elevadas. Com o emprego das doses mais baixas, de até 6Gy, a função capilar foi restaurada em 24 horas. Quanto às alterações histológicas, com a

aplicação de doses equivalentes e maiores que 15Gy, as modificações patológicas como hemorragia, granulações citoplasmáticas, edema intersticial, congestão, fibrose e espessamento das paredes endoteliais, foram visivelmente perceptíveis com o passar do tempo. Os autores puderam constatar que a irradiação local determinou injúria instantânea nos capilares, cujo grau de severidade relacionava-se à dose de radiação X aplicada.

RUDOLPH *et al.*⁵⁷, em 1988, idealizaram um experimento para avaliar o potencial reprodutivo de fibroblastos da pele humana previamente irradiada, em cultura de tecidos – portanto, independentemente de uma microcirculação. Nesse trabalho, amostras teciduais de 4 pacientes que haviam sido submetidos à radioterapia foram coletadas, durante a execução de procedimentos cirúrgicos que tinham por objetivo restaurar a pele lesada, das seguintes regiões estratégicas: (1) margens de ulcerações; (2) tecido atrófico não-ulcerado, mas irradiado; e (3) enxertos de pele não irradiada ou sítios doadores. Após as biópsias, as amostras teciduais foram separadas em pequenos grupos, processadas e mantidas em meio de cultura. Pelo menos 5 entre 10 grupos das amostras de pele irradiada, mas não ulcerada, foram capazes de produzir fibroblastos em cultura. As células provenientes destes grupos foram observadas após 7 a 10 dias, em contraste com os fibroblastos da pele normal, que apareceram após 4 a 6 dias de cultura. Não foi possível detectar o crescimento de fibroblastos em nenhuma das amostras do tecido às margens das ulcerações. De acordo com os resultados das contagens celulares, os fibroblastos da pele irradiada apresentaram crescimento

significativamente mais lento. Assim, os autores inferiram que a irradiação pode resultar em defeitos funcionais intrínsecos, com a diminuição na capacidade reprodutiva, ou em uma exterminação seletiva das subpopulações de fibroblastos cujo crescimento é mais rápido, o que não depende de uma redução no suprimento sanguíneo.

Ainda em 1988, GORODETSKY *et al.*³¹ investigaram o efeito da radiação X sobre a resistência física de feridas, na pele de camundongos. No primeiro experimento, um grupo de animais teve a parte inferior do dorso irradiada com uma dose única de 18Gy. Imediatamente após a irradiação, metade destes camundongos foi submetida a uma incisão nos limites da área irradiada. Amostras teciduais de todos os camundongos foram coletadas, em diferentes intervalos de tempo durante um período de 3 meses, e passaram por um teste de resistência à tensão. A partir desse trabalho, foi possível observar 2 fases no processo de recuperação da resistência tênsil na pele ferida, mas não irradiada. Nas 2 primeiras semanas, a pele retomou cerca de 30% de sua resistência original, constatando-se uma limitada recuperação adicional nas 2 semanas subseqüentes. Durante os 2 meses que se seguiram, uma segunda fase de aumento na resistência tênsil foi registrada. Aos 90 dias, a resistência do ferimento era de 75% em relação à pele-controle não ferida. Verificou-se que a pele exposta a 18Gy imediatamente antes da incisão apresentou lentidão significativa na primeira fase de recuperação. As outras pesquisas seguiram a mesma metodologia, porém, variando-se a dose, os períodos de estudo e a forma de aplicação da radiação X.

O segundo experimento objetivou a avaliação do efeito de intervalos de tempo inferior a 1 hora, de 2, 14, 40, 65 e 95 dias, entre a irradiação com uma dose única de 18Gy e a incisão. Constatou-se que a taxa de aumento em resistência tênsil não foi influenciada pelo intervalo de tempo entre a irradiação e o ferimento, até 65 dias de avaliação. Em camundongos irradiados 95 dias antes da cirurgia, a recuperação da resistência tênsil no primeiro mês da cicatrização foi similar à observada para outros intervalos. As mensurações realizadas durante os dois últimos meses do estudo, para os animais irradiados 95 dias antes da incisão, sugerem que a radiação X aplicada em tal período teve menor efeito sobre a segunda fase de recuperação.

Estudando o efeito da irradiação com uma dose única de 18Gy, administrada menos de 1 hora, 3, 5 e 12 dias após o ato cirúrgico, esses pesquisadores observaram que nos intervalos de tempo inferiores a 5 dias, o aumento em resistência tênsil foi similar ao ocorrido quando a irradiação e a incisão foram quase simultâneas. Entretanto, se a radiação fosse aplicada em um estágio mais tardio da reparação, o restante do processo de recuperação da resistência tênsil era suprimido por mais de 1 mês. A segunda fase foi prejudicada em todos os intervalos pós-operatórios, mas, apresentou uma recuperação mais rápida nos animais irradiados ao 12º dia.

O quarto trabalho visou a um estudo sobre a influência da aplicação de diferentes doses únicas de radiação X na fase inicial do processo de reparo, isto é, 14 dias após a cirurgia. Para tanto, os camundongos foram irradiados

imediatamente antes do ato cirúrgico com doses de 8 a 26Gy. Nesse experimento, a curva dose-resposta apresentou um limiar para o efeito sobre a resistência tênil que equívaleu a números variando de 8 a 10Gy; doses acima destes valores determinaram uma resposta linear. O efeito máximo após 14 dias da incisão, observado para doses em torno de 20 a 26Gy, foi um decréscimo de 75% na resistência à tensão.

BAKER & KROCHAK ⁵ (1989), esboçaram a relação entre a resposta vascular à irradiação e a conseqüente expressão do dano tecidual precoce e tardio, por meio de um breve estudo retrospectivo da literatura. Segundo esses autores, a morte celular induzida pelas radiações ionizantes ocorre quando as células irradiadas passam por divisão celular – morte reprodutiva ou mitótica. Em populações celulares que não se dividem ou se reproduzem lentamente, a irradiação pode acelerar a apoptose. Esses pesquisadores explicaram que uma reação precoce e universal do tecido conjuntivo é um aumento na permeabilidade vascular. Dois processos parecem estar envolvidos nesta alteração: a despolimerização da substância fundamental e a liberação de aminas vasoativas, como a histamina e a serotonina. As modificações na permeabilidade são transitórias, durando somente poucas horas após a irradiação com doses únicas menores do que 1.000rad, contudo, persistindo em um maior intervalo de tempo com doses mais elevadas. O dano tecidual é progressivo, sendo que esta expressão inicial da injúria por irradiação ocasiona modificações no meio

extracelular. Em adição, a irradiação também determina alterações funcionais e proliferativas nos fibroblastos.

O efeito da radiação X sobre o metabolismo das glicosaminoglicanas (GAGs), a síntese de proteínas e ácido hialurônico na cartilagem e na membrana sinovial foi pesquisado por HUGENBERG *et al.* ³⁸, nesse mesmo ano. Para os vários trabalhos experimentais, amostras de cartilagem articular e membrana sinovial da articulação femural de cães foram mantidas em cultura e, então, irradiadas com doses únicas de 1.000, 10.000 e 50.000rad de raios X. A avaliação da síntese líquida de GAGs sulfatadas envolveu a cultura das amostras de cartilagem controles e irradiadas em um meio contendo sulfato de sódio marcado com enxofre-35. Em um outro experimento, para o exame da síntese proteica, as amostras de cartilagem foram incubadas em meio contendo leucina tritiada. Com o objetivo de analisar a reversibilidade do efeito da radiação sobre o processo de síntese das GAGs, amostras de tecido cartilaginoso foram mantidas em um meio de cultura isento de radionuclídeos por 24, 72 e 120 horas após a irradiação. Ao final destes períodos, as amostras foram incubadas em meio contendo sulfato de sódio marcado com enxofre-35, a fim de se verificar a quantidade líquida de GAGs. Nos experimentos que visaram à determinação da síntese de ácido hialurônico pela membrana sinovial, as amostras teciduais foram mantidas em meios contendo glicosamina marcada com carbono-14 ou trítio, imediatamente após a irradiação. A partir dos resultados desses experimentos, os pesquisadores puderam constatar que, após a irradiação com 1.000 e 10.000rad, a síntese

líquida de GAGs foi de 93% e 69% em relação aos valores-controle, respectivamente. Por outro lado, nos tecidos que receberam 50.000rad, a síntese de GAGs foi de 37% em relação ao grupo controle. Exames radioautográficos demonstraram uma redução marcante na incorporação de enxofre-35 pelos condrócitos e pela matriz extracelular. Com base no estudo da incorporação de leucina radioativa, verificou-se que a irradiação também causou uma inibição da síntese proteica. Entretanto, a síntese de ácido hialurônico foi similar nas culturas controles e irradiadas com doses únicas de até 50.000rad.

Em 1990, RAVELI *et al.*⁵⁵ estudaram a influência da radiação X sobre a cronologia de reparação alveolar. Nessa pesquisa, ratos sofreram a exodontia de seus incisivos superiores direitos. A seguir, os animais foram divididos em 3 grupos que, à exceção do grupo controle, foram expostos a uma dose única e restrita à área alveolar de 1,25 e 1,75Sv, respectivamente. Os ratos foram sacrificados aos 3, 7, 14 e 28 dias pós-operatórios. Por meio do exame microscópico, os autores constataram que as doses utilizadas não impediram a proliferação epitelial. Quanto aos alvéolos, a persistência de um processo inflamatório agudo ao 3º dia, no grupo que recebeu 1,25Sv, sugere que esta dose promoveu alguma agressão à área do ferimento. A proliferação de capilares e fibroblastos pareceu ter sido inibida. Estas características foram ainda mais marcantes nos animais expostos a 1,75Sv, observando-se a ausência quase total de vasos sangüíneos e fibroblastos.

A ação das radiações ionizantes sobre a dinâmica de formação do tecido de granulação também foi motivo de estudo para ABDALLA *et. al.*¹, em 1991. Ratos foram submetidos a uma incisão na região dorsal, para a inserção de uma esponja de policlorovinil (PVC). Subseqüentemente, separou-se os animais em 3 grupos: I – controle; II – irradiado com uma dose única de 5,28R no momento do implante; e III – irradiado com doses alternadas de 5,28R, de 48 em 48 horas durante os primeiros 14 dias do experimento e, a cada 96 horas até que se completassem 28 dias da fase experimental. Componentes dos 3 grupos foram sacrificados no 4º, 7º, 14º, 21º e 28º dia pós-operatório, para o exame microscópico do tecido de granulação formado no interior das esponjas. Aos 4 dias, o grupo controle já apresentava indícios de fibrogênese e neo-formação capilar, enquanto os grupos II e III exibiam a predominância de células inflamatórias da fase aguda. O reparo evoluiu de forma mais acelerada no grupo I, seguido pelos grupos II e III, aos 7, 14 e 21 dias pós-cirúrgicos. Entretanto, no 28º dia, as diferenças registradas foram menos expressivas.

WATANABE *et al.*⁶⁷ (1994), por sua vez, investigaram os efeitos de doses de radiação X, similares às empregadas em âmbito odontológico, sobre a gênese e evolução do tecido de reparo em ratos. Os animais sofreram um ato cirúrgico para a produção de uma ferida cutânea na região dorsal e foram separados em 3 grupos: C – controle, não irradiado; D. U. – animais que receberam uma dose única de 7R, na área do ferimento, imediatamente após a cirurgia; e D. D. – os integrantes deste grupo foram irradiados com um total de 7R,

igualmente fracionados em 3 aplicações: logo após a cirurgia, 24 e 48 horas posteriormente à primeira exposição. Os ratos foram sacrificados aos 2, 4, 7, 11, 14, 21 e 28 dias pós-operatórios e as amostras teciduais coletadas prestaram-se aos exames microscópico e histofotométrico. A histofotometria, que visou a determinar a concentração de GAGs no tecido de granulação, indicou não haver diferenças estatisticamente significantes entre os componentes da amostra. Verificou-se que a organização tecidual, determinada pela associação entre as GAGs e o colágeno, ocorreu por volta do 7º dia nos 3 grupos experimentais. Estas constatações permitiram-lhes concluir que a dose de radiação X equivalente a 7R, sob as condições experimentais desse trabalho, não influenciou de forma significativa os processos de síntese de GAGs e organização macromolecular do tecido de granulação.

Nesse mesmo ano, WANG *et al.*⁶⁶ avaliaram a reparação tecidual na pele previamente submetida à irradiação por elétrons. Para tanto, ratos foram divididos em 2 grupos: o grupo irradiado e o grupo que foi simuladamente irradiado. Por meio de um acelerador linear, uma dose única de 9,6Gy de elétrons com energia de 4MeV foi aplicada em uma área da porção dorsal dos animais. Após 7 dias, todos os ratos passaram por um tratamento cirúrgico, que envolveu a produção de uma incisão na área-teste. Os animais foram subdivididos de modo que 3 integrantes de cada grupo foram sacrificados nos dias 1, 3, 7 e 14 da fase pós-operatória. As amostras teciduais coletadas foram devidamente processadas, para os exames de microscopias óptica e eletrônica. Observou-se que a união

epitelial foi estabelecida ao 3^o e 7^o dia pós-cirúrgico, para os grupos controle e irradiado, respectivamente. Em se tratando da resposta inflamatória inicial e do tecido de granulação, os autores constataram que no 1^o dia, as incisões-controle exibiram um infiltrado de células inflamatórias mais exuberante; nas amostras do grupo irradiado, havia poucos fibroblastos e os feixes de fibras colágenas eram mais esparsos e menos organizados. No entanto, este prejuízo na formação do tecido de granulação foi significativo apenas até o 7^o dia da avaliação, indicando que a reparação tecidual sofreu um retardo, mas tendeu a se restabelecer por volta do 14^o dia pós-operatório.

Ainda em 1994, BERNSTEIN *et al.*⁸ também desenvolveram um modelo experimental, objetivando determinar a ação da irradiação cutânea sobre a contração de ferimentos. Nesse trabalho, porquinhos da Índia tiveram uma área do dorso irradiada com uma dose única de 18Gy de raios X. Após 2 dias da irradiação, os animais foram submetidos a uma cirurgia para a realização de 3 pares de feridas excisionais circulares. O fenômeno da contração foi estudado por meio de mensurações da área dos ferimentos, realizadas com o auxílio paquímetros, aos 5, 7, 10 e 14 dias pós-operatórios. A interpretação dos resultados permitiu inferir-se que, apesar de as feridas irradiadas terem se apresentado maiores que as controles em todos os dias de observação, as diferenças foram estatisticamente significantes apenas nos 2 últimos dias.

DRAKE & OISHI¹⁹, em 1995, teceram algumas considerações acerca do processo de reparo tecidual em pacientes submetidos à quimioterapia e à

radioterapia. De acordo com esses pesquisadores, a fase inflamatória parece ser a mais sensível aos efeitos da irradiação e da quimioterapia. A radiação tem efeitos agudos e tardios sobre a habilidade do organismo em cicatrizar-se. A injúria tecidual resulta de dano direto e indireto ao DNA celular, pela formação de radicais livres. Os efeitos sobre os elementos celulares, nos limites da pele irradiada, parecem ser progressivos e permanentes. Microscopicamente, a injúria por radiação causa estase e obliteração de pequenos vasos sanguíneos. Os fibroblastos sofrem alterações funcionais e, durante um longo período de tempo, a produção de colágeno torna-se deficiente. Este dano pode ocorrer de 2 maneiras: os fibroblastos não produzem colágeno suficiente para atender as demandas do tecido ou o colágeno sintetizado não matura em um intervalo de tempo adequado. O período pós-operatório imediato parece ser o estágio mais crítico na reparação tecidual e o tratamento radioterápico, nesta fase, tem destacável efeito adverso sobre a cicatrização de feridas.

No Brasil, a ação de baixas doses da radiação de elétrons sobre o reparo tecidual foi primeiramente abordada por ALMEIDA ² (1997). Esse trabalho experimental visou a avaliar o efeito deste tipo de radiação ionizante, aplicada em uma faixa de 1cm lateralmente às margens de feridas excisionais produzidas na pele de ratos. Os animais foram divididos em 4 grupos: um grupo irradiado imediatamente após a abertura da ferida com uma dose única de 1Gy, por feixes de elétrons com 6MeV de energia, sendo os animais sacrificados nos 2, 4, 7, 11, 14, 17 e 21 dias que se seguiram; um grupo igualmente irradiado 3 dias após o ato

cirúrgico, em que os sacrifícios foram planejados para os 5, 7, 10, 14, 17, 20 e 24 dias posteriores à cirurgia; e os respectivos grupos controles. Os estudos morfológico e histofotométrico das amostras teciduais coletadas permitiu observar-se que a irradiação por elétrons retardou os processos de reparação nos 2 tempos avaliados. Contudo, este efeito prejudicial foi estatisticamente significante, para todos os dias analisados, somente nos casos em que a radiação foi aplicada 3 dias após a cirurgia. A comparação dos dados referentes aos grupos irradiados, nos dias 7, 14 e 17, mostrou que o dano foi maior para os animais irradiados no 3º dia após o ferimento, sendo a diferença estatisticamente significativa para os 3 dias analisados.

PEREIRA FILHO *et al.*⁵², em 1998, investigaram os aspectos histológicos do efeito da radiação beta sobre a reparação cutânea. Para tanto, ratos foram submetidos a 2 incisões dorsais, uma na parte anterior e outra na porção caudal, sendo, subseqüentemente, distribuídos em 4 grupos. Decorridas 24 horas da cirurgia, os componentes de cada grupo foram irradiados com uma dose de 250cGy de raios beta provenientes de uma placa de estrôncio-90, que permaneceu em contato com a pele somente na área incisada, localizada na região anterior. De acordo com os períodos de estudo, os animais receberam doses alternadas de radiação a cada 48 horas. Assim, o 1º grupo, que foi sacrificado aos 3 dias pós-operatórios, recebeu apenas uma dose única de 250cGy; os animais sacrificados aos 7, 14 e 21 dias pós-cirúrgicos tiveram seus ferimentos anteriores expostos a 3, 7 e 10 doses de 250cGy, respectivamente. Os

pesquisadores puderam verificar que a irradiação gerou um aumento no número de leucócitos e uma redução na população de fibroblastos, no entanto, não alterou significativamente a quantidade de fibras colágenas do tecido de reparo.

Os efeitos da irradiação por elétrons sobre os componentes do tecido de reparo, na pele, também foram pesquisados por MONTEIRO ⁴⁸ (1999). Nesse trabalho experimental, ratos sofreram uma cirurgia para a produção de uma ferida excisional e, posteriormente, foram separados em 3 grupos. O grupo controle constituiu-se por animais que foram sacrificados aos 2, 4, 5, 7, 10, 11, 14, 17, 20, 21 e 24 dias pós-operatórios. Os animais do 2º grupo tiveram a base de seus ferimentos irradiada com uma dose única de 1Gy, por feixes de elétrons com 6MeV de energia, imediatamente após a excisão, e foram sacrificados aos 2, 4, 7, 11, 14, 17 e 21 dias pós-cirúrgicos. O 3º grupo foi exposto à radiação com a mesma dose e energia dos feixes de elétrons utilizados no 2º grupo, 72 horas após a cirurgia. Os ratos do 3º grupo foram sacrificados no 5º, 7º, 10º, 14º, 17º, 20º e 24º dia que sucedeu o procedimento cirúrgico. As características microscópicas das amostras teciduais indicaram que a irradiação causou um atraso no desenvolvimento do tecido de granulação, em ambos os grupos experimentais. Entretanto, os tecidos irradiados no 3º dia pós-operatório mostraram-se mais sensíveis.

LOURENÇO ⁴⁵, em 2000, pesquisou a ação de uma dose única de 1Gy de elétrons com 6MeV de energia sobre a atividade das fosfoesterases. Para tanto, ratos foram submetidos a um procedimento cirúrgico que visou à

implantação de uma esponja de PVC no tecido subcutâneo. A irradiação foi planejada para o 3º dia pós-operatório, em uma área restrita ao local de implantação da esponja. As análises bioquímicas do tecido de granulação contido nas esponjas, de animais sacrificados aos 5, 7, 10, 14, 17, 20 e 24 dias pós-operatórios, indicaram que a atividade da adenosina trifosfatase (ATPase) foi maior no grupo controle a partir do 7º dia de estudo. Constatou-se que a atividade da fosfatase alcalina foi maior no grupo irradiado até o 14º dia. Os valores relativos à 5'nucleotídeo fosfodiesterase foram, em geral, maiores no grupo irradiado. Considerando que a fosfatase alcalina relaciona-se ao processo de agregação de colágeno e GAGs, assim como as outras duas enzimas agem favoravelmente nos fenômenos de divisão celular, o autor concluiu que a irradiação por elétrons determinou um efeito prejudicial, embora transitório, sobre os eventos de formação do tecido de granulação.

2.2 O PROCESSO DA CICATRIZAÇÃO NO QUADRO CLÍNICO DA DIABETES MELLITUS

Em 1967, GLICKMAN *et al.*²⁹, estudaram os efeitos da diabetes mellitus induzida pela aloxana sobre o processo de reparação das estruturas periodontais. Para tanto, utilizaram ratos que foram separados em 4 grupos: grupo 1 – não diabéticos e não operados; grupo 2 – não diabéticos operados; grupo 3: diabéticos não operados; e grupo 4 – diabéticos operados. Oito semanas após a indução da diabetes, os animais dos grupos 2 e 4 sofreram a ressecção da gengiva livre marginal ao redor dos incisivos superiores e inferiores esquerdos. Componentes dos 4 grupos foram sacrificados aos 14, 78 e 115 dias pós-operatórios, para que se procedesse às observações microscópicas. Foi possível constatar que a diabetes atrasou o reparo gengival pós-cirúrgico, uma vez que a atividade fibroblástica e a formação de colágeno foram inibidas, porém, não afetou o epitélio. Os pesquisadores sugeriram que a placa bacteriana agiu como um fator sinérgico, pois a inflamação supurativa que acompanhou o processo de fibroplasia foi um achado relevante.

CATANZARO GUIMARÃES ¹¹⁻¹⁴, em 1968, publicou uma série de artigos sobre uma pesquisa experimental que teve o propósito de avaliar os efeitos da diabetes mellitus, induzida pela aloxana, sobre os diversos elementos do tecido de granulação. O primeiro artigo ¹¹ abordou as observações histoquímicas da fração glicoprotídica, por meio do método do ácido periódico reagente de Schiff (PAS). O autor verificou uma proporção relativamente maior de material PAS-positivo no sistema fibrilar e na substância fundamental, o que vincularia o quadro de deficiência insulínica ao metabolismo das glicoproteínas e ao estado de organização do tecido conjuntivo; porque o aumento da positividade das fibras reticulares e colágenas ao PAS deve-se, principalmente, ao baixo estado de agregação e polimerização do sistema fibrilar conjuntivo e da fração glicoprotídica a ele associada. No segundo artigo ¹², acerca do comportamento das GAGs, o autor relatou uma diminuição dessas macromoléculas no tecido de granulação do grupo diabético, em comparação com o controle. Este achado confirmou a interferência acentuada do quadro de deficiência insulínica no metabolismo proteico e na biossíntese das GAGs, indicando que a diabetes mellitus tende a prolongar a fase proliferativa da reparação tecidual. O terceiro trabalho ¹³ enfocou o estado de agregação e organização do sistema fibrilar conjuntivo em desenvolvimento. A partir das observações microscópicas, o pesquisador constatou que o processo de reparação expressou um atraso estatisticamente significativo no grupo dos animais diabéticos, em que o sistema fibrilar conjuntivo apresentava-se com estado insuficiente de organização. Assim, foi possível concluir que a diabetes mellitus interfere no fenômeno físico-químico da conversão

do colágeno solúvel para insolúvel, determinando um sistema instável. Finalmente, o quarto artigo ¹⁴ descreveu o comportamento das feridas segundo a interpretação das características macro e microscópicas do tecido neo-formado. Nos animais diabéticos, a estrutura deste tecido mostrou-se bastante imatura. O material fibrinóide, rico em células leucocitárias, foi encontrado em proporções bem maiores e as fibras colágenas estavam distribuídas mais esparsamente. Em síntese, o atraso no fechamento das feridas e a menor quantidade de feixes de fibras colágenas, no grupo diabético, confirmaram que a deficiência insulínica retarda a evolução da fibroplasia no tecido de granulação.

A ação inibidora do decréscimo na taxa sérica de insulina sobre o processo de reparação foi pesquisada por WERINGER & ARQUILLA ⁶⁸ (1981). Nesse trabalho, 2 perfurações foram produzidas nas orelhas de hamsteres espontaneamente diabéticos e normais. Os tecidos centrais e periféricos às feridas foram examinados 0, 2, 4, 8 e 16 horas após o ato cirúrgico, por métodos morfológicos, e, 0, 8 e 16 horas após a cirurgia, por morfometria. Observou-se que o tecido de granulação dos animais diabéticos não possuía capilares em proliferação e o volume de colágeno era significativamente reduzido, em todos os tempos estudados; os fibroblastos apresentavam irregularidades como lisossomos e corpos estranhos no citoplasma, indicando degeneração interna. Os autores apontaram as alterações do ambiente extracelular, ou seja, a alta taxa de glicose, o edema e o baixo nível de insulina, como os fatores causais desta condição.

Em 1984, CARRICO *et al.*¹⁰, discorrendo sobre os fatores que influenciam o processo de reparo tecidual, explicaram que existem vários prejuízos mecânicos e defeitos metabólicos na cicatrização de feridas em indivíduos diabéticos. A hipóxia do tecido ferido é um deles e pode ocorrer por meio de 2 mecanismos. Tanto a microangiopatia como a oclusão arterial, secundária a uma aterosclerose acelerada, são comuns na diabetes. Além disso, a redução na sensibilidade, decorrente da neuropatia diabética, pode ocasionar traumas teciduais repetidos, o que também prejudica a reparação. Contudo, esses pesquisadores, referenciando a evidência de que o processo cicatricial é similarmente retardado na ausência de problemas mecânicos como o trauma ou o decréscimo no fluxo sanguíneo e, com base em estudos *in vivo*, sugeriram um papel importante da insulina nas fases inflamatória e proliferativa da reparação. Os leucócitos polimorfonucleares apresentariam deficiências funcionais, sendo a quimiotaxia, a fagocitose e a degradação intracelular especificamente afetadas.

SPANHEIMER *et al.*⁵⁹ (1988), realizaram um trabalho experimental visando a avaliar a produção do colágeno como um indicador de alteração metabólica no estado diabético. Nesse experimento, ratos foram divididos em 6 grupos: o grupo controle e os cinco grupos-teste; que receberam doses únicas de 35, 50, 65, 90 e 300mg/kg de estreptozotocina (SZ), para a indução da diabetes mellitus. Tecidos ósseo e cartilaginoso foram removidos de todos os animais no 14º dia após a indução e, então, incubados em solução contendo prolina tritiada. As amostras teciduais foram, subseqüentemente, tratadas com colagenase

bacteriana purificada, para que se pudesse determinar a incorporação da prolina radioativa. Os autores constataram que a produção de colágeno no osso e na cartilagem dos animais diabéticos foi significativamente reduzida, sendo que, quanto maior o grau de hiperglicemia, menor a taxa relativa de síntese das fibras colágenas. No tecido ósseo, o decréscimo foi de 52%, para 51% na cartilagem. A análise estatística dos valores relativos às mensurações do DNA tecidual, para a pesquisa de possíveis alterações do conteúdo celular na cartilagem e no osso, demonstrou que a quantidade total deste ácido nucleico era equivalente nas amostras dos grupos diabéticos e controle. Os resultados permitiram-lhes concluir que, nos grupos de ratos diabéticos, a produção de colágeno foi reduzida a cerca de 50% em relação aos animais-controle, 2 semanas após a indução da diabetes.

Ainda em 1988, FRANZÉN & NORRBY ²⁴ estudaram a capacidade mitótica das duas células predominantes no tecido de granulação do mesentério, os fibroblastos e as células mesoteliais, em ratos diabéticos. Quatro semanas após a indução da diabetes mellitus, por meio da injeção intravenosa de SZ, animais diabéticos e normais passaram por um procedimento cirúrgico com a finalidade de se produzir perfurações no intestino delgado. A proliferação de fibroblastos e células mesoteliais foi estudada na porção central do tecido de granulação, a 1 e 2mm das margens das perfurações, em amostras do mesentério de ratos sacrificados ao 1º, 2º e 3º dia pós-operatório. A presença de fibroblastos e células mesoteliais, em diferentes fases do reparo, foi determinada pela verificação do índice de marcação das mesmas, em radioautografias obtidas

ao 1º, 2º, 3º, 5º, 7º, 10º, 21º, 42º e 63º dia pós-cirúrgico. O índice mitótico foi significativamente aumentado nos ratos diabéticos apenas ao 2º dia da avaliação, nas zonas topográficas situadas a 1 e 2mm das perfurações. Constatou-se que, no 3º e 5º dia da avaliação, os valores do índice de marcação celular foram maiores para os ratos normais, tendendo a decrescer nos 2 grupos até o 63º dia de observação. Este dado indicou uma insuficiência de fibroblastos e células mesoteliais, em animais diabéticos, na fase proliferativa da reparação tecidual, que se inicia por volta do 4º dia após a injúria.

TENGRUP *et al.*⁶¹ (1988) realizaram a mensuração dos componentes celulares do tecido de granulação, bem como o estudo do metabolismo do zinco e do cobre, em ratos diabéticos aloxânicos. Para tanto, 2 semanas após a indução da diabetes mellitus, 6 esponjas de PVC foram implantadas no tecido subcutâneo de animais diabéticos e controles, visando à coleção do tecido neo-formado. Os ratos foram sacrificados 4 e 7 dias após a cirurgia e o tecido de granulação foi submetido a análises bioquímicas para a determinação dos conteúdos de DNA total, RNA-ribose, hidroxiprolina e hemoglobina, bem como avaliação da atividade das fosfatases ácida e alcalina. As concentrações de zinco e cobre no soro, no fígado e nos rins também foram determinadas nos dias supracitados. Constatou-se que o tecido de granulação dos animais diabéticos continha um menor número de células no 4º dia pós-operatório, como foi estimado pela quantificação do conteúdo total de DNA. Todavia, no 7º dia após a implantação das esponjas, o conteúdo de DNA foi similar em ambos os grupos. O conteúdo de RNA e a

proporção RNA/DNA no 7º dia, foram mais baixos no grupo diabético, indicando um menor número de células que sintetizam proteínas, como os fibroblastos, e, provavelmente, uma maior quantidade de células inflamatórias. A atividade aumentada da fosfatase alcalina no grupo de animais diabéticos, ao 7º dia pós-cirúrgico, confirmou a presença marcante das células inflamatórias, especialmente os leucócitos polimorfonucleares. A formação-degradação de colágeno foi verificada pela quantificação da hidroxiprolina. No 7º dia pós-operatório, o conteúdo total de colágeno foi menor nas amostras teciduais do grupo diabético. Quanto à mensuração do conteúdo de hemoglobina, os valores mais baixos, encontrados para os ratos hiperglicêmicos, apontam a menor vascularização no tecido de granulação destes animais.

Revisando a literatura acerca da cicatrização no organismo humano, FELIX *et al.*²² (1990) fizeram alusão para a evidência de que as manifestações agudas da diabetes, tais como a hiperglicemia, a cetoacidose e o coma hiperosmolar não cetótico levam a um comprometimento da fase inflamatória da reparação tecidual. Especialmente quanto aos neutrófilos, a quimiotaxia é deficiente e a fagocitose torna-se alterada, além de apresentarem menor capacidade de destruição dos microorganismos. Segundo eles, talvez a explicação para essas modificações resida no fato destes processos dependerem de insulina para a obtenção de energia. Em adição, esse hormônio é fundamental para a proliferação celular, no tecido de granulação. Portanto, também há um comprometimento na resistência tênsil da cicatriz.

Nesse mesmo ano, GRANDINI *et al.*³² desenvolveram um experimento com o objetivo de avaliar a síntese proteica no tecido de reparo alveolar, em ratos diabéticos. Os animais foram divididos em três grupos: 1 - controle; 2 - animais submetidos a uma cirurgia para a remoção de cerca de 80% do pâncreas e, 3 - animais que sofreram o mesmo procedimento cirúrgico, entretanto, receberam doses diárias de insulina. Dez dias após o ato cirúrgico, todos os animais sofreram as exodontias dos dentes incisivos superiores direitos. Os autores estabeleceram os sacrifícios para os animais do grupo 1 aos 3, 4, 5, 7 e 10 dias pós-operatórios e, para os integrantes dos grupos 2 e 3, aos 5, 7, 10, 12 e 14 dias após as avulsões. O tecido removido dos alvéolos foi incubado com alanina marcada com carbono-14, para que se verificassem as taxas de síntese proteica. Paralelamente, procedeu-se ao estudo microscópico das amostras teciduais. A incorporação do aminoácido marcado foi maior nos animais do grupo 2, atingindo um pico aos 10 dias, o que indicou um atraso na evolução do tecido de granulação para osso, evidenciando o início tardio e a progressão lenta da fase fibroblástica. Os achados histológicos confirmaram esta hipótese. Quanto aos ratos tratados com insulina, constatou-se uma aceleração no reparo alveolar, o que ratificou a influência desse hormônio sobre a síntese proteica.

De acordo com EHRLICHMAN *et al.*²¹, em 1991, a diabetes mellitus está associada com pobre cicatrização e alta incidência de infecções. A hiperglicemia resultante causa um aumento na viscosidade sangüínea e as hemácias podem ficar estagnadas na microcirculação. Esses autores também

citaram que a diabetes determina alterações na função leucocitária – expressas, principalmente, pela redução na quimiotaxia e deficiência na capacidade fagocitária – e ainda explicaram que a presença da neuropatia diabética cria um campo propício às infecções virulentas, haja vista que esta disfunção sensorial relaciona-se ao estabelecimento de uma pele seca e não lubrificada, sendo mais propensa à fissura.

Em 1993, GARDINER *et al.*²⁸ desenvolveram uma pesquisa experimental que visava a comprovar a impressão clínica de que a diabetes mellitus preexistente exacerba a injúria vascular por irradiação, na retina. Para tanto, ratos foram separados em 6 grupos: G1 – controles; G2 – diabéticos há 3,5 meses; G3 – diabéticos há 8 meses; G4 – normais irradiados; G5 – diabéticos há 3,5 meses e irradiados; e G6 – diabéticos há 8 meses e irradiados. A diabetes mellitus foi induzida por meio da administração de SZ e a dose de radiação X, no olho direito dos animais, foi equivalente a 1.000cGy. O estudo ultra-estrutural, 6,5 meses após a irradiação, demonstrou que havia um número bem maior de alças capilares acelulares na retina dos animais diabéticos, normais irradiados e diabéticos irradiados. A diferença nos valores de registro para capilares acelulares entre G2 e G3 não foi estatisticamente significativa, apesar de ter sido significativamente mais baixa do que a estabelecida para G5 e G6, sendo que a diferença entre estes dois grupos também foi significativa. Comparando-se o efeito da irradiação separadamente em relação ao estado diabético, foi possível verificar que G2, G3 e G4 apresentaram números de capilares acelulares equivalentes.

Dessa forma, os resultados sugeriram uma relação sinérgica entre a condição diabética e a radiação ionizante, no desenvolvimento da vasculopatia na retina.

A contração do tecido conjuntivo durante o reparo, em condições de diabetes mellitus, foi estudada por FRANZÉN & ROBERG ²⁵ (1995). Nessa pesquisa, ratos foram separados em 2 grupos: experimental, que recebeu uma injeção de SZ para a indução da diabetes, e controle. Após 4 semanas da indução, todos os animais foram submetidos a uma cirurgia abdominal para a realização de 2 perfurações no intestino delgado. Subgrupos de ratos foram sacrificados ao 1º, 3º, 5º, 7º e 10º dia pós-operatório e as amostras teciduais foram estudadas por microscopias óptica e eletrônica. Os autores verificaram que o fechamento das perfurações mesentéricas, provavelmente, se iniciou no 4º dia pós-cirúrgico, sendo que todos os ferimentos estavam cicatrizados ao final do período de observação. A análise quantitativa dos componentes do tecido de granulação não apresentou diferenças estatisticamente significantes entre os grupos, o que pode negar uma influência deletéria da diabetes no processo de reparo, nessas condições experimentais. Entretanto, foi possível constatar um decréscimo significativo na proporção superfície/volume das membranas plasmáticas nos ratos diabéticos, o que implicaria em um menor número de projeções da membrana citoplasmática nas células do tecido de granulação. Segundo esses pesquisadores, a expressão destas projeções é vista em células que adquirem mobilidade e relaciona-se à contração de feridas por migração dos fibroblastos.

DEVLIN *et al.*¹⁸, em 1996, também avaliaram a reparação tecidual em alvéolos dentais, no estado diabético controlado e não controlado. Nesse trabalho, ratos foram separados em 3 grupos: o 1º grupo recebeu uma injeção de SZ, para a indução da diabetes; o 2º grupo recebeu apenas uma solução tampão e o 3º grupo foi tratado da mesma forma que o 1º, porém, 2 dias após a indução, os animais receberam diariamente uma dose de insulina. Após 14 dias de administração da SZ, todos os animais sofreram a avulsão de seus molares superiores direitos e a coleta de sangue. Os ratos dos grupos 1, 2 e 3 foram sacrificados aos 2, 7, 10, 17, 21, 27, e 42; 2, 4, 7, 10, 14, 17, 21, 27 e 42; e 2, 4, 7, 10 e 17 dias que se seguiram à cirurgia, respectivamente. A observação histológica do tecido de granulação presente nos alvéolos mostrou que a diabetes mellitus insulino-dependente (DMID) não controlada pode prejudicar a formação da matriz colagenosa, implicando em atraso no reparo, aumento da destruição alveolar e, portanto, em um resultado clínico menos favorável. Por outro lado, as injeções diárias de insulina propiciaram o restabelecimento da produção de colágeno e do padrão de neo-formação óssea.

Por meio de um estudo retrospectivo da literatura acerca da patogenia da diabetes mellitus, KAMAL *et al.*⁴¹ (1996) explicaram que os diversos fatores de risco envolvidos na reparação tecidual tornam difícil, senão impossível, definir os elementos-chave na patogênese das complicações no processo de reparo em pacientes diabéticos. De acordo com esses pesquisadores, os eventos moleculares induzidos pela diabetes propiciam alterações metabólicas a curto

prazo e determinam danos estruturais a longo prazo. Um dos principais desarranjos bioquímicos que implicam em prejuízos no reparo tecidual é a formação dos produtos finais e irreversíveis da glicosilação não enzimática. O mecanismo básico envolve interações da glicose com grupamentos *amina* reativos, presentes em proteínas, para formar os produtos iniciais da glicosilação. Estes produtos sofrem rearranjos químicos lentos, gerando os produtos finais e irreversíveis, que interferem em múltiplas funções celulares, bem como na dinâmica da matriz extracelular. Os produtos finais da glicosilação podem agir de modo a alterar as funções das células mesenquimais e endoteliais. Verifica-se um aumento na permeabilidade vascular e na susceptibilidade da matriz extracelular à degradação enzimática.

Respaldados na hipótese de que a osseointegração pode ser prejudicada na diabetes mellitus em decorrência das alterações nos componentes da matriz extracelular, como o colágeno e as proteoglicanas, NEVINS *et al.*⁵¹, em 1998, examinaram a taxa e a extensão da cicatrização óssea ao redor de implantes inseridos em ratos normais e diabéticos. Quatorze dias após a indução da diabetes, por meio de uma injeção de SZ, todos os animais foram submetidos a um procedimento cirúrgico para a inserção de 3 implantes de titânio no fêmur direito. Os animais foram sacrificados aos 28 e 56 dias pós-operatórios para as avaliações histológica e histométrica, considerando-se as percentagens de: preenchimento ósseo em uma extensão de 250µm ao redor do implante, isto é, a densidade de osso esponjoso; contato entre o osso cortical ou esponjoso no

perímetro total do implante; e contato entre o osso esponjoso e a superfície do implante, excluindo-se a zona de osso cortical. A análise estatística demonstrou que a quantidade de osso neo-formado ao redor dos implantes foi similar para ambos os grupos, nas 2 fases de observação. Contudo, o exame microscópico revelou diferenças no padrão de neo-formação óssea entre os referidos grupos. O osso neo-formado nos animais diabéticos apresentou características de um tecido imaturo e desorganizado, o que resultou em percentagens decrescidas de osseointegração nos 2 tempos estudados, como foi comprovado pela análise dos dados relativos ao contato entre o osso e a superfície dos implantes.

Em 1999, LOOTS *et al.*⁴⁴ estudaram os efeitos de diferentes níveis de glicose sobre a capacidade proliferativa e morfologia de fibroblastos removidos de úlceras diabéticas, bem como da pele não lesionada de pacientes diabéticos não insulino-dependentes e voluntários saudáveis. Nesse trabalho, as amostras teciduais de todos os pacientes foram devidamente processadas para que se pudesse obter culturas de fibroblastos e, conseqüentemente, avaliar a proliferação celular por meio da incorporação de timidina tritiada e verificar as características morfológicas pela microscopia eletrônica. Os resultados mostraram que os fibroblastos das úlceras diabéticas proliferaram significativamente menos em relação aos dois outros grupos, ocorrendo situação semelhante ao se comparar as amostras dos pacientes diabéticos não feridos e voluntários saudáveis, em meios de cultura com alta e baixa concentrações de glicose. Microscopicamente, os fibroblastos provenientes das úlceras diabéticas apresentaram-se com múltiplos

corpúsculos lamelares e vesiculares, sugerindo intensa renovação de estruturas intracelulares. A deficiência de estruturas microtubulares foi observada em ambas as amostras diabéticas, sendo relacionada a distúrbios na função citoesquelética, que interferem nos mecanismos intrínsecos envolvidos na proliferação celular.

CECHOWSKA-PASKO *et al.*¹⁵ (1999), por terem demonstrado em estudos prévios que o estado de diabetes crônico resulta em um decréscimo significativo no conteúdo de GAGs, presentes na pele de ratos, realizaram uma pesquisa experimental com a finalidade de comprovar se esta redução era devida a uma diminuição na síntese ou a um aumento na degradação destas macromoléculas. Para tanto, os animais foram separados em 2 grupos: experimental, em que a diabetes mellitus foi induzida pela SZ, e controle. Após um período de 2 meses, todos os ratos foram sacrificados e as amostras de pele foram mantidas em meio de cultura contendo glicosamina marcada com carbono-14 e sulfato marcado com enxofre-35, para que se pudesse quantificar as GAGs pela verificação da incorporação dos traçadores nestes heteropolissacarídeos. Com o objetivo de comparar o efeito da diabetes na biossíntese e degradação das GAGs, uma parte das culturas teciduais foi incubada e centrifugada várias vezes, de modo que o sedimento foi coletado para o isolamento das referidas macromoléculas. Os autores puderam observar que, após 2 meses de indução do estado diabético, o conteúdo de GAGs na pele dos ratos foi reduzido em cerca de 60%, em comparação com os animais do grupo controle. As amostras teciduais dos ratos diabéticos não apresentaram degradação significativa das GAGs

marcadas. Os resultados desse experimento sugeriram que a diminuição no conteúdo de GAGs, na pele dos ratos diabéticos, foi uma consequência do decréscimo na biossíntese – especialmente das GAGs sulfatadas, mas não de um aumento significativo na degradação destas macromoléculas.

Em 2000, WETZLER *et al.*⁶⁹ executaram uma série de experimentos visando a estudar a associação entre a cinética de produção de duas citocinas quimiotáticas e a persistência da fase inflamatória durante a reparação tecidual, em camundongos geneticamente diabéticos. Amostras do tecido proveniente de feridas excisionais, produzidas na pele de animais diabéticos e saudáveis, foram coletadas 1, 3, 5, 7 e 13 dias após o ato cirúrgico que determinou os ferimentos e, então, receberam tratamentos distintos objetivando a avaliação das citocinas MIP-2 (*macrophage inflammatory protein - 2*) – para neutrófilos, e MCP-1 (*macrophage chemoattractant protein - 1*) – para macrófagos, bem como a investigação das possíveis fontes celulares destas substâncias. Com base em testes imunológicos e imunohistoquímicos, os autores puderam constatar que houve liberação elevada de ambas as citocinas até o 13º dia do estudo e, conseqüentemente, infiltração prolongada de neutrófilos e macrófagos, nos tecidos de animais diabéticos. Quanto às células produtoras destas citocinas, verificou-se que os fatores MIP-2 e MCP-1 eram secretados por queratinócitos, dos folículos pilosos e das margens das feridas, respectivamente. Assim, a secreção prolongada de citocinas quimiotáticas atuaria na manutenção do processo inflamatório, que relaciona-se de modo direto ao retardo na cicatrização da pele em camundongos diabéticos.

Considerando que a disfunção dos macrófagos tem sido apontada como um dos principais mecanismos responsáveis pela cicatrização deficiente em pacientes diabéticos, ZYKOVA *et al.*⁷⁰ (2000) desenvolveram uma pesquisa com o propósito de avaliar a morfologia e a função destas células, *in vitro*. Nesse experimento, macrófagos provenientes do peritônio de camundongos saudáveis e geneticamente diabéticos foram mantidos em cultura, a fim de se proceder aos exames morfológicos, por microscopias óptica e eletrônica, assim como às análises das secreções do fator de necrose tumoral- α (TNF- α), da interleucina-1 β (IL-1 β), do fator de crescimento das células endoteliais vasculares (VEGF) e do óxido nítrico (NO). Esses pesquisadores puderam verificar que os macrófagos dos animais diabéticos apresentaram alterações morfológicas consistentes com modificações intracelulares. Quanto às dosagens das substâncias supracitadas, que são de relevante importância para a evolução do processo de reparo tecidual, constatou-se uma redução significativa nas secreções de TNF- α , IL-1 β e VEGF pelos macrófagos dos animais diabéticos. Por outro lado, a liberação de NO, que é uma substância citotóxica para os próprios macrófagos, foi significativamente maior nas culturas celulares dos camundongos diabéticos. Desse modo, foi possível inferir que as funções dos macrófagos são severamente prejudicadas no estado diabético.

3. PROPOSIÇÃO

Considerando-se a escassez de pesquisas científicas, descritas na literatura revista, sobre os efeitos de baixas doses da radiação de elétrons no tecido de granulação induzido sob condições de hiperglicemia, este trabalho experimental teve como propósito:

*** Avaliar, histologicamente, os efeitos da irradiação local por feixes de elétrons com 6MeV de energia, aplicados em dose única de 1Gy, sobre o processo de reparo tecidual em ratos diabéticos.**

3. PROPOSIÇÃO

4. METODOLOGIA

MATERIAIS

Amostra

Para a realização deste trabalho experimental foram utilizados 48 animais de laboratório, inicialmente com a qualidade “livre de patógenos específicos” (SPF) – *Rattus norvegicus*, *Albinus*, da linhagem Wistar, machos, com 6 semanas de idade e peso variando entre 200 e 250g. Estes ratos foram procedentes do Centro Multi-Institucional de Bioterismo (CEMIB) da UNICAMP.

Procedimentos experimentais

Os procedimentos experimentais consistiram nas fases de identificação e pesagem dos animais, indução da diabetes mellitus, anestesia, depilação, cirurgia, irradiação, obtenção das amostras teciduais, que foi sucedida pelo sacrifício dos animais e preparação das lâminas histológicas. Para as referidas fases, foram necessários os seguintes materiais:

Identificação e pesagem dos animais

- Canetas tipo pincel atômico nas cores azul, verde, vermelha e preta;
- Recipiente plástico para o posicionamento dos animais;
- Balança de precisão, tipo digital, modelo TEB 1000 (Tecnal);
- Tabelas para o registro dos dados.

Indução da diabetes mellitus

- Estreptozotocina – *Streptozotocin mixed anomers*® (Sigma-Aldrich, S0130);
- Citrato trissódico 2-hidrato;
- Água destilada;

4. METODOLOGIA

- Seringas hipodérmicas para insulina de 1ml, com agulha ultra-fina, descartáveis;
- Solução fisiológica injetável de cloreto de sódio a 0,9%;
- Éter etílico p. a.;
- Campânula de vidro;
- Compressas de gaze esterilizadas;
- Glico-fita ® (Lilly do Brasil).

Anestesia

- Solução anestésica injetável: pentobarbital sódico a 3% – *Hypnot* ® (Laboratório Fontoveter – Divisão Cristália);
- Seringas hipodérmicas para insulina de 1ml, com agulha ultra-fina, descartáveis.

Depilação

- Luvas descartáveis.

Cirurgia *

- Campo cirúrgico;

* Todos os materiais empregados nesta fase foram, previamente, esterilizados.

4. METODOLOGIA

- Tesoura de ponta romba;
- Pinça anatômica;
- Pinça dente-de-rato;
- Cabo de bisturi;
- Lâminas de bisturi n.º 11;
- Compressas de gaze.

Irradiação

- Acelerador linear, modelo MEVATRON 74 (Siemens);
- Avental de chumbo com 4mm de espessura.

Obtenção das amostras teciduais

- Solução fisiológica de cloreto de sódio a 0,9%;
- Papel filtro;
- Recipientes de vidro com tampa, para o armazenamento das amostras;
- Solução de formaldeído a 10%;
- Campânula;
- Éter etílico p. a..

Preparação das lâminas histológicas

- Álcool a 70%;
- Álcool absoluto;
- Solução de Xilol p. a.;
- Estufa;
- *Paraplast*® *plus* (Oxford Labware);
- Micrótomo;
- Corantes e reagentes.

Observações microscópicas e obtenção de fotomicrografias

- Fotomicroscópio *Zeiss Pol 01*

MÉTODOS

Delineamento experimental *

* Esta pesquisa foi aprovada pela Comissão de Ética na Experimentação Animal, do Instituto de Biologia da UNICAMP, em 22/11/99 (APÊNDICE 1).

A escolha de ratos como integrantes da amostra experimental justifica-se por ser esta a segunda espécie animal mais, rotineiramente, utilizada em testes e pesquisas biomédicas ⁴⁹, permitir o estabelecimento da uniformidade genética, ser de fácil manipulação e manutenção, ter parâmetros fisiológicos bem definidos ^{49, 62} e, especialmente, porque os processos de reparação na pele de ratos apresentam muitas características em comum com a pele humana ³⁷.

Os animais foram mantidos em biotério climatizado, dentro de gaiolas plásticas contendo maravalha, durante um período de 7 dias para adaptação. Conforme recomenda VALERO ⁶² (1990), os ratos provenientes do CEMIB possuíam a qualidade SPF, isto é, ausência de microorganismos capazes de lhes induzir doenças, e foram alimentados com ração balanceada padrão * e água *ad libitum* desde o nascimento até a data do sacrifício.

Grupos experimentais

A amostra foi separada, aleatoriamente, em 4 grupos experimentais constituídos por um total de 12 ratos. Os animais foram identificados com uma codificação própria na cauda, utilizando-se canetas do tipo pincel atômico de diferentes cores para cada um dos grupos. Desse modo, estabeleceu-se os seguintes grupos:

* Nuvital ®

- **Animais-controle**
- **Animais normais irradiados**
- **Animais diabéticos**
- **Animais diabéticos irradiados**

Conforme as datas preestabelecidas para o estudo do processo de reparação tecidual, planejadas para o 4º, o 7º, o 13º e o 21º dias pós-operatórios, estes animais foram redistribuídos em 16 subgrupos de 3 componentes.

Indução da diabetes mellitus

Para o estudo da patogênese da diabetes mellitus, pode-se empregar modelos experimentais com animais geneticamente diabéticos ou induzidos por substâncias e procedimentos cirúrgicos para a remoção do pâncreas. O modelo quimicamente induzido é uma alternativa previsível, pouco invasiva e econômica de se obter a condição de diabetes, podendo ser mantida por um período de tempo suficiente para se avaliar os efeitos agudos e crônicos desta síndrome.

Existem duas substâncias com ação diabetogênica freqüentemente empregadas: a estreptozotocina e a aloxana. Contudo, a SZ tem sido preferida por ser um agente citotóxico irreversível e altamente específico para as células beta-pancreáticas^{17, 18, 40}. Portanto, a toxicidade geral da droga é muito menor, não se observando efeitos adversos significativos em órgãos como o fígado e os rins.

Além disso, a escala de doses que provocam a diabetes é bastante ampla em comparação com a aloxana, que exhibe uma margem estreita entre as doses tóxicas, letais e diabetogênicas^{17, 40}. Dessa forma, a utilização da SZ propicia a sobrevivência prolongada dos animais em um estado diabético mais estável.

A SZ é um antibiótico de amplo espectro que é extraído naturalmente como um produto do *Streptomyces acromogenes*, sendo a diabetogênese um resultado da destruição das células beta-pancreáticas, decorrente de 2 fenômenos distintos, porém, não excludentes: efeito citotóxico direto e ação de mecanismos relacionados ao sistema imune, possivelmente uma ativação auto-imune³⁶.

No presente trabalho, optou-se por uma técnica similar à aplicada por JUNOD *et al.*⁴⁰ (1967). No dia que antecedeu a indução da diabetes mellitus, todos os animais foram pesados em balança de precisão e mantidos em jejum por 16 horas. Minutos antes de se iniciar as injeções, a SZ foi diluída em solução tampão de citrato trissódico 0,01mol em pH 4,5. A quantidade de SZ homogeneizada na solução foi calculada de acordo com o peso dos animais que receberiam a injeção intravenosa, contendo a referida substância, na dose de 35mg/kg de peso corpóreo. Os animais controles e normais irradiados foram igualmente anestesiados por inalação no interior de uma campânula cuja atmosfera era saturada com éter etílico, previamente às injeções, mas, ao invés da SZ, aplicou-se solução fisiológica de cloreto de sódio a 0,9% estéril. Para a injeção das soluções de SZ e fisiológica, puncionou-se a veia peniana (FIG. 1). A escolha da veia peniana em relação à caudal ou até mesmo outras veias se

justifica pela localização anatômica da primeira, que confere maior facilidade à visualização, palpação e punção.

A comprovação do estado diabético se deu por meio da pesquisa de glicose na urina dos animais, com o emprego da GLICO-FITA ® 72 horas e 1 semana após a indução. Todos os ratos tiveram sua urina testada, inclusive os normais. Este método apresenta uma escala de tonalidades, para as reações da urina, que varia do amarelo ao verde (FIG. 2). Os tons de verde indicam a presença de glicose na urina, em diversas concentrações, que são correspondentes ao grau de escurecimento da fita. A coloração amarela resultante é uma característica que denota ausência de glicose na urina, sendo, portanto, um parâmetro de diferenciação entre animais normais e diabéticos. O método da GLICO-FITA ®, se utilizado com critério e segundo as recomendações do fabricante, é bastante satisfatório em exames de triagem e controle da diabetes por não fornecer resultados falso-positivos. Apesar de a determinação das taxas de glicose sérica ser postulada como a maneira mais fidedigna para se diagnosticar os estados hiperglicêmicos, a avaliação da glicosúria é um método não invasivo para se comprovar a condição de hiperglicemia nos animais previamente induzidos. Este foi um fator importante a ser considerado, uma vez que a maioria dos procedimentos constantes deste trabalho experimental causaram muito estresse nos ratos.

Vale ressaltar que somente os animais comprovadamente diabéticos foram selecionados para os grupos de diabéticos e diabéticos irradiados. Além dos

testes de glicosúria, características como a polidipsia, a poliúria e o odor cetônico que emanava da urina dos ratos induzidos, foram elementos de diferenciação entre indivíduos diabéticos e normais.

Anestesia e depilação

O ato cirúrgico foi realizado 15 dias após a indução da diabetes mellitus, tendo em vista que, neste período, já se constatam alterações fisiológicas relevantes^{18, 51, 59}, como uma redução de cerca de 50% na produção de colágeno⁵⁹. Posteriormente a uma segunda pesagem e a um ciclo de jejum que durou 8 horas, todos os animais foram anestesiados com uma dose única de 40mg/kg de peso corpóreo de pentobarbital sódico a 3%, injetada intraperitonealmente⁴⁹.

Procedeu-se em seguida à depilação manualmente, em uma grande área da região dorsal direita, a fim de se evitar irritação química na pele dos animais.

Cirurgia

Durante a cirurgia, o animal foi mantido em decúbito ventral horizontal para que se efetuasse uma ferida excisional retangular, medindo 1,5 x 2,5cm, a aproximadamente 1cm da espinha dorsal, na região anterior do lado direito.

Objetivando a padronização das feridas, confeccionou-se um gabarito plástico para marcar a área de exérese com uma caneta dermatográfica. Planejou-se a maior incisão paralela à espinha dorsal e a excisão tecidual de modo a incluir a epiderme, a derme e o tecido conjuntivo sub-dermal. A ferida, que possuía profundidade aproximada de 2mm, apresentava tecido muscular bem vascularizado em sua base (FIG. 3). Após o ato cirúrgico, os animais foram recolocados em suas respectivas gaiolas e mantidos com alimentação e água *ad libitum*, semelhantes ao período antecedente.

Não foram realizados curativos sobre as áreas operadas e, por não se observar indícios de infecção, a administração de antibióticos foi dispensada.

Irradiação

No 3º dia que sucedeu o ato cirúrgico, os animais dos grupos diabéticos irradiados e normais irradiados foram levados ao Centro de Assistência Integral e Saúde da Mulher (CAISM) da UNICAMP para a irradiação por elétrons. Aplicou-se uma dose única de 1Gy, produzida com feixes de elétrons que possuíam 6MeV de energia e penetração uniforme a 1cm, em uma área que compreendia cerca de 1cm lateralmente às margens das feridas (FIG. 4). Os feixes foram produzidos por meio de um aparelho MEVATRON 74, que é um acelerador linear, sendo a distância fonte-pele de 100cm e o tempo de exposição de 35seg. Para a proteção

das feridas, bem como do restante do corpo dos animais, utilizou-se um avental de chumbo com espessura de 4mm, especialmente confeccionado para este fim.

A escolha da região a ser irradiada foi baseada no entendimento de que o tecido hígado, localizado além das margens de uma área de exérese, comporta-se como o progenitor do tecido de granulação formado na parte central do ferimento.

O emprego dos feixes de elétrons, neste estudo radiobiológico, respalda-se em diversas propriedades que os tornam bem apropriados para o tratamento da pele^{30, 42}. A principal delas é que a penetração pode ser controlada, com pouca ou nenhuma exposição do tecido abaixo da profundidade desejada. Além da profundidade de dose máxima, que, no presente estudo, foi de 1cm, a dose tende a decrescer sensivelmente. Em adição, os elétrons criam uma dose relativamente homogênea na área tratada. A penetração dos feixes de elétrons nos tecidos é consideravelmente menor, em comparação com feixes de raios X de mesma energia. A dose de radiação X na pele tende a decrescer com o aumento da energia dos feixes, causando efeitos biológicos em regiões anatômicas mais profundas²⁷. Segundo GOLDSCHMIDT *et al.*³⁰ (1994), o efeito radiobiológico dos elétrons sobre um determinado tecido irradiado é, essencialmente, idêntico ao dos raios X de mesma energia. Como a finalidade básica deste trabalho era avaliar os efeitos da radiação ionizante sobre os elementos da reparação tecidual, na pele de ratos normais e diabéticos, julgou-se a irradiação por elétrons como o procedimento mais adequado às condições experimentais idealizadas. O maior

poder de penetração dos raios X implicaria em dano tecidual a uma profundidade maior que a desejada, sendo este mais um fator de variação no processo de reparo.

Obtenção das amostras teciduais

A obtenção das amostras de pele com o posterior sacrifício de animais pertencentes a cada um dos 4 grupos foi planejada para acontecer no 4º, 7º, 13º e 21º dia pós-operatório.

Os procedimentos prévios às biópsias de pele foram similares aos realizados para as cirurgias. Assim, os animais foram anestesiados com uma dose única e intraperitoneal de pentobarbital sódico a 3% e mantidos em decúbito ventral, para que se pudesse efetuar 4 incisões paralelas às margens das feridas, com profundidade de aproximadamente 2mm. Estas incisões foram, subseqüentemente, unidas de modo a propiciar a remoção de uma área de tecido que continha uma margem de pele sem solução de continuidade e o ferimento ou cicatriz em sua porção central. Em seguida, as amostras teciduais foram devidamente lavadas com solução fisiológica de cloreto de sódio a 0,9%, visando à eliminação dos resíduos de sangue. O excesso da solução fisiológica foi retirado com o auxílio de papel filtro.

As amostras teciduais foram, então, acondicionadas em recipientes de vidro com tampas, contendo solução de formaldeído a 10%, por um período superior a 72 horas, até o seu processamento laboratorial.

Posteriormente ao ato de biópsia, os animais foram sacrificados por aprofundamento da indução anestésica com a inalação de éter etílico, no interior de uma campânula de vidro, até a perda total e permanente dos sinais vitais.

Preparação das amostras teciduais para os exames histológicos

As amostras teciduais passaram pelas fases de desidratação, clarificação, inclusão em *Paraplast @ plus* e corte, segundo as técnicas de rotina empregadas no laboratório de Histologia. Por meio de um micrótomo, foram obtidos cortes com 5µm de espessura para a confecção das lâminas histológicas. Subseqüentemente, as lâminas foram separadas em 3 lotes, que foram corados por HE e picrosirius, e, submetidos à reação histoquímica com o azul de toluidina em pH 4,0 e concentração de 0,025%, respectivamente. Para cada método histológico, foram preparadas 3 lâminas das secções teciduais de animais representantes dos 16 subgrupos estudados.

A coloração por HE, de acordo com a técnica de rotina empregada no laboratório de Histologia, aplicou-se ao estudo morfológico dos tecidos que passavam pelo processo de reparo tecidual, nos diferentes grupos estudados.

O método do picrosírius, ao exame microscópico sob luz polarizada, foi utilizado especificamente com a finalidade de identificar e avaliar a maturação dos feixes de fibras colágenas, pela evidênciação de sua birrefringência positiva.

O método histoquímico permitiu a observação da reação química entre as moléculas de GAGs e o azul de toluidina, possibilitando também o estudo da associação macromolecular orientada entre as GAGs e o colágeno, por meio da determinação do dicroísmo linear.

^ Observações microscópicas e obtenção de fotomicrografias

Os estudos histológicos das amostras teciduais, bem como as fotomicrografias que ilustram esta dissertação, foram realizados com o auxílio de um fotomicroscópio *Zeiss Pol 01*.



Figura 1. Punção na veia peniana, durante a fase de indução da diabetes mellitus.



Figura 2. Apresentação da GLICO-FITA® (Lilly do Brasil).



Figura 3. Área e base da ferida excisional, realizada no dorso dos animais.



Figura 4. Animal posicionado para a irradiação.

5. RESULTADOS

Seguem-se os resultados das observações microscópicas relativas às amostras teciduais dos animais utilizados nesta pesquisa experimental.

Descrição Morfológica

Coloração por Hematoxilina-Eosina (FIG. 5 – 12)

➤ **Animais controles e normais irradiados**

4º dia da reparação tecidual

Animais-controle: a parte mais superficial da ferida mostrou-se recoberta por uma crosta de material necrótico. Logo abaixo desta crosta, observou-se um infiltrado inflamatório agudo, contendo predominantemente leucócitos

polimorfonucleares, bem como alguns macrófagos e linfócitos. O tecido conjuntivo subjacente já apresentava muitos fibroblastos e vasos sanguíneos neo-formados.

Animais normais irradiados: observou-se uma crosta necrótica recobrendo todo o ferimento. O tecido de granulação possuía um infiltrado inflamatório agudo e apresentava-se com menor espessura, em comparação com as amostras teciduais de animais-controle, evidenciando-se a escassez de fibroblastos. Ainda não havia indícios de neo-formação vascular.

7º dia da reparação tecidual

Animais-controle: as amostras teciduais ainda exibiam resquícios da crosta necrótica, entretanto, o epitélio às margens da ferida mostrava-se hiperplásico, evidenciando os processos de migração e proliferação. No tecido de granulação, observou-se uma redução no número de células inflamatórias, juntamente com um aumento na quantidade de vasos sanguíneos neo-formados e fibroblastos, que já apresentavam uma certa orientação. A presença de feixes de fibras colágenas denotava o início da fibrogênese.

Animais normais irradiados: constatou-se a persistência da crosta necrótica, não obstante o epitélio já apresentasse uma discreta hiperplasia às margens do ferimento, sinalizando o início dos processos de migração e proliferação. O tecido de granulação ainda exibia células inflamatórias, porém, observavam-se muitos fibroblastos e vasos sanguíneos neo-formados.

13º dia da reparação tecidual

Animais-controle: o tecido de granulação apresentou-se totalmente recoberto por epitélio queratinizado, que exibia as suas quatro camadas celulares bem definidas. Observou-se um aumento considerável na quantidade de feixes de fibras colágenas neo-formados, bem como uma diminuição no número de fibroblastos. Nesta fase da reparação, os fibroblastos remanescentes mostravam-se dispostos paralelamente à camada epitelial superficial.

Animais normais irradiados: a área da ferida encontrava-se completamente revestida por uma fina camada de epitélio, ainda em evolução. O tecido de granulação apresentou muitos fibroblastos, ordenados paralelamente à camada epitelial. Nesta fase, já era possível observar feixes de fibras colágenas bem evidentes, embora a quantidade destes componentes fosse menor em comparação com as amostras teciduais do grupo de animais-controle.

21º dia da reparação tecidual

Animais-controle: o epitélio queratinizado mostrou-se menos espesso em relação ao 13º dia do reparo tecidual. O tecido conjuntivo apresentou-se bastante fibroso, com feixes de fibras colágenas mais evidentes. Foi possível observar todos os componentes que estão presentes em um tecido normal, inclusive os anexos da pele.

Animais normais irradiados: observou-se uma camada de epitélio queratinizado,

mais espessa, recobrando completamente a região da ferida. O tecido de granulação apresentou uma quantidade maior de feixes de fibras colágenas, em relação ao 13º dia. A ausência de anexos da pele, na área do ferimento, denotou um menor grau de evolução deste tecido, se comparado às amostras teciduais dos animais-controle.

➤ **Animais diabéticos e diabéticos irradiados**

4º dia da reparação tecidual

Animais diabéticos: a área superficial do ferimento encontrava-se recoberta por uma crosta de material necrótico. O tecido de granulação subjacente, apresentava um infiltrado inflamatório agudo exuberante – representado essencialmente por leucócitos polimorfonucleares. Ainda não se observavam fibroblastos e vasos sangüíneos neo-formados.

Animais diabéticos irradiados: a ferida apresentou-se completamente recoberta por uma espessa crosta necrótica, observando-se poucas células inflamatórias subjacentes. A faixa que compreendia o tecido de granulação era relativamente mais fina, em comparação com as amostras teciduais dos animais diabéticos. Não havia indícios de neo-formação vascular.

7º dia da reparação tecidual

Animais diabéticos: até esta fase, o ferimento permaneceu recoberto por uma

crosta de material necrótico, constatando-se a persistência do infiltrado inflamatório agudo. Entretanto, no tecido conjuntivo, abaixo da zona de inflamação, já era possível observar muitos vasos sanguíneos neo-formados, bem como o aparecimento dos fibroblastos.

Animais diabéticos irradiados: constatou-se a persistência da crosta necrótica espessa, recobrando todo o ferimento. Neste estágio da reparação tecidual, observou-se um aumento na quantidade de células inflamatórias, juntamente com o surgimento de diversos vasos sanguíneos neo-formados.

13º dia da reparação tecidual

Animais diabéticos: ainda observavam-se remanescentes da crosta necrótica, na parte mais superficial do ferimento. Somente neste estágio da reparação tecidual é que se evidenciaram os sinais de migração e proliferação epiteliais. O tecido de granulação já exibia muitos fibroblastos ordenados, bem como feixes de fibras colágenas neo-formados.

Animais diabéticos irradiados: foi possível evidenciar os processos de migração e proliferação epiteliais, observando-se ainda resquícios da crosta necrótica. O tecido de granulação já apresentava muitos fibroblastos orientados, embora o fenômeno da fibrogênese fosse menos expressivo em relação às amostras teciduais do grupo de animais diabéticos.

21º dia da reparação tecidual

Animais diabéticos: o ferimento já se encontrava totalmente recoberto por epitélio queratinizado, apesar de este tecido mostrar-se atrófico, em comparação com o revestimento epitelial das amostras teciduais de animais-controle e normais irradiados. O tecido de granulação apresentou-se bastante celular, contendo muitos fibroblastos com orientação paralela à camada epitelial, porém, exibia uma quantidade maior de feixes de fibras colágenas. Não se constatou a presença de anexos da pele, na área do ferimento.

Animais diabéticos irradiados: nesta fase da reparação, observou-se que as características morfológicas das amostras teciduais, dos representantes deste grupo, foram muito similares àquelas apresentadas pelos animais diabéticos não irradiados.

Avaliação Macromolecular do Colágeno

Coloração pelo Método do Picrosirius (FIG. 13 – 16)

A presente avaliação qualitativa consistiu na identificação e localização dos feixes de fibras colágenas por meio da coloração com uma substância composta, *sirius red*—ácido pícrico, que se liga às moléculas de colágeno, melhor evidenciando sua birrefringência positiva.

Neste método, ao exame microscópico sob luz polarizada, o brilho dos feixes de fibras colágenas é visível na tonalidade vermelha, expressando o grau de organização macromolecular dos mesmos. Assim, uma maior birrefringência relaciona-se a uma maior intensidade da cor vermelha, o que denota não só um aumento no número de feixes de fibras colágenas, mas também um avanço em termos de maturação.

➤ **Animais controles e normais irradiados**

4º dia da reparação tecidual

Animais-controle: embora a birrefringência fosse perceptível, os feixes de fibras colágenas apresentavam-se esparsos e imaturos.

Animais normais irradiados: a birrefringência apresentou-se de modo tênue. Observou-se que os feixes de fibras colágenas mostraram-se mais esparsos e imaturos, em comparação com os feixes de colágeno das amostras teciduais de animais-controle.

7º dia da reparação tecidual

Animais-controle: a birrefringência foi mais evidente, indicando não só a presença de uma maior quantidade de feixes de fibras colágenas, mas também o início de sua organização macromolecular.

Animais normais irradiados: observou-se um aumento da birrefringência, porém,

os feixes de fibras colágenas ainda se apresentavam imaturos.

13º dia da reparação tecidual

Animais-controle: observou-se um aumento considerável na intensidade da birrefringência, consistente com um aumento na quantidade de feixes de fibras colágenas, que encontravam-se mais organizados.

Animais normais irradiados: a birrefringência tornou-se mais evidente, correspondendo ao período de início da organização macromolecular dos feixes de fibras colágenas.

21º dia da reparação tecidual

Animais-controle: o tecido de granulação apresentou o mais elevado padrão de birrefringência, em comparação com as amostras teciduais dos animais pertencentes aos outros grupos estudados, denotando a plenitude da fibrogênese.

Animais normais irradiados: observou-se um aumento considerável na birrefringência, contudo, os feixes de fibras colágenas ainda não haviam atingido um estágio de maturação similar àquele das amostras provenientes dos animais-controle.

➤ **Animais diabéticos e diabéticos irradiados**

4º dia da reparação tecidual

Animais diabéticos: apesar de o tecido de granulação apresentar sinais de birrefringência, a quantidade de feixes de fibras colágenas era muito reduzida.

Animais diabéticos irradiados: observou-se sinais ínfimos de birrefringência, demonstrando a escassez de feixes de fibras colágenas.

7º dia da reparação tecidual

Animais diabéticos: percebeu-se um discreto aumento da birrefringência, mas os feixes de fibras colágenas continuaram a apresentar-se imaturos e esparsos.

Animais diabéticos irradiados: a birrefringência foi mais evidente, entretanto, o tecido de granulação apresentava feixes de fibras colágenas mais imaturos e esparsos, em comparação com as amostras teciduais de animais diabéticos.

13º dia da reparação tecidual

Animais diabéticos: constatou-se um aumento da birrefringência, indicativo de um maior número de feixes de fibras colágenas presentes no tecido de granulação. No entanto, o estado de organização macromolecular do colágeno ainda era precário, em relação às amostras teciduais dos animais normais irradiados.

Animais diabéticos irradiados: observou-se um discreto aumento da birrefringência, que era comparativamente menos intensa, considerando-se as

características do tecido de granulação dos animais diabéticos.

21º dia da reparação tecidual

Animais diabéticos: observou-se um aumento sensível na intensidade da birrefringência, consistente com um maior número de feixes de fibras colágenas, que também já haviam atingido um estágio mais elevado de maturação.

Animais diabéticos irradiados: a birrefringência mostrou-se mais intensa. Todavia, embora o tecido de granulação exibisse maior quantidade de feixes de fibras colágenas, que já apresentavam uma evolução em termos de maturação, estas características foram menos marcantes do que nas amostras teciduais dos animais diabéticos.

Estudo da Organização Macromolecular dos Feixes de Fibras Colágenas

Reação Histoquímica com o Azul de Toluidina (FIG. 17 – 24)

O azul de toluidina a 0,025% e pH 4,0 tem a capacidade de reagir histoquimicamente com as moléculas de GAGs carboxiladas e sulfatadas. Em adição, pelo fato de as moléculas de GAGs associarem-se às fibras colágenas por meio de uma orientação bem definida, que é responsável pela estabilidade do

colágeno, também é possível a determinação do dicroísmo linear. A pesquisa do dicroísmo linear fornece informações sobre a organização macromolecular do tecido em estudo ⁶⁵. O dicroísmo é uma propriedade que confere aos tecidos examinados, sob microscopia de polarização, a característica de apresentarem duas colorações, a depender do plano em que vibram os feixes de luz polarizada. Neste trabalho, sempre que os feixes de fibras colágenas estavam paralelos ao plano de polarização da luz, a cor do tecido era azul ortocromática. Por outro lado, se os feixes de fibras colágenas estivessem perpendiculares ao referido plano, a cor do tecido observado era rosa metacromático. É importante ressaltar que o fenômeno do dicroísmo só ocorre se houver organização macromolecular no tecido em estudo. Caso contrário, as amostras teciduais permanecem com a coloração azul, em ambos os planos de polarização da luz. A primeira evidência do dicroísmo, em uma dada fase da avaliação, indica que os feixes de fibras colágenas encontram-se em processo de organização macromolecular no tecido de granulação, embora não signifique que o referido processo já esteja completo.

➤ **Animais controles e normais irradiados**

4º dia da reparação tecidual

Animais controles e normais irradiados: observou-se a ausência de dicroísmo.

7º dia da reparação tecidual

Animais-controle: as amostras teciduais apresentaram dicroísmo, que evidenciou

5. RESULTADOS

o início da organização macromolecular dos feixes de fibras colágenas presentes no tecido de granulação.

Animais normais irradiados: constatou-se ausência de dicroísmo.

13º e 21º dias da reparação tecidual

Animais controles e normais irradiados: o fenômeno do dicroísmo foi claramente evidenciado.

➤ **Animais diabéticos e diabéticos irradiados**

4º, 7º e 13º dias da reparação tecidual

Animais diabéticos e diabéticos irradiados: observou-se a ausência de dicroísmo.

21º dia da reparação tecidual

Animais diabéticos e diabéticos irradiados: constatou-se o fenômeno do dicroísmo, sinalizando a etapa inicial do processo de organização macromolecular dos feixes de fibras colágenas.

5. RESULTADOS

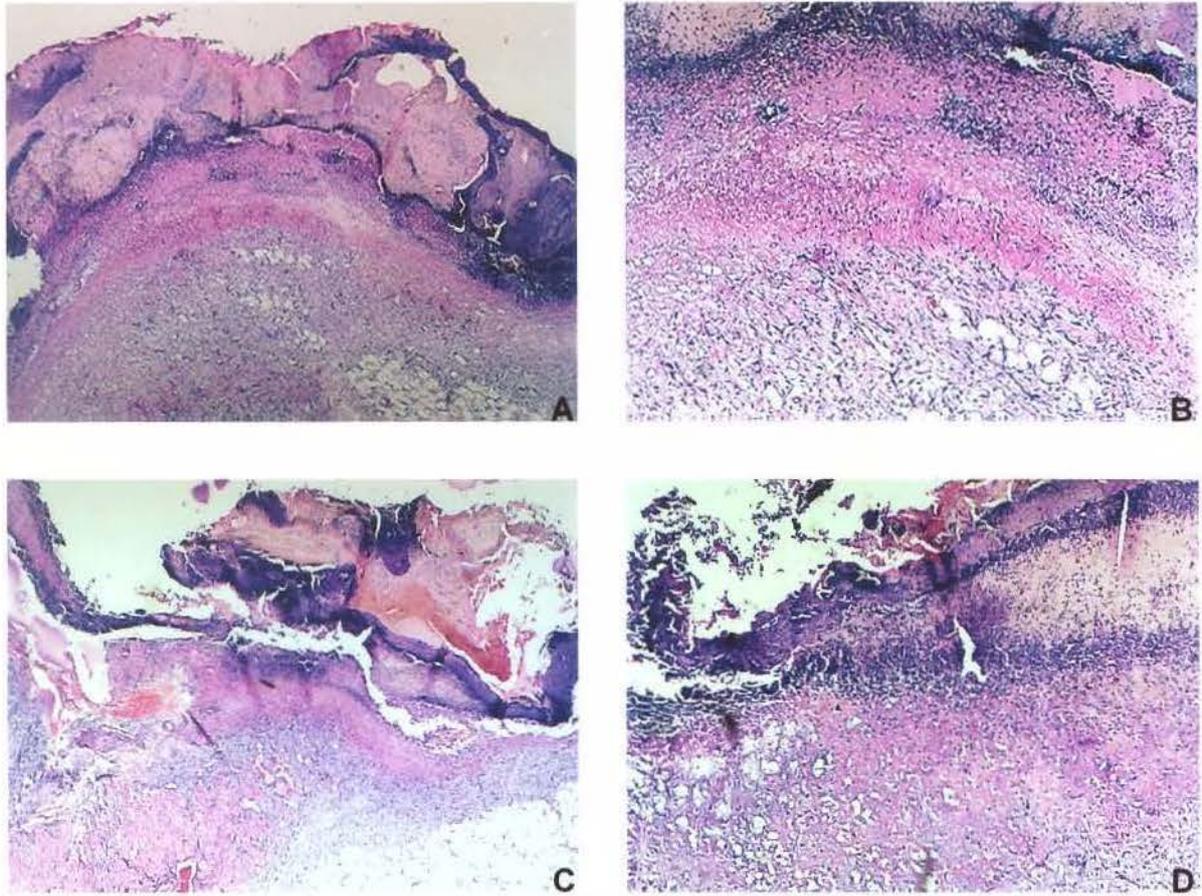


Figura 5. Fotomicrografias das amostras teciduais no 4º dia pós-operatório, submetidas à coloração por HE. **A:** animal-controle (*aumento original 2,5 x 1,25 x 10*); **B:** animal-controle (*aumento original 6,3 x 1,25 x 10*); **C:** animal normal irradiado (*aumento original 2,5 x 1,25 x 10*); **D:** animal normal irradiado (*aumento original 6,3 x 1,25 x 10*).

5. RESULTADOS

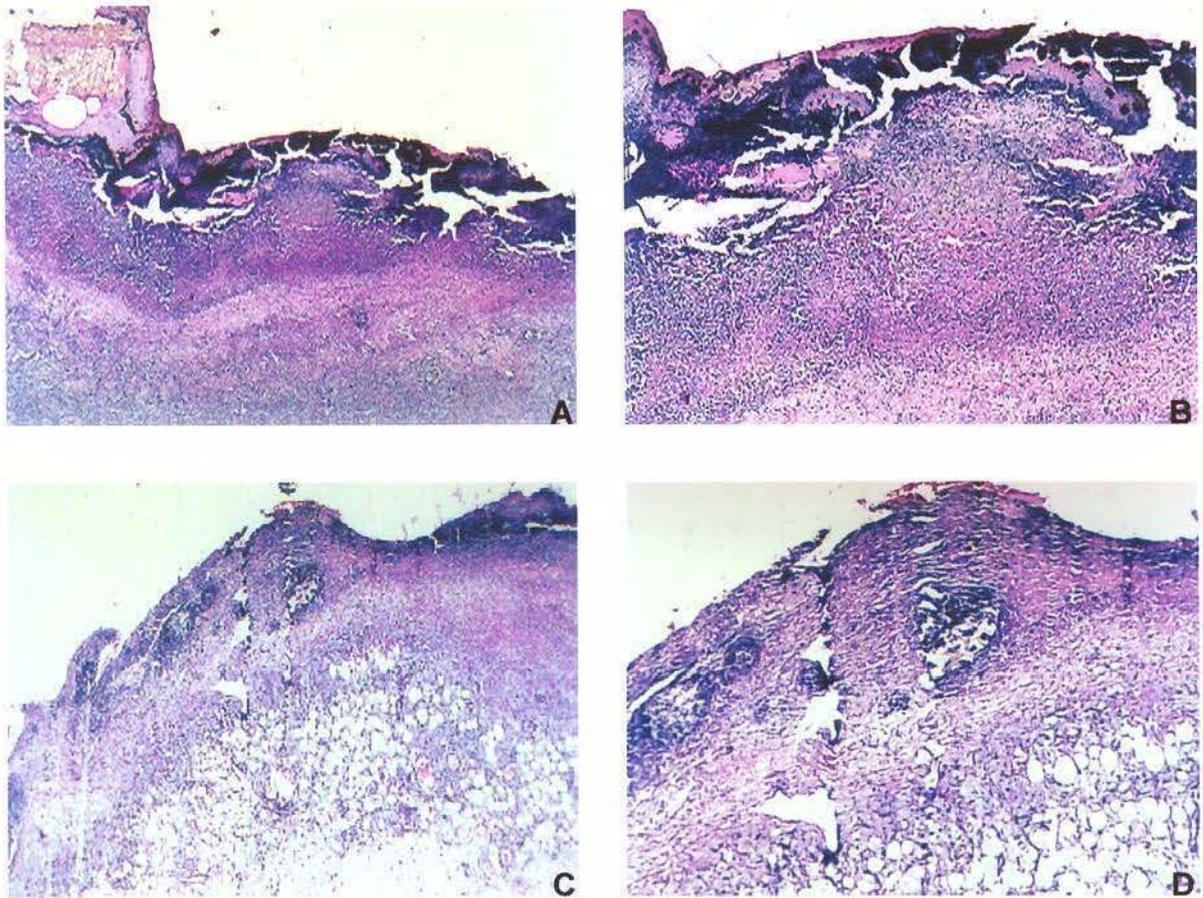


Figura 6. Fotomicrografias das amostras teciduais no 4º dia pós-operatório, submetidas à coloração por HE. **A:** animal diabético (*aumento original 2,5 x 1,25 x 10*); **B:** animal diabético (*aumento original 6,3 x 1,25 x 10*); **C:** animal diabético irradiado (*aumento original 2,5 x 1,25 x 10*); **D:** animal diabético irradiado (*aumento original 6,3 x 1,25 x 10*).

5. RESULTADOS

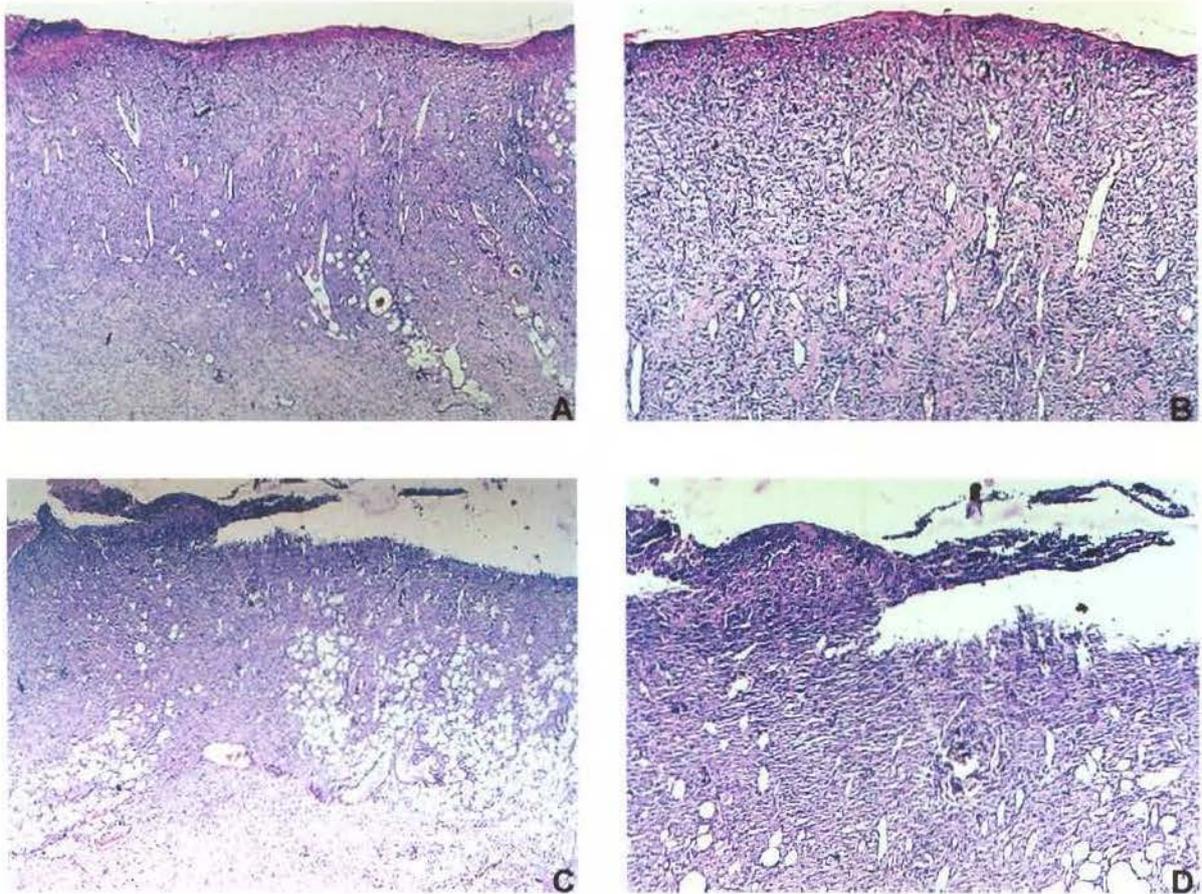


Figura 7. Fotomicrografias das amostras teciduais no 7º dia pós-operatório, submetidas à coloração por HE. **A:** animal-controle (*aumento original* 2,5 x 1,25 x 10); **B:** animal-controle (*aumento original* 6,3 x 1,25 x 10); **C:** animal normal irradiado (*aumento original* 2,5 x 1,25 x 10); **D:** animal normal irradiado (*aumento original* 6,3 x 1,25 x 10).

5. RESULTADOS

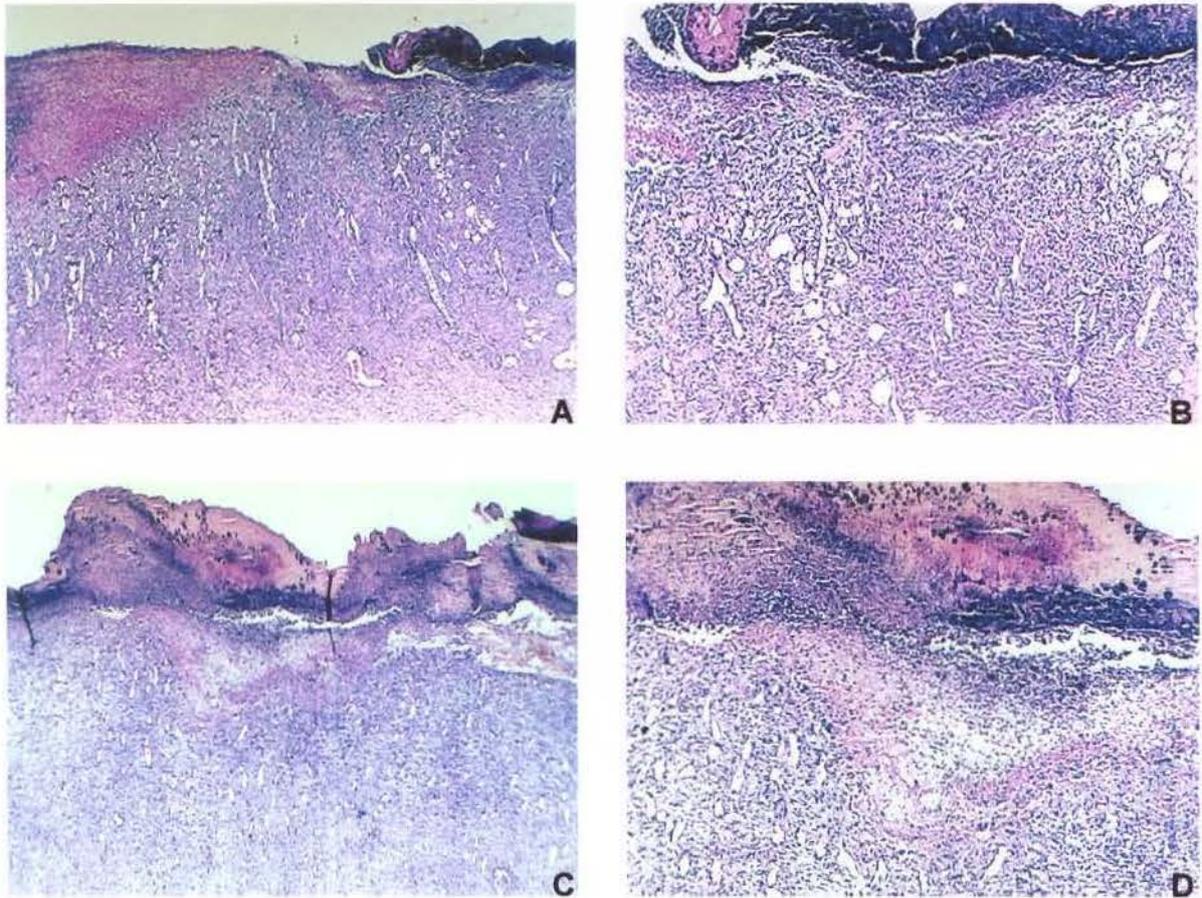


Figura 8. Fotomicrografias das amostras teciduais no 7º dia pós-operatório, submetidas à coloração por HE. **A:** animal diabético (*aumento original 2,5 x 1,25 x 10*); **B:** animal diabético (*aumento original 6,3 x 1,25 x 10*); **C:** animal diabético irradiado (*aumento original 2,5 x 1,25 x 10*); **D:** animal diabético irradiado (*aumento original 6,3 x 1,25 x 10*).

5. RESULTADOS

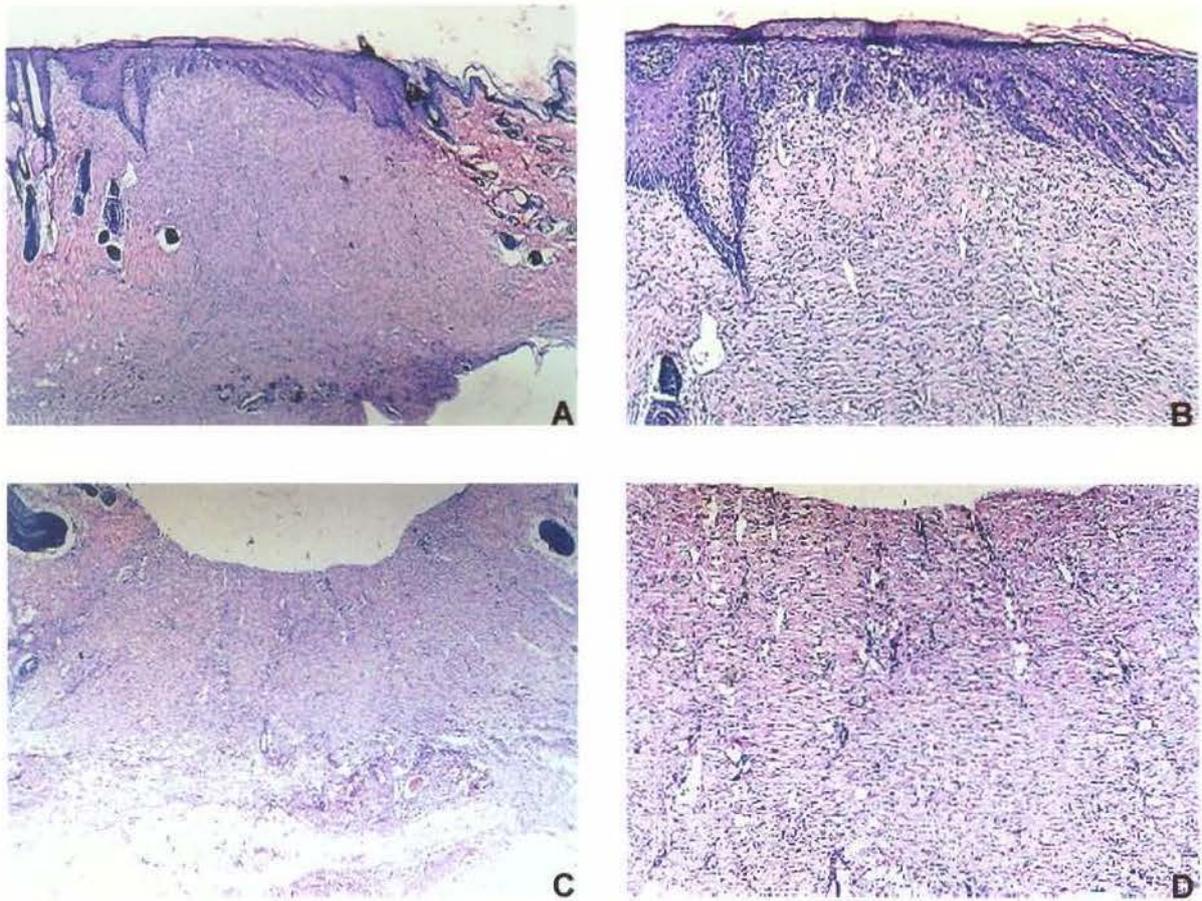


Figura 9. Fotomicrografias das amostras teciduais no 13^o dia pós-operatório, submetidas à coloração por HE. **A:** animal-controle (*aumento original 2,5 x 1,25 x 10*); **B:** animal-controle (*aumento original 6,3 x 1,25 x 10*); **C:** animal normal irradiado (*aumento original 2,5 x 1,25 x 10*); **D:** animal normal irradiado (*aumento original 6,3 x 1,25 x 10*).

5. RESULTADOS

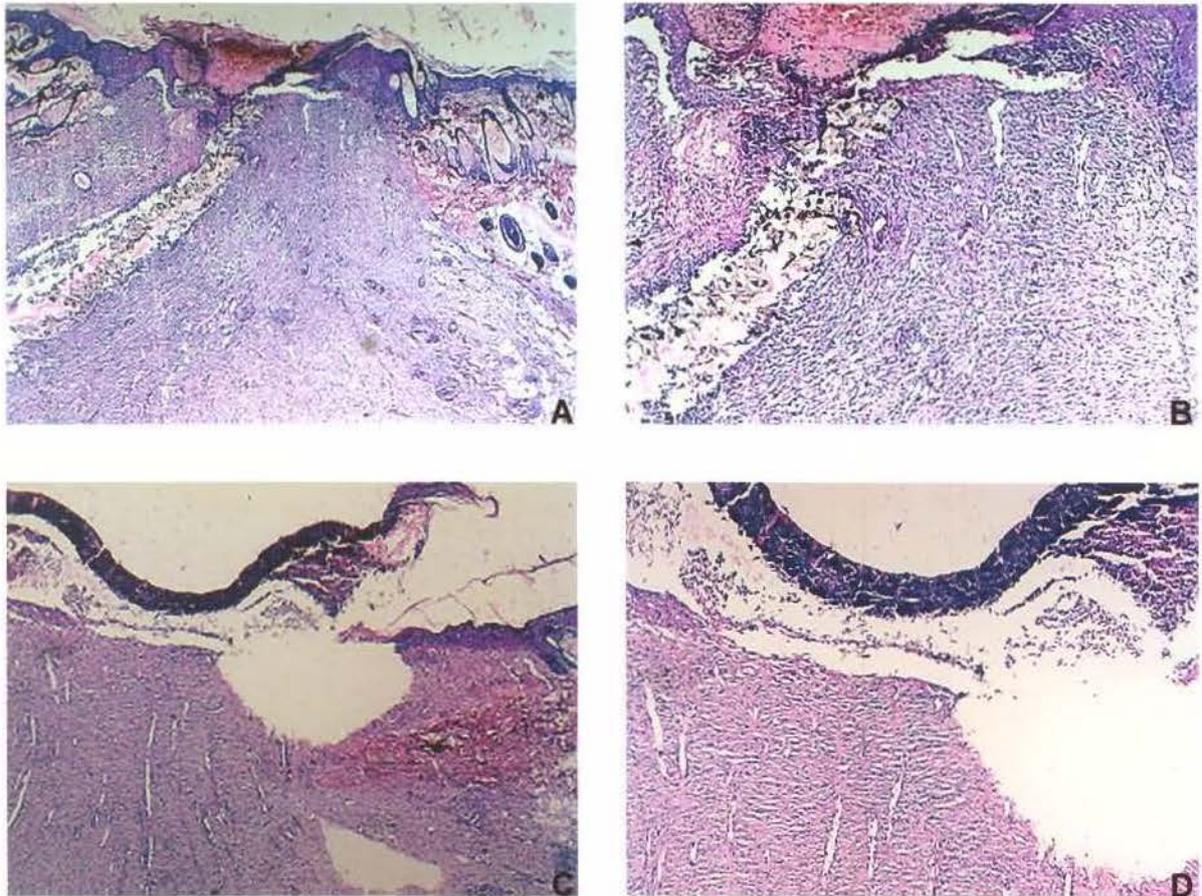


Figura 10. Fotomicrografias das amostras teciduais no 13º dia pós-operatório, submetidas à coloração por HE. **A:** animal diabético (*aumento original 2,5 x 1,25 x 10*); **B:** animal diabético (*aumento original 6,3 x 1,25 x 10*); **C:** animal diabético irradiado (*aumento original 2,5 x 1,25 x 10*); **D:** animal diabético irradiado (*aumento original 6,3 x 1,25 x 10*).

5. RESULTADOS

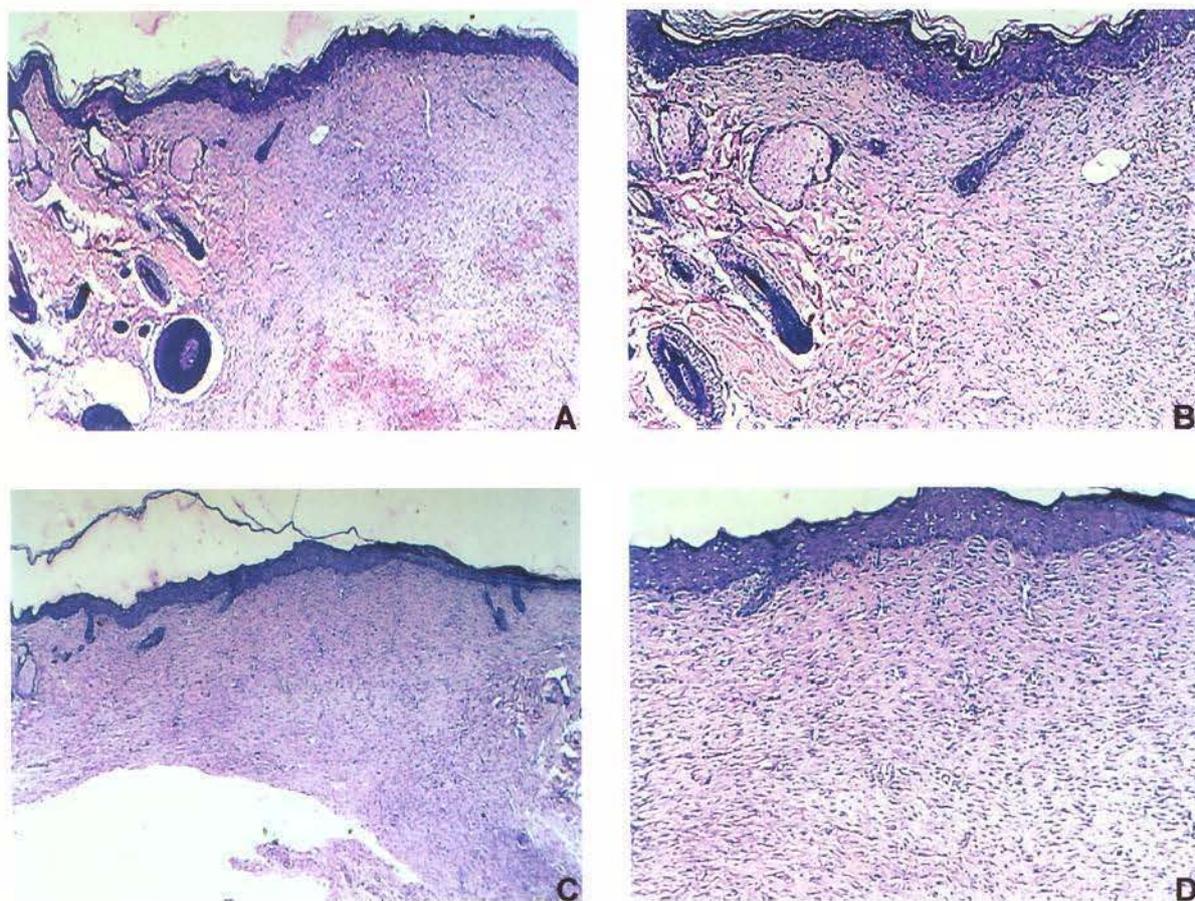


Figura 11. Fotomicrografias das amostras teciduais no 21º dia pós-operatório, submetidas à coloração por HE. **A:** animal-controle (*aumento original 2,5 x 1,25 x 10*); **B:** animal-controle (*aumento original 6,3 x 1,25 x 10*); **C:** animal normal irradiado (*aumento original 2,5 x 1,25 x 10*); **D:** animal normal irradiado (*aumento original 6,3 x 1,25 x 10*).

5. RESULTADOS

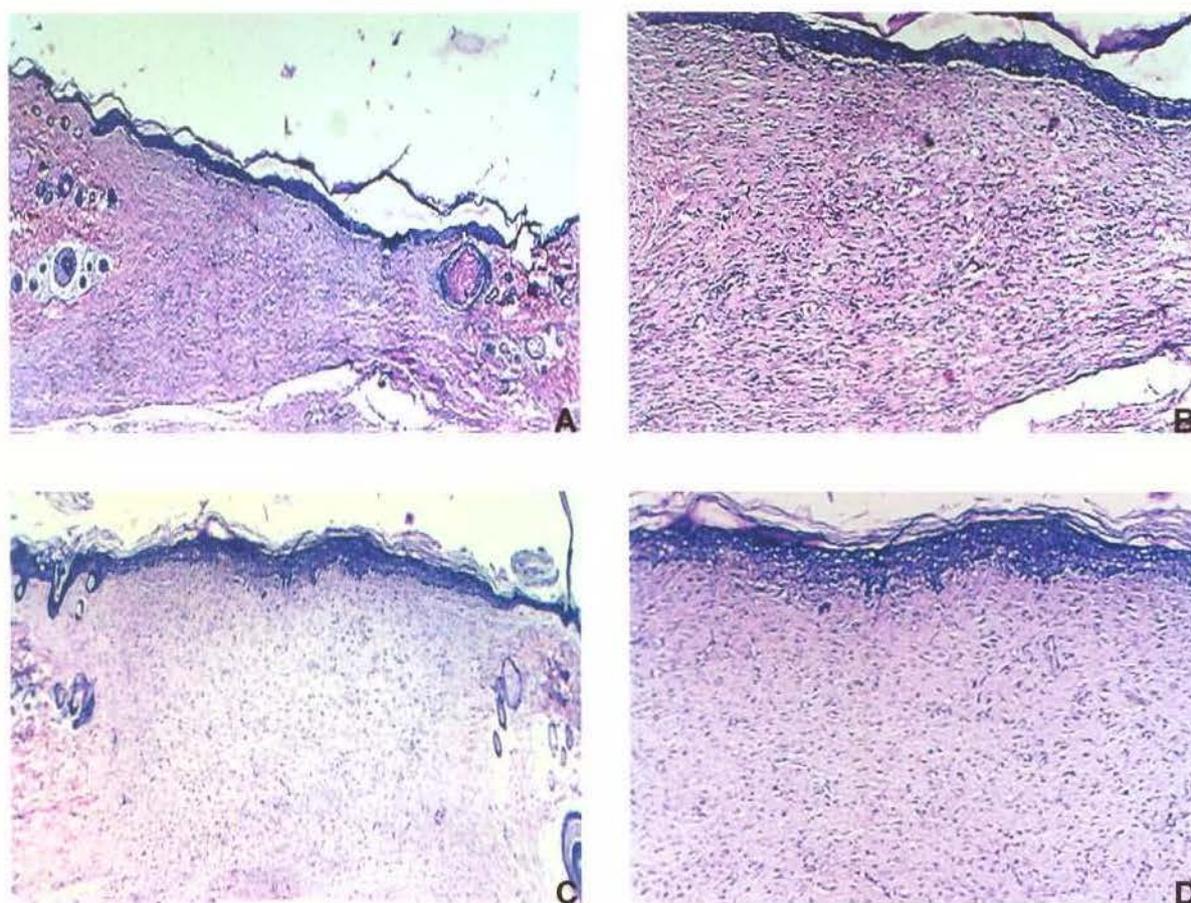


Figura 12. Fotomicrografias das amostras teciduais no 21º dia pós-operatório, submetidas à coloração por HE. **A:** animal diabético (*aumento original 2,5 x 1,25 x 10*); **B:** animal diabético (*aumento original 6,3 x 1,25 x 10*); **C:** animal diabético irradiado (*aumento original 2,5 x 1,25 x 10*); **D:** animal diabético irradiado (*aumento original 6,3 x 1,25 x 10*).

5. RESULTADOS

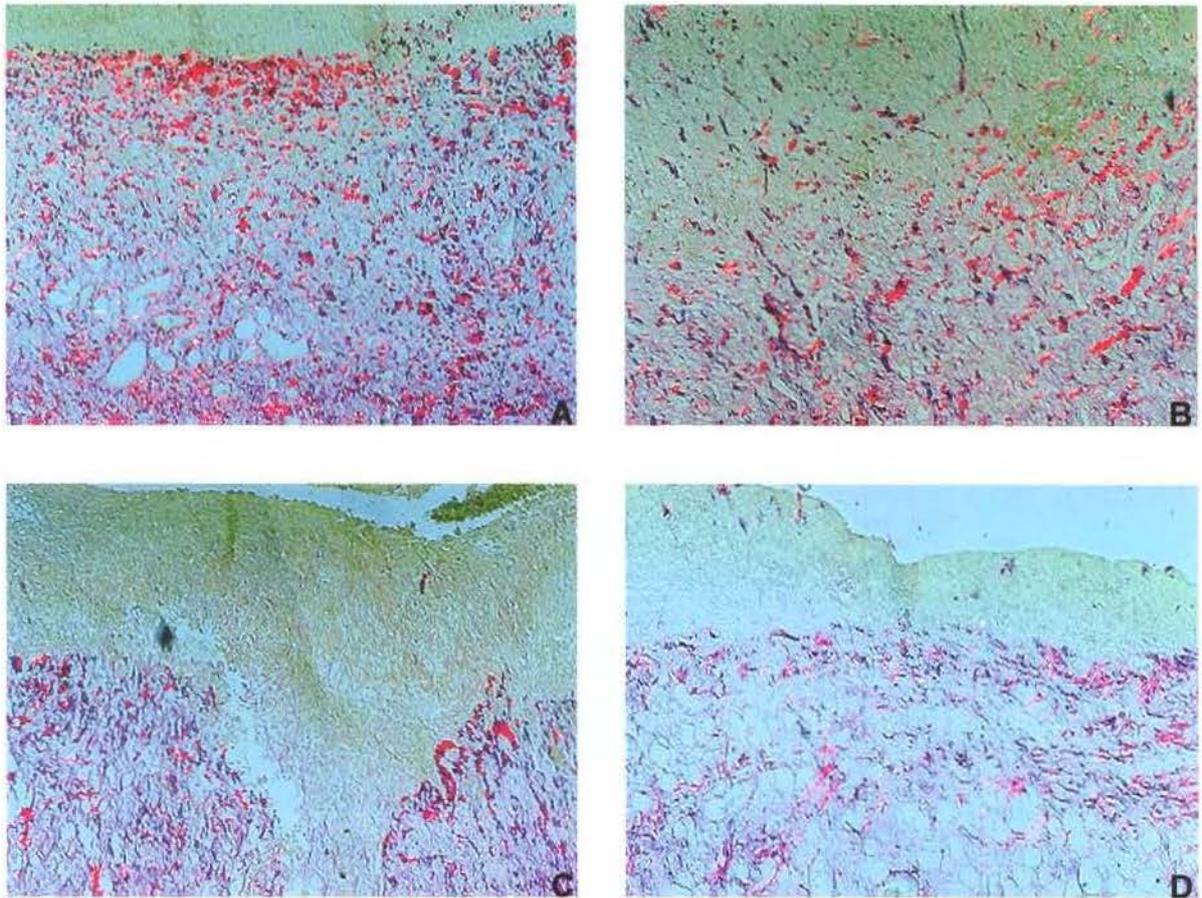


Figura 13. Fotomicrografias das amostras teciduais no 4^o dia pós-operatório, submetidas à coloração por picosirius. **A:** animal-controle; **B:** animal normal irradiado; **C:** animal diabético; **D:** animal diabético irradiado. *Aumento original 6,3 x 1,25 x 10.*

5. RESULTADOS

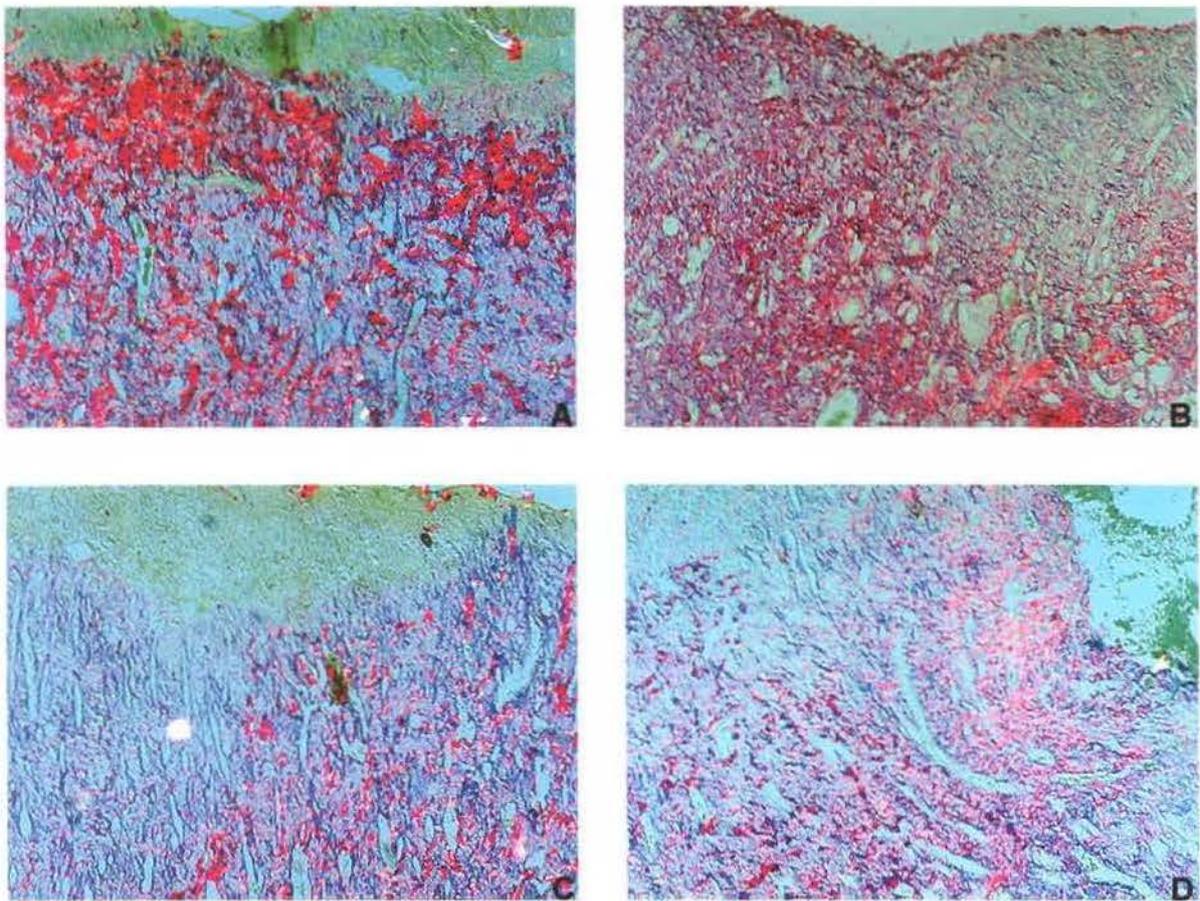


Figura 14. Fotomicrografias das amostras teciduais no 7º dia pós-operatório, submetidas à coloração por picosirius. **A:** animal-controle; **B:** animal normal irradiado; **C:** animal diabético; **D:** animal diabético irradiado. *Aumento original 6,3 x 1,25 x 10.*

5. RESULTADOS

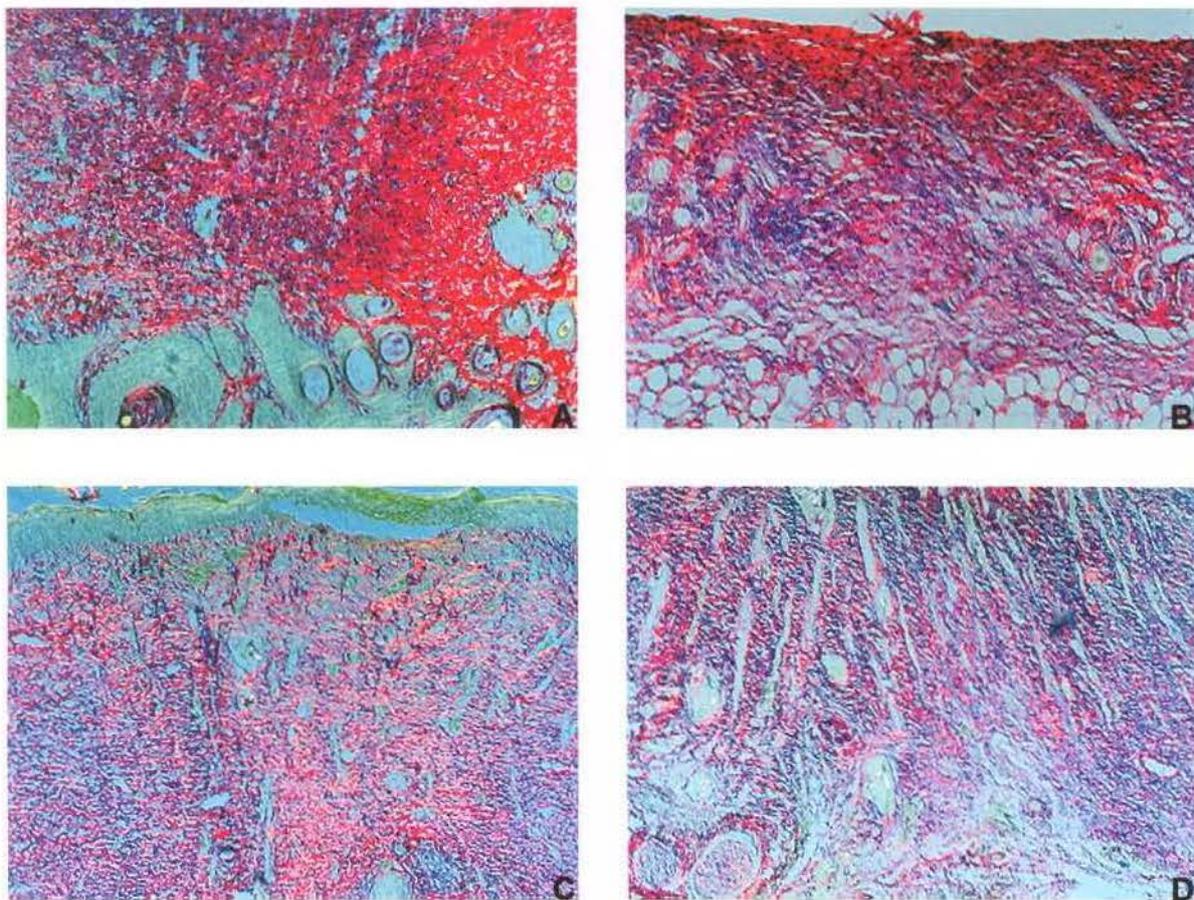


Figura 15. Fotomicrografias das amostras teciduais no 13^o dia pós-operatório, submetidas à coloração por picosirius. **A:** animal-controle; **B:** animal normal irradiado; **C:** animal diabético; **D:** animal diabético irradiado. Aumento original 6,3 x 1,25 x 10.

5. RESULTADOS

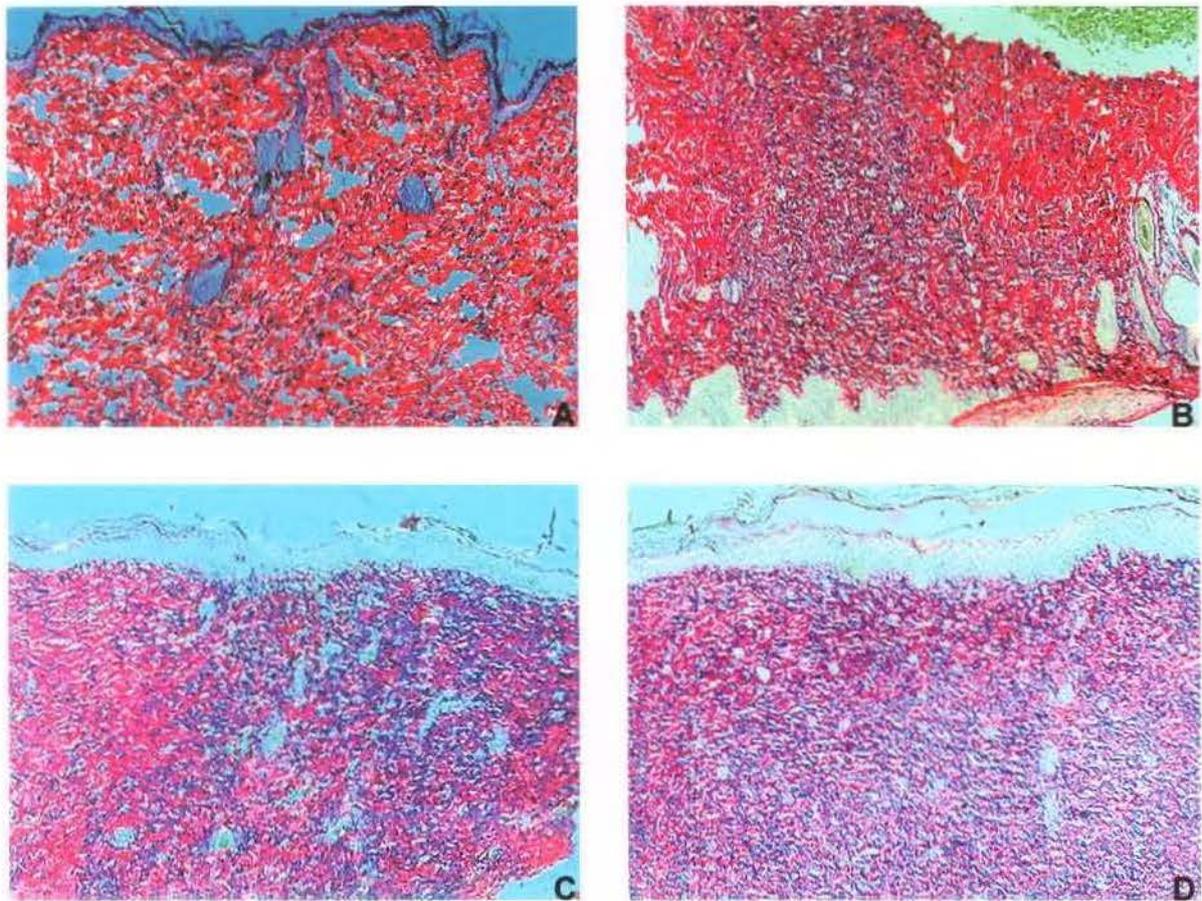


Figura 16. Fotomicrografias das amostras teciduais no 21º dia pós-operatório, submetidas à coloração por picosirius. **A:** animal-controle; **B:** animal normal irradiado; **C:** animal diabético; **D:** animal diabético irradiado. *Aumento original 6,3 x 1,25 x 10.*

5. RESULTADOS

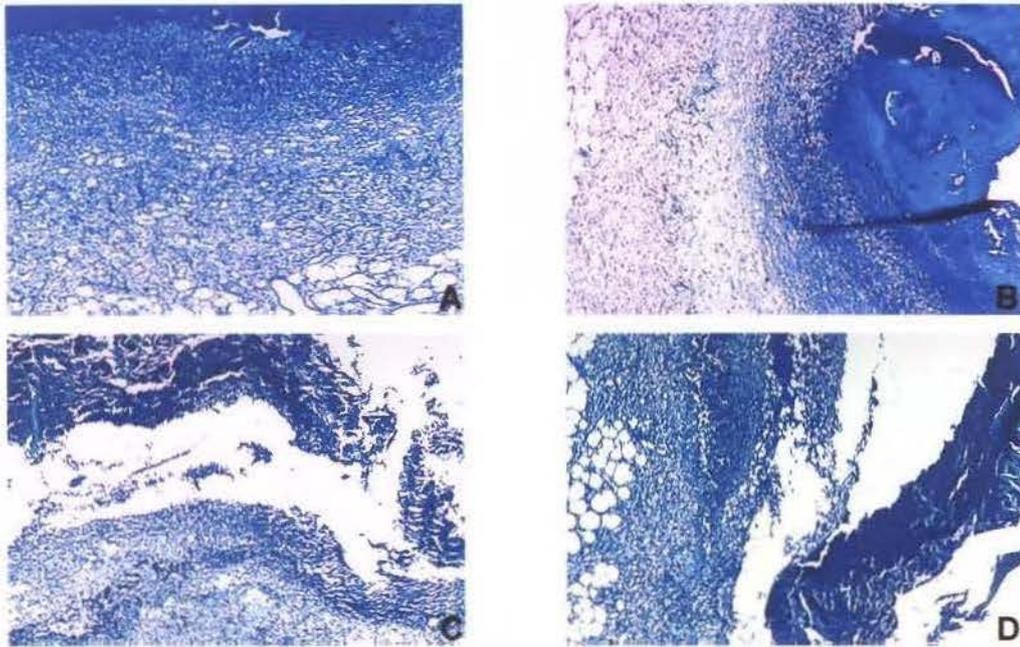


Figura 17. Fotomicrografias das amostras teciduais no 4º dia pós-operatório, submetidas à reação histoquímica com o azul de toluidina. A: animal-controle (↔), paralela ao plano de polarização da luz); B: animal-controle (⊥), perpendicular ao plano de polarização da luz); C: animal normal irradiado (↔), paralela ao plano de polarização da luz); D: animal normal irradiado (⊥, perpendicular ao plano de polarização da luz). Aumento original 6,3 x 1,25 x 10.

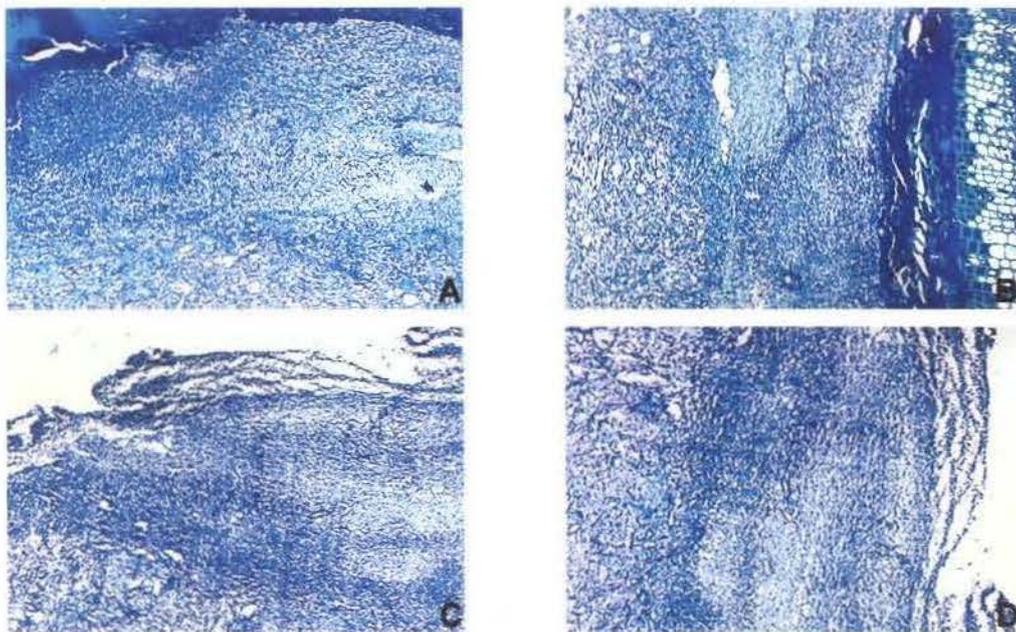


Figura 18. Fotomicrografias das amostras teciduais no 4º dia pós-operatório, submetidas à reação histoquímica com o azul de toluidina. A: animal diabético (↔), paralela ao plano de polarização da luz); B: animal diabético (⊥, perpendicular ao plano de polarização da luz); C: animal diabético irradiado (↔, paralela ao plano de polarização da luz); D: animal diabético irradiado (⊥, perpendicular ao plano de polarização da luz). Aumento original 6,3 x 1,25 x 10.

5. RESULTADOS

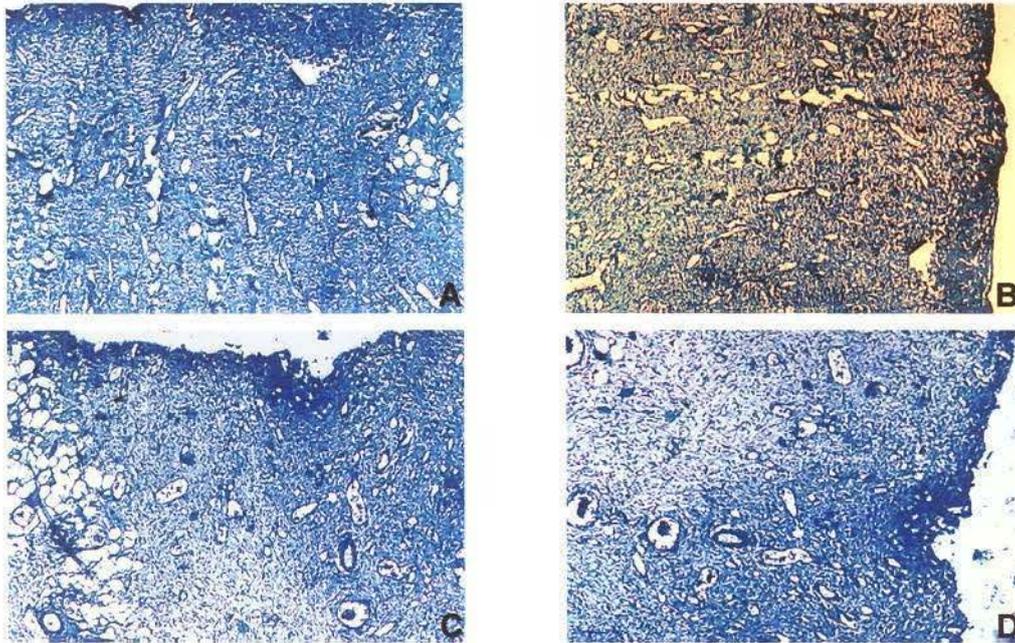


Figura 19. Fotomicrografias das amostras teciduais no 7º dia pós-operatório, submetidas à reação histoquímica com o azul de toluidina. **A:** animal-controle (↔), paralela ao plano de polarização da luz); **B:** animal-controle (⊥), perpendicular ao plano de polarização da luz); **C:** animal normal irradiado (↔, paralela ao plano de polarização da luz); **D:** animal normal irradiado (⊥, perpendicular ao plano de polarização da luz). *Aumento original 6,3 x 1,25 x 10.*

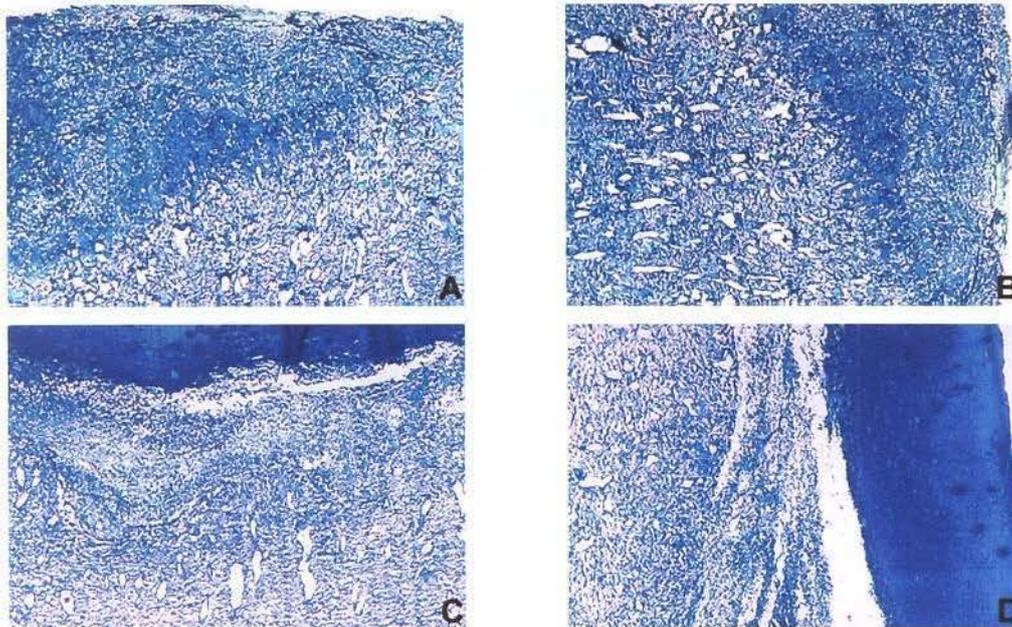


Figura 20. Fotomicrografias das amostras teciduais no 7º dia pós-operatório, submetidas à reação histoquímica com o azul de toluidina. **A:** animal diabético (↔, paralela ao plano de polarização da luz); **B:** animal diabético (⊥, perpendicular ao plano de polarização da luz); **C:** animal diabético irradiado (↔, paralela ao plano de polarização da luz); **D:** animal diabético irradiado (⊥, perpendicular ao plano de polarização da luz). *Aumento original 6,3 x 1,25 x 10.*

5. RESULTADOS

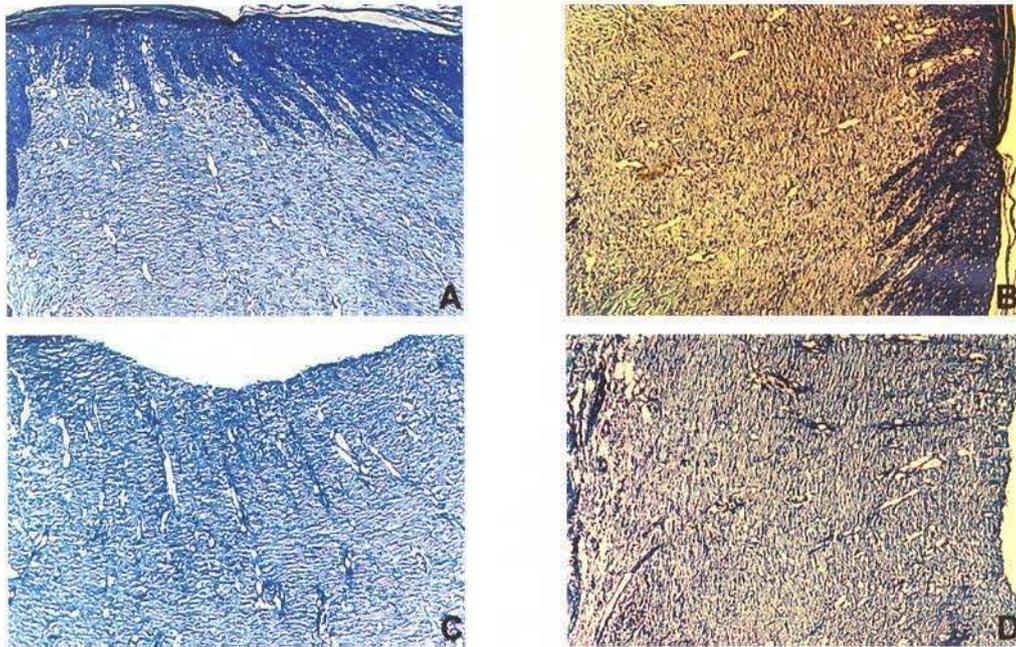


Figura 21. Fotomicrografias das amostras teciduais no 13º dia pós-operatório, submetidas à reação histoquímica com o azul de toluidina. **A:** animal-controle (↔, paralela ao plano de polarização da luz); **B:** animal-controle (⊥, perpendicular ao plano de polarização da luz); **C:** animal normal irradiado (↔, paralela ao plano de polarização da luz); **D:** animal normal irradiado (⊥, perpendicular ao plano de polarização da luz). *Aumento original 6,3 x 1,25 x 10.*

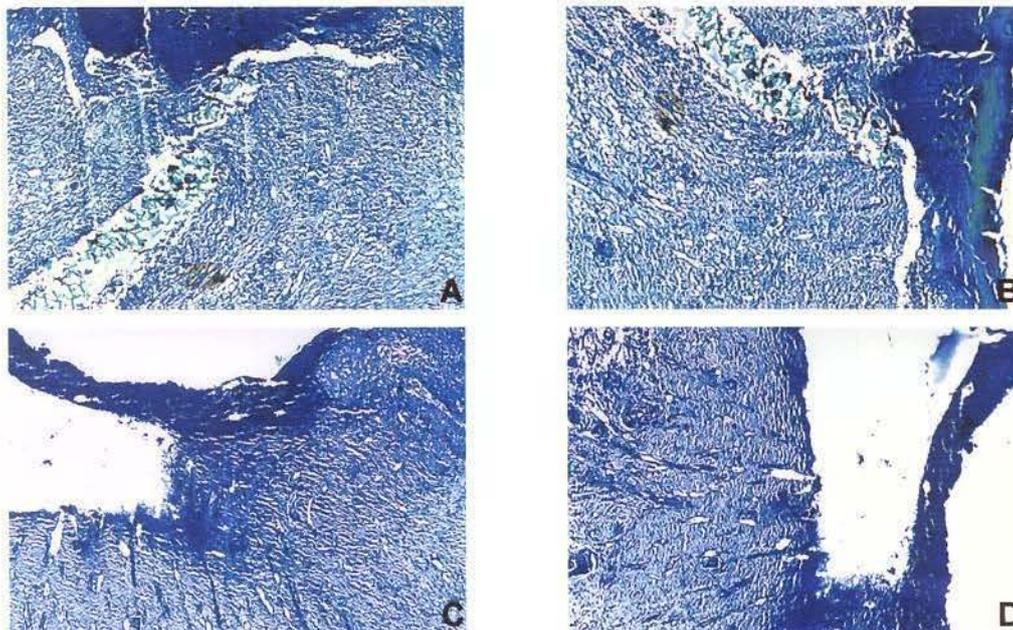


Figura 22. Fotomicrografias das amostras teciduais no 13º dia pós-operatório, submetidas à reação histoquímica com o azul de toluidina. **A:** animal diabético (↔, paralela ao plano de polarização da luz); **B:** animal diabético (⊥, perpendicular ao plano de polarização da luz); **C:** animal diabético irradiado (↔, paralela ao plano de polarização da luz); **D:** animal diabético irradiado (⊥, perpendicular ao plano de polarização da luz). *Aumento original 6,3 x 1,25 x 10.*

5. RESULTADOS

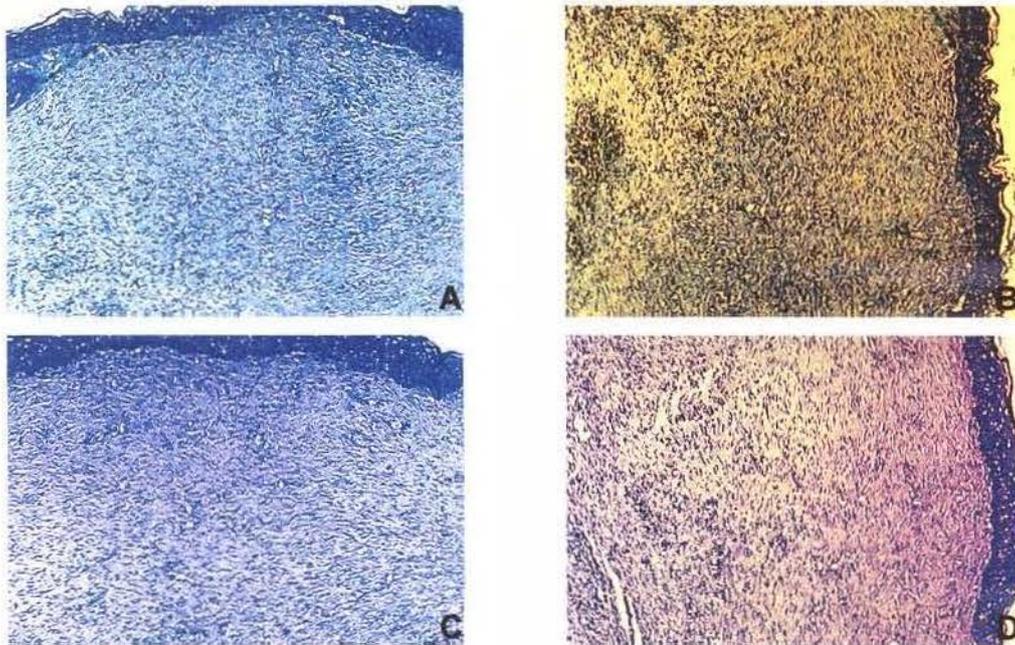


Figura 23. Fotomicrografias das amostras teciduais no 21º dia pós-operatório, submetidas à reação histoquímica com o azul de toluidina. **A:** animal-controle (↔), paralela ao plano de polarização da luz; **B:** animal-controle (⊥), perpendicular ao plano de polarização da luz; **C:** animal normal irradiado (↔), paralela ao plano de polarização da luz; **D:** animal normal irradiado (⊥, perpendicular ao plano de polarização da luz). Aumento original 6,3 x 1,25 x 10.

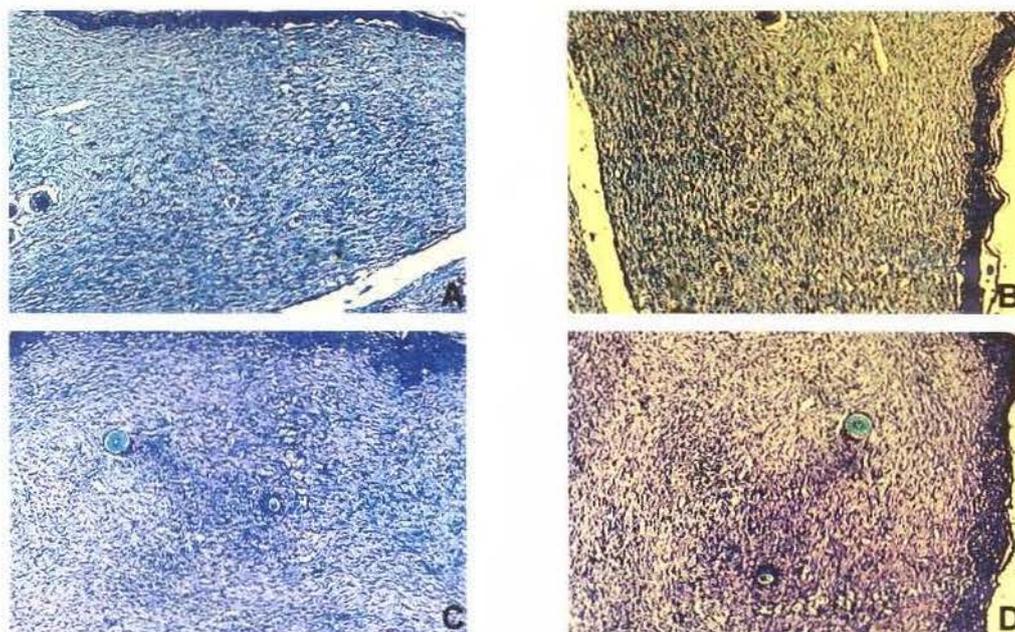


Figura 24. Fotomicrografias das amostras teciduais no 21º dia pós-operatório, submetidas à reação histoquímica com o azul de toluidina. **A:** animal diabético (↔), paralela ao plano de polarização da luz; **B:** animal diabético (⊥), perpendicular ao plano de polarização da luz; **C:** animal diabético irradiado (↔), paralela ao plano de polarização da luz; **D:** animal diabético irradiado (⊥, perpendicular ao plano de polarização da luz). Aumento original 6,3 x 1,25 x 10.

5. RESULTADOS

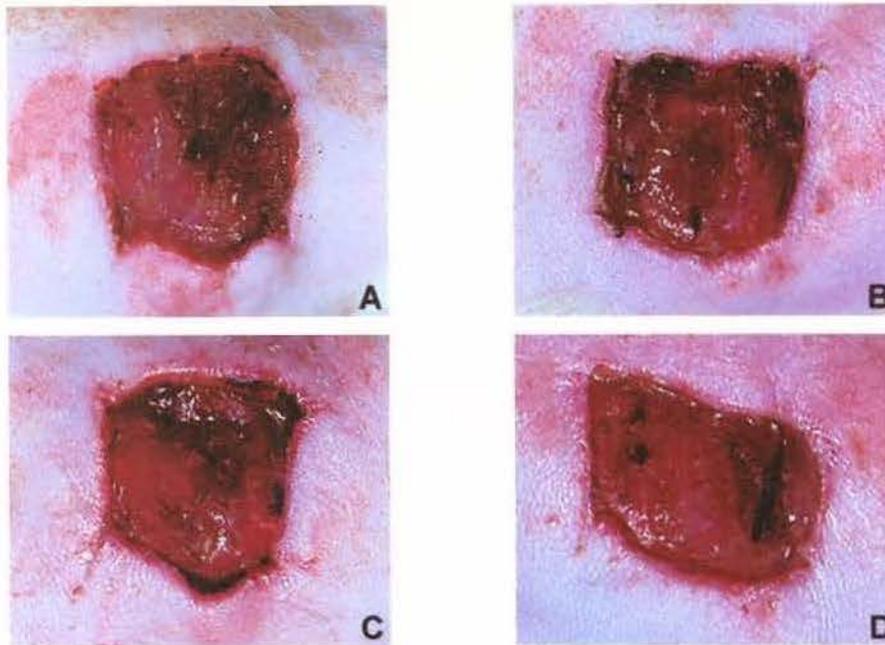


Figura 25. Aspecto macroscópico das feridas no 4º dia pós-operatório. **A:** animal-controle; **B:** animal normal irradiado; **C:** animal diabético; **D:** animal diabético irradiado.

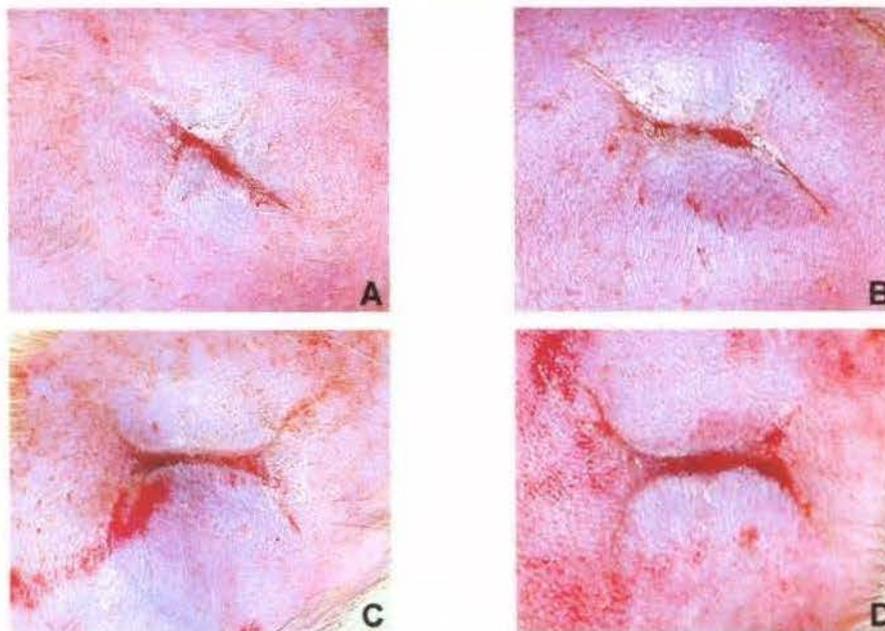


Figura 26. Aspecto macroscópico das feridas no 21º dia pós-operatório. **A:** animal-controle; **B:** animal normal irradiado; **C:** animal diabético; **D:** animal diabético irradiado.

5. RESULTADOS

6. DISCUSSÃO

A descoberta da radiação X por Wilhelm Conrad Röntgen, em 1895, a despeito da grande contribuição para vários seguimentos do campo científico, principalmente na área de saúde, também implicou em danos biológicos significantes. Com o passar do tempo, o estudo da interação radiação ionizante-tecidos vivos tornou-se um assunto de crescente relevância, dando origem à radiobiologia. Esta ciência, que tem por objetivo a pesquisa dos efeitos biológicos da irradiação, propicia o respaldo para que os profissionais técnicos ou especialistas em radiologia se protejam e ofereçam proteção a todos os indivíduos expostos às radiações ionizantes, bem como procurem aumentar os benefícios e reduzir ao máximo os danos radiobiológicos.

À exceção dos acidentes envolvendo material radioativo, como os que ocorreram em Hiroshima, Nagasaki, Chernobyl e Goiânia, e, do tratamento reabilitador em pacientes submetidos à radioterapia, a oportunidade de se estudar os efeitos das radiações ionizantes nos tecidos humanos é deveras escassa.

Dessa forma, os animais de laboratório aparecem como uma alternativa viável às experimentações radiobiológicas. Obviamente, existem ressalvas ao emprego dos resultados obtidos em animais para a comparação com humanos, tendo em vista as diferenças fisiológicas, nutricionais e ambientais.

Na rotina da prática clínica, não são raros os casos em que é necessária a irradiação de regiões anatômicas em processo de cicatrização, seja essa irradiação com finalidade de diagnóstico ou terapêutica. Essas situações exigem um conhecimento básico do profissional acerca dos efeitos radiobiológicos sobre o tecido de granulação, uma vez que é de sua inteira responsabilidade a análise da relação risco-benefício, bem como o planejamento da irradiação de modo a minimizar a ação deletéria às estruturas teciduais. Estas constatações motivaram o desenvolvimento de diversas pesquisas radiobiológicas, dentre elas, as que foram realizadas por POHLE *et al.*⁵⁴ (1931); POHLE *et al.*⁵³ (1949); GRILLO & POTSAID³⁴ (1961); GRILLO³³ (1963); ITOIZ *et al.*³⁹ (1969); VAN DEN BRENK *et al.*⁶⁴ (1974); GUIDUGLI NETO³⁵ (1987); GORODETSKY *et al.*³¹ (1988); RAVELI *et al.*⁵⁵ (1990); ABDALLA *et al.*¹ (1991); WATANABE *et al.*⁶⁷ (1994); ALMEIDA² (1997); MONTEIRO⁴⁸ (1999) e LOURENÇO⁴⁵ (2000).

Em se tratando de diagnóstico por imagens, a maioria das modalidades que empregam radiação ionizante determina a exposição cutânea. No que concerne à radioterapia, BERNSTEIN *et al.*⁷ (1993) explicaram que as injúrias decorrentes da aplicação de feixes externos manifestam-se inicialmente na pele. Levando em conta inúmeros trabalhos publicados sobre os efeitos das radiações

ionizantes nos diversos componentes dérmicos e epidérmicos, ponderou-se que a cicatrização por segunda intenção seria preferível, neste modelo experimental, por depender não apenas da formação do tecido de granulação, mas também da contração e da epitelização do ferimento. Todos estes fenômenos envolvem a atividade de componentes celulares. Conforme GORODETSKY *et al.* ³¹ (1988), a influência da irradiação pós-operatória é modificada pela extensão do processo de reparação tecidual que já se completou. Esse princípio suporta as inferências de MOORE ⁵⁰ (1984), ALMEIDA ² (1997) e MONTEIRO ⁴⁸ (1999) acerca da maior radiosensibilidade relativa ao tecido conjuntivo num período de proliferação mais intensa, que, segundo os resultados obtidos a partir de estudos experimentais desenvolvidos pelos dois últimos pesquisadores, corresponderia ao 3º dia pós-operatório. Portanto, a escolha do 3º dia pós-cirúrgico para a irradiação foi baseada nos achados de ALMEIDA ² (1997) e MONTEIRO ⁴⁸ (1999), que empregaram uma metodologia muito similar à delineada para este trabalho experimental.

Nesta pesquisa radiobiológica, utilizou-se a radiação de elétrons por proporcionar um controle adequado da penetração dos feixes, sendo que a profundidade de dose máxima foi de aproximadamente 1cm. O poder de penetração da radiação de elétrons relaciona-se à energia dos feixes, que, uma vez estabelecida, permite deduzir-se corretamente a profundidade de penetração. O maior poder de penetração dos feixes de raios X implicaria em danos biológicos

muito além das camadas epidérmica e dérmica, podendo constituir-se em mais um fator de variação no processo de reparo.

De acordo com BAKER & KROCHAK ⁵ (1989), para indivíduos que estão sob condições que afetam adversamente o equilíbrio orgânico, como a hipertensão e a diabetes mellitus, a expressão dos danos por radiação pode ser mais severa e aumentar a morbidade associada a estas doenças. Afora a pesquisa experimental realizada por GARDINER *et al.* ²⁸ (1993), que sugeriu uma relação sinérgica entre o estado diabético e a irradiação local na determinação do dano vascular à retina, verifica-se a insuficiência de trabalhos científicos publicados que fazem alusão à ocorrência de um possível sinergismo, deste tipo, no processo de reparação tecidual.

A diabetes mellitus é a doença endócrina mais comum, sendo classificada em tipo 1 (DMID) e tipo 2 (DMNID). ZYKOVA *et al.* ⁷⁰ (2000) explicaram que os portadores de ambos os tipos de diabetes, 1 ou 2, freqüentemente apresentam complicações como susceptibilidade aumentada a infecções, reparação tecidual prejudicada, aterosclerose acelerada e outras manifestações inflamatórias e degenerativas. Conforme HAGEMAN & BUSCHARD ³⁶ (1994), os modelos animais provêem material para o exame dos fenômenos mais precoces na patogênese da DMID, pois tais investigações não podem ser realizadas em humanos devido à manifestação da doença ser precedida por diversos eventos subclínicos, que fogem ao controle do paciente e do profissional.

Neste trabalho, optou-se pela indução da DMID com SZ por ser este um agente citotóxico altamente específico para as células beta-pancreáticas, de meia-vida curta e ação rápida. Estas características foram importantes na eleição da SZ como substância diabetogênica, porque excluía uma outra variável a ser analisada no processo de reparo tecidual, que seria a influência de efeitos adversos decorrentes da ação sistêmica do medicamento. Segundo HAGEMAN & BUSCHARD ³⁶ (1994), a SZ é rapidamente eliminada da corrente sangüínea, apresentando meia-vida sérica de 15 minutos. JUNOD *et al.* ⁴⁰ (1967) observaram que a SZ promove a necrose das células beta do pâncreas, após 7 horas de sua administração, e, ao final de 24 horas, os níveis de insulina pancreática decrescem a valores menores que 5% do normal. Além do modelo químico de indução da diabetes mellitus, julgou-se que o estado de deficiência insulínica descontrolada mimetizaria mais fielmente os casos clínicos de complicações pós-cirúrgicas. Desse modo, a compensação da hiperglicemia com doses de insulina foi dispensada.

A interpretação das características morfológicas das amostras teciduais é relevante, pois os aspectos histológicos constituem-se em um indicador mais fidedigno, dos efeitos radiobiológicos, do que as características macroscópicas. O processo de reparo nos animais-controle seguiu a seqüência natural, que foi didaticamente relatada por autores como VIZIOLI ⁶⁵ (1971); FRANZÉN & NORRBY ²⁴ (1988); CLARK ¹⁶ (1988) e FELIX *et al.* ²² (1990). Assim, durante um período de 3 a 4 dias após o ferimento, predominaram os fenômenos vasculares que

determinam a infiltração de leucócitos polimorfonucleares, macrófagos e linfócitos. A partir de então, as células epiteliais entraram em processo de migração e, depois proliferação, para recobrir a ferida. Subseqüentemente, evidenciou-se a fase proliferativa, em que os fibroblastos apareceram e tiveram início a angiogênese e a fibrogênese. O desfecho da cicatrização ocorre às expensas de remodelamento e reorganização do tecido de granulação, no sentido de prover resistência tênsil e resiliência à pele, o que se dá ao longo de meses.

Quanto ao grupo de animais normais irradiados, verificou-se um atraso na fase proliferativa, com o estabelecimento tardio dos fenômenos de angiogênese e fibrogênese. A fibroplasia provavelmente se iniciou por volta – ou pouco tempo antes – do 13º dia da avaliação, nos animais normais irradiados, enquanto nos animais-controle já podia ser observada desde o 7º dia. No que concerne à angiogênese, a diferença de tempo foi menor, pois o início da neoformação vascular ocorreu ao 4º dia pós-operatório, nas amostras teciduais de animais-controle, ao passo que, no tecido de granulação dos animais normais irradiados esse fenômeno foi evidente no 7º dia do estudo. Os achados de ALMEIDA² (1997) e MONTEIRO⁴⁸ (1999), que também utilizaram a irradiação local por elétrons com 6MeV de energia, em dose única de 1Gy, corroboram esta constatação.

No grupo de animais diabéticos, observou-se um prolongamento da fase inflamatória até o 7º dia da avaliação. Por outro lado, nos animais diabéticos irradiados, esta fase parece ter sido inicialmente inibida, atingindo seu auge no 7º

dia. Quanto aos eventos de migração e proliferação epiteliais, ocorreu um atraso para ambos os grupos de animais diabéticos, em comparação com os animais normais, uma vez que estes fenômenos foram primeiramente evidenciados ao 13º dia do estudo. Nos dois grupos de animais normais, a migração e a proliferação epiteliais foram perceptíveis a partir do 7º dia da investigação. Em se tratando do acúmulo de fibroblastos e intensidade da fibrogênese, a irradiação parece ter potencializado o efeito prejudicial da diabetes. A interpretação comparativa das lâminas histológicas indicou que as amostras teciduais dos animais diabéticos possuíam poucos fibroblastos ao 7º dia, ao passo que, nos tecidos provenientes dos animais diabéticos irradiados, estas células foram evidenciadas somente no 13º dia. Nos animais-controle registrou-se esta característica no 4º dia da avaliação. O processo de fibrogênese apresentou-se incipiente no tecido de granulação dos animais diabéticos, ao 13º dia, sendo este aspecto mais severo nas amostras de indivíduos diabéticos irradiados. Ao 21º dia da avaliação, as características morfológicas dos tecidos de granulação pertencentes a ambos os grupos de animais diabéticos foram muito similares, embora denotassem um menor grau de evolução tecidual, se comparadas àquelas dos animais-controle.

A comparação das características observadas durante o estudo morfológico do tecido de granulação coletado de animais normais irradiados e diabéticos permite inferir-se que uma baixa dose da radiação de elétrons, neste caso equivalente a 1Gy, teve um efeito negativo sobre o processo de reparação tecidual menor que o estado diabético. Vale ressaltar que a intensidade do dano

biológico causado por um agente externo, como a radiação ionizante, e, por uma condição patológica sistêmica, como a diabetes mellitus, deve ser avaliada, em que pese a necessidade de eliminação ou compensação de um dos fatores supracitados no decorrer do tratamento.

O atraso nos eventos de proliferação fibroblástica e fibrogênese tem implicações nos fenômenos de contração e aumento em resistência tênsil da área ferida, haja vista que, neste período, os fibroblastos desenvolvem uma alteração fenotípica, transformando-se em miofibroblastos – células dotadas de capacidade contrátil. Segundo CLARK ¹⁶ (1988), os miofibroblastos se alinham paralelamente à camada epitelial superficial e movimentam-se, de modo a exercer um efeito de aproximação das margens do ferimento. Além disso, os fibroblastos são fundamentais à fibrogênese, pois secretam o colágeno, que é a proteína responsável pelo ganho em resistência tênsil. Os resultados do estudo realizado por STAJIÉ & MILOVANOVIÉ ⁶⁰ (1970) suportam o conceito de paralelismo e correlação direta entre o processo de síntese do colágeno e o ganho em resistência tênsil, da área do ferimento, durante a reparação tecidual.

Em termos de retardo na contração de feridas, GRILLO & POTSAID ³⁴ (1961) verificaram a ocorrência de efeitos danosos, com a aplicação de uma dose única equivalente a 750R de radiação X, de 12 horas até 4 dias após o procedimento cirúrgico. ITOIZ *et al.* ³⁹ (1969), que estudaram os efeitos da irradiação com 6.000rad de raios X, no 3º dia pós-operatório, constataram a ocorrência de uma forte inibição da proliferação fibroblástica, bem como de um

retardo na contração tecidual, que foi atribuído à orientação precária da movimentação celular.

VAN DEN BRENK *et al.*⁶⁴ (1974); MOORE⁵⁰ (1984); RUDOLPH *et al.*⁵⁷ (1988) e RAVELI *et al.*⁵⁵ (1990) sugeriram que a irradiação ocasiona uma diminuição na proliferação fibroblástica. De acordo com POHLE *et al.*⁵³ (1949); GRILLO & POTSAID³⁴ (1961) e BERNSTEIN *et al.*⁷ (1993), além do decréscimo na proliferação, a irradiação também determina alterações morfo-funcionais nos fibroblastos, que apresentam-se como células bizarras – com características anormais. A ação deletéria das radiações ionizantes sobre as células foi abordada por FRIGERIO²⁶ (1967) e BAILEY⁴ (1968). Esses autores explicaram que as radiações de baixa transferência linear de energia (LET), como os raios X e os elétrons, produzem grandes quantidades de radicais livres que causam dano ao DNA, principalmente, por ação indireta. DRAKE & OISHI¹⁹ (1995) relataram que os efeitos radiobiológicos sobre os elementos celulares parecem ser progressivos e permanentes. É interessante salientar que os fibroblastos são responsáveis pela biossíntese das GAGs e do tropocolágeno, e, alterações funcionais nestas células comprometem a secreção das referidas macromoléculas, que são constituintes primordiais da matriz extracelular do tecido de granulação.

Segundo LOOTS *et al.*⁴⁴ (1999), os distúrbios da reparação tecidual em pacientes diabéticos são detectados nas fases inflamatória e de proliferação fibroblástica, que é acompanhada pela fibrogênese. WETZLER *et al.*⁶⁹ (2000) sugeriram que a manutenção da fase inflamatória pode contribuir para o atraso no

processo de reepitelização, fenômeno que foi observado no presente trabalho. TENGRUP *et al.*⁶¹ (1988); FELIX *et al.*²² (1990); WETZLER *et al.*⁶⁹ (2000) e ZYKOVA *et al.*⁷⁰ (2000) apontaram não só a persistência do processo inflamatório durante a cicatrização, mas também a ocorrência de disfunções nos leucócitos polimorfonucleares e macrófagos. FELIX *et al.*²² (1990) sugeriram que a explicação para esses distúrbios funcionais reside no fato de processos importantes, como a fagocitose e a quimiotaxia, dependerem da insulina para a obtenção de energia. CARRICO *et al.*¹⁰ (1984) explicaram que os macrófagos, além de controlarem as infecções, desempenham uma função relevante na indução da síntese de colágeno. ZYKOVA *et al.*⁷⁰ (2000) verificaram um decréscimo significativo na secreção de citocinas, como a IL-1 β e o TNF- α , pelos macrófagos de animais diabéticos. A IL-1 β e o TNF- α possuem propriedades mitogênicas e quimiotáticas para fibroblastos, bem como estimulam a síntese de colágeno. WANG *et al.*⁶⁶ (1994) esclareceram que os macrófagos e seus fatores dependentes modulam a proliferação fibroblástica, além de influenciarem a síntese e a degradação dos feixes de fibras colágenas. Portanto, seria razoável supor que a disfunção dos macrófagos contribui, pelo menos em parte, para o atraso na fase proliferativa da reparação tecidual.

Outra explicação para o retardo na fase proliferativa do reparo tecidual pode estar relacionada a desequilíbrios funcionais e proliferativos, nos fibroblastos, em decorrência da hiperglicemia ou falta de insulina. WERINGER & ARQUILLA⁶⁸ (1981) observaram que os fibroblastos de animais diabéticos

apresentavam sinais de degeneração interna. FRANZÉN & NORRBY²⁴ (1988) constataram uma redução no índice mitótico de fibroblastos, no tecido de granulação do mesentério de ratos diabéticos. LOOTS *et al.*⁴⁴ (1999) verificaram que os fibroblastos de pacientes diabéticos apresentavam não apenas deficiência na capacidade reprodutiva, mas também alterações morfológicas consistentes com distúrbios funcionais.

KAMAL *et al.*⁴¹ (1996) explicaram que vários mecanismos fisiológicos estão envolvidos na patogênese das complicações associadas à reparação tecidual, em pacientes diabéticos. Entretanto, um dos principais desarranjos bioquímicos, que determinam prejuízos no reparo, é a formação dos produtos finais e irreversíveis da glicosilação não enzimática. Como sintetizaram NEVINS *et al.*⁵¹ (1998) este distúrbio metabólico, caracterizado por interações da glicose com grupamentos *amina* reativos presentes em proteínas, relaciona-se a aumentos na taxa glicêmica. Os compostos irreversíveis da glicosilação não enzimática podem alterar diretamente o DNA e as proteínas nucleares, interferindo nos processos de adesão e crescimento das células, no tecido de granulação.

Em relação à fibrogênese, especificamente, os dados obtidos com o emprego do método do picosirius ratificam as observações descritas acerca do atraso na fase proliferativa do reparo tecidual. Aos 4 dias do estudo, constatou-se uma diferença sensível em termos de intensidade da birrefringência, que foi maior no tecido de granulação dos animais-controle. Contudo, mostrou-se bastante tênue nas amostras teciduais dos animais diabéticos irradiados. Não obstante

tenha ocorrido um aumento progressivo da birrefringência, pois o tecido de granulação evoluiu, no 21º dia da investigação, foi possível verificar que os animais-controle apresentaram um tecido de granulação com maior quantidade de feixes de fibras colágenas e mais organizado, em comparação com as amostras provenientes de animais normais irradiados, diabéticos e diabéticos irradiados. As características observadas nas amostras teciduais de animais diabéticos irradiados, que foram mais acentuadas em comparação com as evidenciadas para os animais normais irradiados e diabéticos, sugerem que a dose única de 1Gy da radiação de elétrons com 6MeV de energia potencializou o efeito prejudicial da diabetes mellitus sobre a fibrogênese. Estes resultados implicam em duas hipóteses não excludentes: 1. pode ter ocorrido um decréscimo na biossíntese dos feixes de fibras colágenas; 2. os feixes de fibras colágenas que se formaram não atingiram um estado de organização similar àquele dos animais-controle, em consequência de danos estruturais ou como um reflexo de alterações no metabolismo das GAGs.

POHLE *et al.*⁵³ (1949) sugeriram que baixas doses de radiação X podem causar alterações na produção das substâncias pré-colagenosa e colagenosa. GRILLO & POTSAID³⁴ (1961); VAN DEN BRENK *et al.*⁶⁴ (1974) e ABDALLA *et al.*¹ (1991) observaram uma deficiência na neo-formação de feixes de fibras colágenas, no tecido de granulação, presente na pele submetida à irradiação pós-operatória.

Uma redução significativa na quantidade de feixes de fibras colágenas, presentes no tecido de granulação de animais diabéticos, foi observada por GLICKMAN *et al.*²⁹ (1967); CATANZARO GUIMARÃES¹⁴ (1968), WERINGER & ARQUILLA⁶⁸ (1981); SPANHEIMER *et al.*⁵⁹ (1988); TENGRUP *et al.*⁶¹ (1988); BLACK *et al.*⁹ (1989) e DEVLIN *et al.*¹⁸ (1996). Para TENGRUP *et al.*⁶¹ (1988), a reação inflamatória persistente, com o acúmulo de leucócitos polimorfonucleares, também poderia ser responsável pela baixa quantidade de feixes de fibras colágenas, uma vez que estas células contêm enzimas capazes de degradar o colágeno. Todavia, CATANZARO GUIMARÃES¹⁴ (1968); WERINGER & ARQUILLA⁶⁸ (1981) e FELIX *et al.*²² (1990) apontaram a insulina como um agente essencial à proliferação fibroblástica e, conseqüentemente, à fibrogênese. BLACK *et al.*⁹ (1989) e DEVLIN *et al.*¹⁸ (1996) confirmaram a idéia de que ocorre não apenas um decréscimo na síntese de colágeno, mas também alterações no grau de glicosilação destas macromoléculas, prejudicando sua agregação.

VIZIOLI⁶⁵ (1971) explicou que a síntese de GAGs é indispensável à promoção da neo-formação de colágeno, de modo que o aumento das moléculas de GAGs, nos espaços extracelulares, provê a condição necessária à agregação do tropocolágeno em fibrilas colágenas. Por meio da detecção do dicroísmo linear, é possível determinar a época em que a associação orientada entre as GAGs e as macromoléculas de colágeno ocorre, o que evidencia o início da organização macromolecular no tecido de granulação. A organização tecidual somente se estabelece quando a síntese de GAGs é elevada. Segundo esse pesquisador, é

incontestável que deve haver um paralelismo entre a secreção das GAGs e a síntese de colágeno, porém, não é necessário que este último processo já tenha alcançado sua atividade máxima. Nesta pesquisa, observou-se o dicroísmo nas amostras teciduais dos animais controles e normais irradiados, ao 7º e 13º dia da avaliação, respectivamente, indicando que o tecido de granulação iniciava sua organização macromolecular. Estes achados são similares àqueles de MONTEIRO ⁴⁸ (1999). No que concerne a ambos os grupos de animais diabéticos, verificou-se o dicroísmo apenas no 21º dia do estudo. O início tardio da organização macromolecular no tecido de granulação dos animais normais irradiados permite supor que a irradiação pode não apenas ter influenciado negativamente a fibrogênese, mas também ter retardado a síntese das GAGs. O maior atraso na apresentação do dicroísmo em amostras teciduais de ambos os grupos de animais diabéticos sugere que a diabetes mellitus também pode ter influenciado negativamente o metabolismo das GAGs. Levando-se em consideração que, no grupo de animais normais irradiados, a evidência do dicroísmo ocorreu no 13º dia do estudo, infere-se que o efeito prejudicial da diabetes mellitus é mais intenso que o dano biológico causado pela irradiação. Contudo, o tecido de granulação conseguiu atingir uma certa organização, ainda que o início do processo de orientação macromolecular dos feixes de fibras colágenas tenha ocorrido em um período mais tardio.

DRÓZDZ *et al.* ²⁰ (1981) e BAKER & KROCHAK ⁵ (1989) relataram que a irradiação promove a despolimerização da substância fundamental, que, de

acordo com BAILEY ⁴ (1968), exibe alta radiosensibilidade. HUGENBERG *et al.* ³⁸ (1989) verificaram uma redução na síntese de GAGs sulfatadas, após a irradiação com doses de 10, 100 e 500Gy de raios X. ALMEIDA ² (1997) constatou uma menor quantidade de GAGs nas amostras teciduais de animais irradiados e sugeriu três explicações: 1. diminuição na biossíntese de GAGs; 2. atraso no processo de síntese; e 3. danos estruturais nas moléculas de GAGs. Como as GAGs são sintetizadas pelos fibroblastos, que por sua vez sofrem o efeito prejudicial das radiações ionizantes, pode-se supor que o decréscimo no conteúdo de GAGs reativas seja decorrente de uma redução no número de fibroblastos presentes no tecido de granulação, bem como de alterações funcionais nestas células.

Conforme CECHOWSKA-PASKO *et al.* ¹⁵ (1999) a biossíntese das GAGs é regulada por controle hormonal. Considerando-se que a insulina interfere no metabolismo das proteínas e carboidratos parece razoável inferir-se que a deficiência insulínica afeta também o metabolismo das GAGs. De fato, os achados de CATANZARO GUIMARÃES ¹² (1968) e CECHOWSKA-PASKO *et al.* ¹⁵ (1999) confirmam esta hipótese. Os últimos pesquisadores constataram que o decréscimo no conteúdo de GAGs da pele de ratos diabéticos decorria de uma redução na síntese destas macromoléculas, especialmente as GAGs sulfatadas, e não de um fenômeno de degradação acelerada. De acordo com CLARK ¹⁶ (1988), o tecido de granulação contém predominantemente ácido hialurônico, durante os 4 dias iniciais do processo de reparo tecidual, mas, posteriormente consiste em uma

grande quantidade de GAGs sulfatadas. Estas macromoléculas sulfatadas associam-se a uma proteína central, originando as proteoglicanas, que aumentam a resiliência do tecido.

Ao se analisar a correlação entre a proliferação fibroblástica, a secreção de GAGs, a biossíntese de colágeno e sua organização macromolecular, no sentido de compensar a perda tecidual, ocluir a área da ferida, e, aumentar a resiliência e a resistência tênsil da pele, percebe-se que uma interferência em qualquer destes eventos retarda o processo de reparação tecidual. Depreende-se, a partir do estudo retrospectivo da literatura, registrado nesta dissertação, que os fibroblastos sofrem alterações morfo-funcionais e proliferativas devidas à irradiação e à diabetes mellitus. Em adição, tanto a radiação ionizante como o estado diabético favorecem um decréscimo no conteúdo de GAGs, seja por aumento da degradação e/ou redução da biossíntese. Tendo em vista que o colágeno depende das moléculas de GAGs para realizar sua agregação macromolecular e atingir estabilidade físico-química, a organização do tecido neoformado também é deturpada.

A literatura fornece informações que indicam a concorrência de vários fatores no atraso da fibrogênese, sob condições de diabetes mellitus e irradiação local. No entanto, como foi possível verificar nesta pesquisa, a irradiação pós-operatória na pele de animais normais e diabéticos retardou a reparação tecidual, porém, não a impediu (FIG. 25 e 26). Entendendo o fenômeno do reparo como algo dinâmico, em que as diferentes fases se superpõem, poderia-se sugerir que o

organismo cria mecanismos compensatórios eficientes para permitir a evolução do processo de cicatrização, mesmo em condições desfavoráveis. HALL ³⁷ (1994) explicou que, na pele, as células clonogênicas que podem repopular as subunidades funcionais da área irradiada têm a capacidade de migrar de uma subunidade não afetada para outra, cuja população celular foi severamente atingida.

LUCE ⁴⁶ (1984) e MILLER & RUDOLPH ⁴⁷ (1990) salientaram que a alteração mais significativa na pele irradiada é a diminuição do suprimento sangüíneo, causada pela endarterite obliterativa progressiva da microvasculatura. De fato, VAN DEN BRENK ⁶³ (1959); GRILLO & POTSAID ³⁴ (1961); GUIDUGLI NETO ³⁵ (1987); KRISHNAN *et al.* ⁴³ (1987) e RAVELI *et al.* ⁵⁵ (1990), entre outros, observaram o efeito deletério das radiações ionizantes sobre os vasos sangüíneos neo-formados. Contudo, as doses de radiação empregadas foram maiores que 1Gy. Os resultados deste experimento não descartam completamente a possibilidade de injúria vascular e concomitante redução no suprimento de nutrientes para o tecido de granulação, entretanto, apontam a maior sensibilidade dos componentes celular, glicoproteico e fibroso, da matriz tecidual. Portanto, apesar de o decréscimo no fluxo sangüíneo relacionar-se à precariedade da cicatrização em um leito dérmico irradiado, esta não seria a única causa do atraso na reparação tecidual. Esta constatação também é verdadeira para a condição de diabetes mellitus aguda, pois, como se afirma, a microangiopatia diabética é o principal fator determinante da hipóxia tecidual que prejudica a cicatrização;

todavia, os indivíduos diabéticos desenvolvem distúrbios vasculares ao longo de meses, como uma consequência de alterações metabólicas crônicas, o que não aconteceu no presente trabalho.

Em síntese, é importante frisar que ainda não se estabeleceu uma dose de radiação ionizante totalmente inócua aos tecidos vivos. Os efeitos radiobiológicos podem estar presentes mesmo sem ser detectados, porque ocorrem inicialmente nas biomoléculas. A ação deletéria das radiações ionizantes depende de inúmeros fatores como: a dose de radiação, a forma de administração, as condições sistêmicas do indivíduo irradiado, a radiosensibilidade inerente a cada tipo de célula e a cinética de repopulação do tecido exposto. Os achados histológicos deste trabalho experimental ratificam a suspeita de sinergismo entre a irradiação local por elétrons e a diabetes mellitus não controlada na promoção do retardo cicatricial, sugerindo que o profissional deve, primeiramente, pesquisar o estado de equilíbrio metabólico do paciente antes de irradiá-lo.

7. CONCLUSÕES

A partir da discussão sobre as características morfológicas e macromoleculares observadas nas amostras teciduais, de animais representantes dos quatro grupos estudados, neste modelo experimental, pode-se concluir que:

1. A irradiação local por elétrons com 6MeV de energia, em dose única de 1Gy, determinou um retardo na cicatrização por atrasar os eventos proliferativos, nos dois grupos de animais irradiados. Contudo, não impediu que o processo de reparo culminasse na restauração tecidual;
2. Os desequilíbrios metabólicos inerentes à fase precoce da diabetes mellitus atuaram em sinergismo com a irradiação no retardo da reparação tecidual, não somente por adiarem a fase proliferativa, mas também por condicionarem a persistência da fase inflamatória;

- 3. Durante o período de estudo da reparação tecidual, a irradiação por elétrons e o estado diabético causaram uma redução no conteúdo de colágeno, do tecido de granulação, que foi mais acentuada para os animais diabéticos irradiados.**

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS *

1. ABDALLA, C.M. *et al.* Estudo histológico da gênese e evolução do tecido de granulação sob efeitos de baixas doses de radiação X. **Rev Fac Odontol 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. 103 p. Tese (Doutorado em Radiologia Odontológica) – Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas.
3. BACCHETTI, S., SINCLAIR, W.K. The effects of x-rays on the synthesis of DNA, RNA, and proteins in synchronized Chinese hamster cells. **Radiat Res**, Oak Brook, v. 45, n. 3, p. 598-612, Mar. 1971.
4. BAILEY, A.J. Effect of ionizing radiation on connective tissue components. **Int Rev Connect Tissue Res**, New York, v. 4, p. 233-281, 1968.

* De acordo com a norma NBR - 6023, de 1989, da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT). Abreviatura dos periódicos em conformidade com as bases de dados: MEDLINE e LILACS.

5. BAKER, D.G., KROCHAK, R.J. The response of the microvascular system to radiation: a review. **Cancer Invest**, New York, v. 7, n. 3, p. 287-294, 1989.
6. BARTON, S.P. *et al.* Detection of the effects of low dose ionising irradiation on epidermal function. **Br J Radiol**, London, v. 58, n. 685, p. 73-76, Jan. 1985.
7. BERNSTEIN, E.F. *et al.* Biology of chronic radiation effect on tissues and wound healing. **Clin Plast Surg**, Philadelphia, v. 20, n. 3, p. 435-453, July 1993.
8. _____. *et al.* Healing impairment of open wounds by skin irradiation. **J Dermatol Surg Oncol**, New York, v. 20, n. 11, p. 757-760, Nov. 1994.
9. BLACK, C.T. *et al.* Protein glycosilation and collagen metabolism in normal and diabetic rats. **J Surg Res**, New York, v. 47, n. 3, p. 200-202, Sept. 1989.
10. 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.
11. CATANZARO GUIMARÃES, S.A. 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.
12. _____. 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.
13. _____. 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.

14. CATANZARO GUIMARÃES, S.A. Estudo morfológico do processo de reparação cicatricial em ratos diabéticos aloxânicos. **Estomatol Cult**, Bauru, v. 2, n. 2, p. 41-47, jul./dez. 1968.
15. 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, May 1999.
16. CLARK, R.A.F. Overview and general considerations of wound repair. *In*: _____, HENSON, P.M. **The molecular and cellular biology of wound repair**. New York: Plenum Press, 1988. p. 3-33.
17. DEUCHAR, E.M. Embryonic malformations in rats, resulting from maternal diabetes: preliminary observations. **J Embryol Exp Morphol**, London, v. 41, p. 93-99, Oct. 1977.
18. 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.
19. DRAKE, D.B., OISHI, S.N. Wound healing considerations in chemotherapy and radiation therapy. **Clin Plast Surg**, Philadelphia, v. 22, n. 1, p. 31-37, Jan. 1995.
20. DRÓZDZ, M. *et al.* Effect of irradiation on glycosaminoglycans content in rat tissue. **Arch Immunol Ther Exp (Warsz)**, Wroclaw, v. 29, n. 4, p. 514-519, 1981.
21. EHRLICHMAN, R.J. *et al.* Common complications of wound healing – Prevention and management. **Surg Clin North Am**, Philadelphia, v. 71, n. 6, p. 1323-1351, Dec. 1991.

22. 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.
23. FRANKLIN, A., COULTAS, P. Some effects of radiation on the healing of transected mouse ear. **Radiat Res**, Oak Brook, v. 100, n. 1, p. 55-64, Oct. 1984.
24. FRANZÉN, L.E., NORRBY, K. Mitogenesis in wound-healing cells in diabetic rats. **APMIS**, Copenhagen, v. 96, n. 6, p. 519-524, June 1988.
25. _____, ROBERG, K. Impaired connective tissue repair in streptozotocin-induced diabetes shows ultrastructural signs of impaired contraction. **J Surg Res**, New York, v. 58, n. 4, p. 407-414, Apr. 1995.
26. FRIGERIO, N. **Your body and radiation**. Washington: Atomic Energy Commission Division of Technical Information, 1967. 78 p.
27. GAGNON, W.F., GRANT III, W. Surface dose from megavoltage therapy machines. **Radiology**, Oak Brook, v. 117, n. 3 pt. 1, p. 705-708, Dec. 1975.
28. 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. **Curr Eye Res**, Oxford, v. 12, n. 11, p. 1009-1014, Nov. 1993.
29. GLICKMAN, I., SMULOW, J.B., MOREAU, J. Postsurgical periodontal healing in alloxan diabetes. **J Periodontol**, Chicago, v. 38, n. 2, p. 93-99, Mar./Apr. 1967.
30. GOLDSCHMIDT, H., BRENEMAN, J.C., BRENEMAN, D.L. Ionizing radiation therapy in dermatology. **J Am Acad Dermatol**, Saint Louis, v. 30, n. 2 pt. 1, p. 157-182, Feb. 1994.

31. GORODETSKY, R., MCBRIDE, W.H., WITHERS, H.R. Assay of radiation effects in mouse skin as expressed in wound healing. **Radiat Res**, Oak Brook, v. 116, n. 1, p. 135-144, Oct. 1988.
32. GRANDINI, S.A. *et al.* Protein synthesis in wound after tooth extraction in pancreatectomized diabetic rats. **Braz Dent J**, Ribeirão Preto, v. 1, n. 1, p. 25-30, 1990.
33. GRILLO, H.C. Origin of fibroblasts in wound healing: an autoradiographic study of inhibition of cellular proliferation by local X-irradiation. **Ann Surg**, Philadelphia, v. 157, n. 3, p. 453-467, Mar. 1963.
34. _____, POTSAID, M.S. Studies in wound healing: IV. Retardation of contraction by local X-irradiation and observations relating to the origin of fibroblasts in repair. **Ann Surg**, Philadelphia, v. 154, n. 5, p. 741-750, Nov. 1961.
35. 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 Sao Paulo**, São Paulo, v. 1, n. 4, p. 6-8, out./dez. 1987.
36. HAGEMAN, I., BUSCHARD, K. Diabetic animal models. *In*: SVENDSEN, P., HAU, J. (Ed.) **Handbook of laboratory animal science**. Boca Raton: CRC Press, 1994. Chap. 10, p. 103-123. V. 2: Animal models.
37. HALL, E.J. **Radiobiology for the radiologist**. 4th ed. Philadelphia: J.B. Lippincott, 1994. p. 29-43, 45-73.

38. HUGENBERG, S.T., MYERS, S.L., BRANDT, K.D. Suppression of glycosaminoglycan synthesis by articular cartilage, but not of hyaluronic acid synthesis by synovium, after exposure to radiation. **Arthritis Rheum**, Philadelphia, v. 32, n. 4, p. 468-474, Apr. 1989.
39. ITOIZ, M.E. *et al.* Histochemical study of healing wounds: alkaline and acid phosphatase. **J Oral Surg**, Chicago, v. 27, n. 8, p. 641-644, Aug. 1969.
40. JUNOD, A. *et al.* Studies of the diabetogenic action of streptozotocin. **Proc Soc Exp Biol Med**, Cambridge, v. 126, n. 1, p. 201-205, Oct. 1967.
41. 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.
42. KARZMARK, C.J., NUNAN, C.S., TANABE, E. **Medical electron accelerators**. New York: McGraw-Hill, 1993. p. 1-31, 33-47.
43. KRISHNAN, E.C. *et al.* Dose-dependent radiation effect on microvasculature and repair. **J Natl Cancer Inst**, Bethesda, v. 79, n. 6, p. 1321-1325, Dec. 1987.
44. 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.
45. LOURENÇO, R.M. **Estudo da atividade das fosfoesterases em tecido de granulação sob efeito de baixas doses de radiação de elétrons**. Piracicaba, 2000. 95 p. Tese (Doutorado em Radiologia Odontológica) – Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas.

46. LUCE, E.A. The irradiated wound. **Surg Clin North Am**, Philadelphia, v. 64, n. 4, p. 821-829, Aug. 1984.
47. MILLER, S.H., RUDOLPH, R. Healing in the irradiated wound. **Clin Plast Surg**, Philadelphia, v. 17, n. 3, p. 503-508, July 1990.
48. MONTEIRO, S.A.C. **Efeitos da irradiação por elétrons em feridas e em tecidos de granulação**. Piracicaba, 1999. 99 p. Tese (Doutorado em Radiologia Odontológica) – Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas.
49. MOORE, D.M. Rats. *In*: ROLLIN, B.E., KESEL, M.L. (Ed.) **The experimental animal in biomedical research**. Boca Raton: CRC Press, 1995. Chap. 11, p. 251-280. V. 2: Care, husbandry and well-being – An overview by species.
50. MOORE, J.M. The effect of radiation on connective tissue. **Otolaryngol Clin North Am**, Philadelphia, v. 17, n. 2, p. 389-399, May 1984.
51. NEVINS, M.L. *et al.* Wound healing around endosseous implants in experimental diabetes. **Int J Oral Maxillofac Implants**, Lombard, v. 13, n. 5, p. 620-629, 1998.
52. PEREIRA FILHO, G.V. *et al.* Estudo histológico e morfométrico da reparação de feridas cutâneas, provocadas em ratos, submetidas à radiação beta do estrôncio-90. **Arq Med ABC**, Santo André, v. 21, n. 1/2, p. 4-16, 1998.
53. 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, p. 707-713, May 1949.

54. POHLE, E.A., RITCHIE, G., WRIGHT, C.S. Studies of the effect of roentgen rays on the healing of wounds. I. The behavior of skin wounds in rats under pre or post-operative irradiation. **Radiology**, Oak Brook, v. 16, p. 445-460, Apr. 1931.
55. RAVELI, D.B. *et al.* Influência da radiação X na cronologia do processo de reparo em feridas de extração dental. Estudo histomorfológico em ratos. **Rev Fac Odontol Sao Paulo**, São Paulo, v. 4, n. 2, p. 119-125, abr./jun. 1990.
56. REINHOLD, H.S., BUISMAN, G.H. Radiosensitivity of capillary endothelium. **Br J Radiol**, London, v. 46, n. 541, p. 54-57, Jan. 1973.
57. RUDOLPH, R. *et al.* Slowed growth of cultured fibroblasts from human radiation wounds. **Plast Reconstr Surg**, Baltimore, v. 82, n. 4, p. 669-677, Oct. 1988.
58. SHOLLEY, M.M., GIMBRONE JR., M.A., COTRAN, R.S. Cellular migration and replication in endothelial regeneration. A study using irradiated endothelial cultures. **Lab Invest**, Baltimore, v. 36, n. 1, p. 18-25, Jan. 1977.
59. SPANHEIMER, R.G., UMPIERREZ, G.E., STUMPF, V. Decreased collagen production in diabetic rats. **Diabetes**, Alexandria, v. 37, n. 4, p. 371-376, Apr. 1988.
60. STAJIĆ, J., MILOVANOVIĆ, A. Radiation and wound healing: evolution of tensile strength in excised skin-wound of irradiated rats. **Strahlentherapie**, Berlin, v. 139, n. 1, p. 87-90, Jan. 1970.

61. TENGRUP, I., HALLMANS, G., ÄGREN, M.S. Granulation tissue formation and metabolism of zinc and copper in alloxan-diabetic rats. **Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg**, Stockholm, v. 22, n. 1, p. 41-45, 1988.
62. VALERO, V.B. (Coord.) **Manual para técnicos de biotério**. São Paulo: H.A. Rothschild, 1990. Pt. 1, p. 1-155.
63. VAN DEN BRENK, H.A.S. The effect of ionizing radiations on capillary sprouting and vascular remodelling in the regenerating repair blastema observed in the rabbit ear chamber. **Am J Roentgen**, Springfield, v. 81, n. 5, p. 859-884, May 1959.
64. _____. *et al.* Effects of X-radiation on growth and function of the repair blastema (granulation tissue). I. Wound contraction. **Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med**, London, v. 25, n. 1, p. 1-19, Jan. 1974.
65. VIZIOLI, M.R. Macromolecular organization of rat sponge-induced granulation tissue as revealed by dichroism. **Acta Anat (Basel)**, Basel, v. 80, n. 1, p. 73-81, 1971.
66. 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.
67. WATANABE, P.C.A. *et al.* Efeitos de baixas doses de radiação sobre a gênese e a evolução do tecido de granulação. **Rev Fac Odontol Sao Paulo**, São Paulo, v. 8, n. 2, p. 137-143, abr./jun. 1994.
68. WERINGER, E.J., ARQUILLA, E.R. Wound healing in normal and diabetic chinese hamsters. **Diabetologia**, New York, v. 21, n. 4, p. 394-401, Oct. 1981.

69. WETZLER, C. *et al.* Large and sustained induction of chemokines during impaired wound healing in the genetically diabetic mouse: prolonged persistence of neutrophils and macrophages during the late phase of repair. **J Invest Dermatol**, New York, v. 115, n. 2, p. 245-253, Aug. 2000.
70. ZYKOVA, S.N. *et al.* Altered cytokine and nitric oxide secretion in vitro by macrophages from diabetic type II-like *db/db* mice. **Diabetes**, Alexandria, v. 49, n. 9, p. 1451-1458, Sept. 2000.

APÊNDICE 1

Cópia do certificado de aprovação desta pesquisa experimental, que foi expedido pela Comissão de Ética na Experimentação Animal do Instituto de Biologia da UNICAMP



INSTITUTO DE BIOLOGIA
UNICAMP



CEEA-IB-UNICAMP

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

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 0361, sobre "Efeito da aplicação de elétrons aplicada em bordas de feridas de ratos diabéticos".

sob a responsabilidade de Profa. Dra. Solange Maria de Almeida

..... está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA)-IB-UNICAMP em reunião de 22.11.1999. Este certificado expira em 23.11.2000

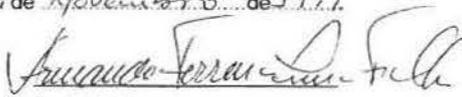
CERTIFICATE

We certify that the protocol nº about ".....",
..... is in agreement with the Ethical Principles in Animal Research adopted by Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA) and was approved by the Institute of Biology/UNICAMP Ethical Committee for Animal Research (CEEA) in
Expiration date
.....

Campinas, 22 de Novembro de 1999.


A. M. Souza Filho
Prof(a) Dr(a)
Presidente - CEEA/IB/UNICAMP

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA
CIDADE UNIVERSITÁRIA ZETZINHO VAZ
CEP-13081-970 - CAMPINAS - SP - BRASIL


Francisco Ferraz Filho
Prof(a) Dr(a)
Secretário(a) - CEEA/IB/UNICAMP

TELEFONE (019) 788 7116
FAX (019) 289 3123

APÊNDICE 2 – GLOSSÁRIO

Acelerador linear: tradução do termo norte-americano *linac*, designa aparelhos de megavoltagem que geram feixes de raios X empregados em radioterapia. Os aceleradores lineares também possibilitam a terapia com feixes de elétrons. Para este propósito, no cabeçote do aparelho, o anteparo é removido e o feixe de elétrons acelerados é orientado diretamente para o volume-alvo no paciente.

Apoptose: morte celular programada, com etiopatogenia diferente da necrose, que culmina num estado de total incapacidade funcional e reprodutiva da célula.

Birrefringência: propriedade exclusiva dos meios anisótropos, dotados de dois índices de refração. Estes meios, devido ao seu arranjo molecular assimétrico e orientado, têm a propriedade de bipartir um feixe de luz polarizada que os penetra, sendo, portanto, percorridos por dois raios luminosos. Dessa forma, há duas direções de propagação da luz no seu interior.

Ciclo mitótico: intervalo entre a mitose da célula-mãe e a de uma ou ambas as células-filhas, podendo ser dividido em 4 fases consecutivas: G_1 , S , G_2 e M . G_1 é definido como o período que vai do término da mitose até o início da replicação do DNA; S é a fase de replicação propriamente dita do DNA; G_2 estende-se do término da síntese de DNA até o início de outra mitose; M é literalmente a fase de divisão celular ou mitose.

LET: quantidade média de energia transferida pelo feixe de radiação por unidade de comprimento, no tecido em que foi aplicado. Exemplos de radiações

ionizantes de baixa LET incluem os raios X e os feixes de elétrons. Por outro lado, as partículas alfa são classificadas como radiação de alta LET.

Microscopia de polarização: técnica baseada no emprego de um equipamento que permite examinar-se um tecido através de um feixe de luz polarizada. Este método possibilita a investigação de características ultra-estruturais dos tecidos em estudo, podendo ser qualitativo ou quantitativo.

R: unidade de exposição utilizada como medida da quantidade de radiação X ou gama capaz de ionizar um determinado volume de ar.

rad: é a unidade de medida da energia transferida por qualquer tipo de radiação ionizante à matéria. Relaciona-se à absorção das radiações ionizantes, sendo o Gy a unidade do *Système International d'Unités* (SI) correspondente, em que 1Gy é igual a 100rad.

Reparação tecidual: fenômeno biológico que visa a restaurar a integridade do tecido perdido, por meio da substituição fibrosa.

Sievert: unidade de medida da dose equivalente, que é utilizada para se estimar a capacidade das radiações ionizantes em provocar danos biológicos. O Sv pode ser definido como 1Gy multiplicado pelo fator de qualidade da radiação em questão.

Tecido de granulação: componente biológico inerente à cicatrização, sendo essencialmente constituído por alças e brotos vasculares, fibras colágenas e reticulares, substância fundamental, fibroblastos e células inflamatórias.