

CELSON MAURY ABDALLA

***VITAMINA E E SEU EFEITO RADIOPROTETOR
SOBRE O TECIDO DE REPARO.
Estudo Morfológico e Histométrico***

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

**Piracicaba
2004**

CELSON MAURY ABDALLA

VITAMINA E E SEU EFEITO RADIOPROTETOR
SOBRE O TECIDO DE REPARO.
Estudo Morfológico e Histométrico

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

Orientador: Prof. Dr. Mário Roberto Vizioli

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Frab Norberto Bóscolo

Prof. Dr. Mário Roberto Vizioli

Prof. Dr. Pedro Luiz de Carvalho

Profa. Dra. Solange Aparecida Caldeira Monteiro

Profa. Dra. Solange Maria de Almeida

Este exemplar foi devidamente corrigido.
de acordo com a Resolução CPG-036/83
CPG. 14/01/2004
Assinatura do Orientador

Piracicaba
2004

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

IDADE	BC
CHAMADA	T/Unicamp
	Ab31v
	EX
IMBO BC/	61814
LOC.	6-86-05
C	☐
D	☒
REÇO	4.00
ATA	10-2-05
% CPD	

31/bid:341209

Ficha Catalográfica

Ab31v Abdalla, Celso Maury.
Vitamina E e seu efeito radioprotetor sobre o tecido de reparo. Estudo morfológico e histométrico. / Celso Maury Abdalla. – Piracicaba, SP : [s.n.], 2004.
xi, 83f. : il.

Orientador : Prof. Dr. Mario Roberto Vizioli.
Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Radiação ionizante. 2. Antioxidantes. 3. Radicais livres – Biologia. I. Vizioli, Mario Roberto. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.

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



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Tese de DOUTORADO, em sessão pública realizada em 15 de Outubro de 2004, considerou o candidato CELSO MAURY ABDALLA aprovado.

PROF. DR. MÁRIO ROBERTO VIZIOLI

PROF. DR. PEDRO LUIZ DE CARVALHO

PROFa. DRa. SOLANGE APARECIDA CALDEIRA MONTEIRO

PROFa. DRa. SOLANGE MARIA DE ALMEIDA

PROF. DR. FRAB NORBERTO BOSCOLO

200503901

Aos Meus Pais, (in memoriam)
SAID ABDALLA e HASSIBA IBRAHIM ABDALLA
pela formação e apoio que sempre me dispensaram,

À Minha Dedicada e Querida Esposa,
NADJA MARIA,
Pela compreensão, carinho e apoio,

Aos Meus Irmãos,
ANGEL e ELIAS (in memoriam), LYDIA (in memoriam),
LEONOR, NACIB e EDITE, LUIZ e TEREZINHA, ODETE,
FLÁVIO, ROBERTO e MARIA DE LOURDES, CLÉSIO e NEIDE,
SÉRGIO, CLÁUDIO e VERA REGINA,
Pela amizade que para mim representam
A minha Cunhada
IRMÃ DE LOURDES MOSCOSO, pelas informações e
incentivo.

DEDICO ESTE TRABALHO

Ao Reconhecido Mestre

Professor Doutor Mário Roberto Vizioli

Professor Titular da Área de Patologia do Departamento de Diagnóstico Oral da Faculdade de Odontologia de Piracicaba – UNICAMP, pela orientação segura durante a elaboração deste trabalho, o meu profundo reconhecimento e gratidão.

Ao Mestre e Amigo

Professor Doutor Frab Norberto Bóscolo

Professor Titular da Área de Radiologia do
Departamento de Diagnóstico Oral da Faculdade de
Odontologia de Piracicaba – UNICAMP, pela confiança
em mim depositada, os meus sinceros agradecimentos.

Ao colega do Curso de Doutorado em Radiologia

Professor Flávio Ricardo Manzi

Pelo exemplo de profissionalismo e pelo grande auxílio e amizade
que sempre me dispensou, os meus mais sinceros
agradecimentos.

AGRADECIMENTOS

Quero agradecer a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho, e em especial:

- **À Profa. Dra. Solange Maria de Almeida**, Professora Associada da Disciplina de Radiologia da FOP-UNICAMP, pela sua colaboração e trocas de informações preciosas, tornando possível o desenvolvimento deste trabalho.
- **Ao Prof. Dr. Francisco Haiter Neto**, Professor Associado da Disciplina de Radiologia da FOP-UNICAMP, pelo seu dinamismo e acompanhamento seguro até o presente momento.

Ao Prof. Dr. Pedro Luiz de Carvalho, Professor Assistente Doutor, Responsável pela Disciplina de Imaginologia Dento-Maxilo-Facial da Faculdade de Odontologia da Universidade de Taubaté, amigo e companheiro, os meus agradecimentos.

Aos Professores, colegas de Doutorado e Funcionários da Faculdade de Odontologia de Piracicaba – UNICAMP, pela maneira hospitaleira e amiga com que fui acolhido durante a realização desta pesquisa, o meu reconhecimento e amizade.

À CAPES, pela concessão de bolsas, os meus agradecimentos.

**“A São Judas Tadeu, e
Nossa Senhora Aparecida
a quem sou devoto,
a minha eterna gratidão.”**

SUMÁRIO

RESUMO.....	01
ABSTRACT.....	03
1 INTRODUÇÃO	05
2 REVISÃO de LITERATURA.....	07
2.1 Reparação Tecidual e Radiação Ionizante.....	07
2.2 Radiação Ionizante e Vitamina E.....	19
3 PROPOSIÇÃO.....	32
4 MATERIAL e MÉTODOS.....	33
5 RESULTADOS.....	41
6 DISCUSSÃO.....	67
7 CONCLUSÃO	77
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	78

Resumo

Esta pesquisa teve por finalidade avaliar a ação da vitamina E, como radioprotetora nos fibroblastos no processo de reparação tecidual em ratos. Após sofrerem um procedimento cirúrgico, que constituiu da produção de uma ferida na região dorsal anterior. Os animais foram divididos em 8 grupos: **grupo C** (controle) – constituído de animais onde foi realizada somente a ferida, **grupos VE 60 e VE 90** – pré tratamento com vitamina E (60 e 90 UI, respectivamente), **grupo IR** – irradiação 3 dias após à cirurgia, **grupos VE60 IR e VE90 IR** – pré tratamento com 60 e 90 UI de vitamina E e irradiação de suas bordas 3 dias após às cirurgias, **grupo OOL** – pré tratamento com óleo de oliva e **grupo OOL IR** – pré tratamento com óleo de oliva e irradiação de suas bordas 3 dias após à cirurgia. A ação radioprotetora da vitamina E foi avaliada pelo método da hematoxilina-eosina para análise morfológica do tecido de granulação, aos 4, 7, 14 e 21 dias após a cirurgia e contagem de fibroblastos aos 4 e 7 dias após da ferida. A análise dos resultados mostrou que o retardo no processo de reparação tecidual causado por 6 Gy de radiação de elétrons com um feixe de 6 MeV, não ocorreu no grupo de animais que recebeu vitamina E. Quanto ao número de fibroblastos, verificou-se menor quantidade dos mesmos nos grupos **IR, OOL e OOL IR**, quando comparado com o grupo controle, enquanto os demais grupos não apresentaram diferença com o

controle, nos 2 períodos analisados. Assim, a vitamina E mostrou-se efetiva como radioprotetora.

Abstract

This research had for purpose to evaluate the action of the vitamin E as a radioprotector in the process of the tissue repair in rats, that suffered previously a surgical procedure, which consists of the wound production in the dorsal area.

The animals were divided into 8 groups: group C (control) - it consists only of animals in which the wound was made; VE60 and VE90 UI groups previously treated with vitamin E (60 and 90 UI respectively); IR group – constituted by wound and irradiation of its borders, 3 days after surgery; VE60 IR and VE90 IR - these groups were previously treated with 60 and 90 UI of the vitamin E and with irradiation of their borders, after 3 days surgery; OOL groups - the wound plus the previous treatment of olive oil; OOL IR groups the wound plus the previous treatment with olive oil and the irradiation of its borders, 3 days after surgery.

The radioprotection action of the vitamin E was evaluated by the hematoxylin-eosin staining for morphologic analysis of the granulation tissue, to the 4, 7, 14 and 21 days after surgery and fibroblasts counting to the 4 and 7 days after wound.

The analysis of the results showed that the retard in the process of tissue repair, caused by 6 Gy of electrons irradiation with a beam of 6 MeV, did not happen in

the groups of animals that received vitamin E. Concerning to the fibroblasts number, smaller amount of the same ones was verified in IR, OOL and OOL IR groups when compared with the control groups, while the other groups did not present difference with the control, in 2 analyzed periods.

Thus, vitamin E effectively acts as a as radioprotector, as it was shown.

1- Introdução

A radiação ionizante pode causar complicações quando utilizada com finalidade terapêutica tais como injúrias nas células normais adjacentes à região alterada. Em relação aos pacientes que obrigatoriamente têm que passar por tratamentos radioterápicos, existe uma preocupação por parte dos profissionais em diminuir os efeitos deletérios das radiações ionizantes. Na radioterapia há uma crescente utilização dos Aceleradores Lineares, que produzem feixes de elétrons altamente colimados, e por ser possível determinar a energia dos feixes de radiação, torna-se fácil controlar a profundidade de penetração dos mesmos. Atualmente, também se faz o uso das técnicas de planejamento em terceira dimensão e Radioterapia com Intensidade Modulada, IMRT - (Intensity Modulated Radiotherapy) que é uma tecnologia avançada de radioterapia. O objetivo de todos os tratamentos radioterápicos é danificar ao máximo as células anormais e ao mesmo tempo provocar um mínimo de dano às células normais. Os aparelhos de IMRT controlam melhor o feixe de radiação do que os aparelhos convencionais, provocando assim, o mínimo de danos às células normais.

Associados aos fatores citados anteriormente, existem certas substâncias que também diminuem a ação das radiações ionizantes nos tecidos vivos, conhecidas como Radioprotetores .

Os danos causados quando da absorção da radiação pelos tecidos vivos, são decorrentes de reações físico-químicas que levam à produção de radicais livres. O efeito prejudicial da radiação pode estar relacionado ao início da peroxidação de lipídios por esses radicais, processo ocorrido principalmente dentro da membrana celular com alta concentração de ácidos graxos poli-insaturados. Como as membranas microssomais e mitocondriais apresentam uma grande quantidade de ácidos graxos, elas são mais susceptíveis a peroxidação lipídica, tendo como conseqüências a perda de sua integridade e a diminuição no funcionamento celular.

Os radioprotetores têm a propriedade de proteger o tecido vivo diminuindo os danos a ele causados pela radiação. Sua ação é decorrente da ligação química entre essas substâncias e os radicais livres produzidos pela radiação, impedindo os efeitos danosos.

A vitamina E, por ser pouco estudada como radioprotetor na reparação tecidual, e por apresentar resultados bastante divergentes, foi a substância escolhida para a verificação de seu desempenho como radioprotetor na cicatrização de ferida induzida.

2- Revisão da Literatura

2.1- Reparação tecidual e radiação ionizante

A reparação tecidual é um processo do qual o organismo se utiliza para restabelecer um tecido lesado. Porém, este novo tecido não apresentará as mesmas características do tecido substituído. A reparação tecidual que mais ocorre no organismo é o de processo de cicatrização, onde o tecido lesado é substituído por tecido conjuntivo fibroso neoformado, resultando a cicatriz. A cicatrização é um processo que pode ser dividido didaticamente em 3 fases distintas. A primeira fase, **inflamação**, é caracterizada pela hemostase, que ocorre após a ferida, com presença de plaquetas e formação de fibrina. Há a liberação de mediadores químicos que induzem a migração de leucócitos, principalmente neutrófilos polimorfonucleares. Os monócitos, que posteriormente se diferenciarão em macrófagos, também estão presentes além dos granulócitos, responsáveis pela retirada do tecido necrótico. Os fibroblastos surgem de células em repouso dos tecidos adjacentes, que ocorre na segunda fase da cicatrização (**proliferativa**), provavelmente devido à presença de mediadores químicos, com função de produzir fibras e matrizes extracelulares. Esta fase compreende também a neoformação vascular, caracterizando a formação do tecido de

granulação. E finalmente, a fase de **maturação**, caracteriza com a formação do tecido conjuntivo fibroso, com diminuição dos fibroblastos e aumento de fibras, principalmente colágenas, em uma matriz extracelular de proteoglicanas, cuja principal molécula é uma glicosaminoglicana (GAG), resultando, assim a formação da cicatriz.

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

O efeito dos raios X de dois comprimentos de ondas diferentes em tecido de reparação de feridas excisionais, não suturadas, irradiadas com 1000 R, antes e após a realização de feridas, foi estudado por Pohle *et al.*, em 1931. No primeiro grupo, as irradiações ocorreram 1, 3, 7, 10, 14, 21 ou 30 dias antes da cirurgia e, no segundo grupo, as feridas foram irradiadas imediatamente, 24, ou ainda 48 horas após a cirurgia. A remoção do tecido para biópsia e análise foi realizada aos 7 dias após a cirurgia ou após a cicatrização. Concluíram não haver diferença no tempo de reparação das feridas em locais previamente irradiados. Quando comparados aos respectivos controles, os grupos irradiados após a cirurgia mostraram retardo na cicatrização e alterações morfológicas, principalmente quando foram irradiados 24 horas após a cirurgia.

Ao final do processo de reparação, não houve diferenças significativas entre os grupos experimentais e controles.

O crescimento característico de fibroblastos na reparação tecidual, foi estudado por Schilling *et al.* (1953), pela introdução de esferas de malhas de tântalos, em 75 cobaias. Os animais foram sacrificados em intervalos de tempo que compreenderam períodos variando de horas a meses. Os tecidos obtidos do interior e periferia das malhas foram analisados microscopicamente e cultivados para observação do comportamento dos fibroblastos em proliferação nos vários períodos da reparação. Os tecidos observados pela microscopia eletrônica e fotomicrografia, mostraram que a proliferação dos fibroblastos iniciou-se nas 24 ou 36 horas após a implantação das esferas; nos 6 dias seguintes houve aumento marcante no número de fibroblastos e do 7º ao 13º dia, os fibroblastos continuaram a deposição de colágeno e havia redução do processo inflamatório agudo. No período do 14º ao 20º dia, quando a quantidade de citoplasma dos fibroblastos mostrou-se diminuída, a deposição do colágeno foi proeminente. Na 4ª semana, os autores relataram predominância de colágeno e substância fundamental. Nesse período, ou até 6 semanas após o início da reparação, foi observado desaparecimento da atividade dos fibroblastos, A perda de crescimento potencial dos fibroblastos foi evidente no 4º mês.

Stein *et al.*, em 1957, preocupados com o desenvolvimento de osteorradionecrose em pacientes submetidos à radioterapia na região de cabeça e pescoço, avaliaram os efeitos da radiação na cicatrização de feridas de extrações dentais em ratos, em intervalos que variaram de 1 a 20 dias após a cirurgia. A irradiação foi realizada pela colocação de uma cápsula de radônio, lateralmente à

região alveolar. Os autores observaram que a cicatrização alveolar foi lenta e insuficiente nos animais que tiveram menor tempo transcorrido entre a colocação do radônio e a extração dental.

MacDonald (1959) estudou a origem dos fibroblastos na pele de 20 ratos. Após a realização de feridas incisionais suturadas com fio de seda, usou timidina tritiada para detectar a formação de novas células. A coleta do material ocorreu em tempos variados entre 2 horas e 14 dias após a cirurgia e a injeção da substância radioativa, tendo sido submetido a estudos histológicos. O autor observou que os fibroblastos surgem de células do tecido conjuntivo fixo nas adjacências da adventícia das artérias e veias, em torno dos folículos pilosos e das fibras musculares, ou no tecido conjuntivo abaixo da derme adjacente e abaixo das feridas. Não observou fibroblastos oriundos de linfócitos, macrófagos, histiócitos, leucócitos, células endoteliais ou células fixas da porção colagenosa da derme. Assim, o autor concluiu que os fibroblastos da pele surgem de células do tecido conjuntivo fixo que sofrem divisão posterior para formar novos fibroblastos.

Grillo, em 1963, realizou um trabalho para verificar a origem dos fibroblastos pois, até então, havia muitas controvérsias. Nesse trabalho, ele utilizou a timidina tritiada como forma de controlar as células em proliferação e os produtos destas divisões celulares. Foi utilizado um grupo de cobaias, que sofreram irradiação em três tempos diferentes: uma cobaia teve seu dorso irradiado, e 20 minutos depois, foi produzida uma ferida nesta região; no segundo animal, foi produzida a ferida, e 20 minutos após, a mesma foi irradiada, e na

terceira cobaia, o período de tempo entre a incisão e a irradiação foi de 28 horas. Cinco dias após a injúria, foi injetado em cada animal, timidina tritiada, intraperitonealmente e, decorridos 45 minutos, os animais foram sacrificados. Em um segundo grupo, as incisões não sofreram irradiação, e os animais foram sacrificados aos 20 minutos, 6, 18, e 28 horas após a produção da ferida. Estes animais foram utilizados para estudo histológico. O pesquisador utilizou ainda outro grupo de animais irradiados 20 minutos após a incisão, que foram sacrificados; 6, 18 e 28 horas após a mesma. Antes da divisão celular há formação de DNA, e a timidina tritiada incorpora-se a este; os resultados da pesquisa demonstraram haver uma grande ligação da timidina tritiada com os fibroblastos do tecido de granulação, tanto no leito aberto da ferida, como também, na sua área marginal. Desta forma, a principal conclusão do autor foi que os fibroblastos presentes no processo de cura e reparo de feridas, têm sua origem principalmente do tecido conjuntivo das bordas da lesão.

Em 1970, Dotto *et al.*, realizaram um trabalho quantitativo sobre a resposta vascular em feridas irradiadas produzidas em ratos, utilizando-se de uma dose de 6.000 rads de radiação X. Os animais foram separados em 3 grupos e irradiados em três tempos diferentes. O primeiro grupo foi irradiado imediatamente após a realização da ferida; o segundo grupo foi irradiado 3 dias após a produção da ferida e o terceiro grupo foi exposto à radiação 6 dias após. A resposta inflamatória foi analisada 7, 14, 21, 35, 60 e 75 dias após a confecção da ferida. Nesse trabalho foi observado que em todos os grupos estudados, nos estágios

iniciais da reparação tecidual havia poucos vasos neoformados e que o comportamento do tecido variou de acordo com o momento da irradiação. Entretanto, a vascularização manteve-se maior nos 3 grupos irradiados, em todos os tempos de exposição aos raios X, sendo que o máximo valor de vascularização para os dois primeiros grupos foi aos 14 dias, e para o terceiro grupo, ao 7º dia.

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

Uzunian (1979), considerando a importância dos fibroblastos na síntese do colágeno, estudou a possível ação concomitante na degradação das fibras colágenas, em feridas excisionais. Utilizou o tecido de granulação de 6 ratos albinos para análise microscópica do tecido nos períodos de 7, 14 e 21 dias. A microscopia eletrônica permitiu verificar o retículo endoplasmático dos fibroblastos, contendo vesículas intracitoplasmática que apresentavam em seu interior fibras colágenas; estes achados sugeriram ao autor serem os fibroblastos responsáveis pela síntese e degradação do colágeno durante o remodelamento. No 7º dia foi observada ser mais intensa a ação de degradação, e nos períodos subseqüentes foi observada queda desta ação.

A discutível origem de fibroblastos e macrófago de feridas foram estudados em 1981 por Stewart *et al.*, utilizando como marcadores cromossomos sexuais. O enxerto de medula óssea recebida, com sucesso, por uma menina sendo o tecido doado pelo irmão. Os exames citogenético dos cromossomos sexuais das células antes do transplante, como esperado, foram XX para o receptor e XY para o doador. A biópsia da pele do receptor, obtida 97 dias após o transplante, indicava origem hematopoiética dos macrófagos que acusavam a presença do cromossomo Y e ausência deste cromossomo nas células semelhantes a fibroblastos no local de reparação; estes achados deram suporte à hipótese de origem local dos fibroblastos.

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

maturação do colágeno, apresentando uma arquitetura anormal. Tais efeitos não foram observados com doses inferiores a 300 rads, afirmando haver uma dose-dependência dos efeitos e que alterações morfológicas e bioquímicas na ferida, embora mínimas, começam a ser percebidos com doses de 1000 rads.

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

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

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

Em 1991, Abdalla *et al.*, estudaram o efeito de baixas doses de radiação X, na gênese do tecido de granulação induzido pela implantação de esponjas na pele de ratos. Os animais foram divididos em 3 grupos: grupo controle, sacrificado a 4, 7, 14, 21 e 28 dias após a implantação da esponja; grupo dose única, os animais foram submetidos a 5,28 R, no momento da implantação da esponja e sacrificados nos mesmos períodos; e o último grupo, em que os animais sofreram irradiação fracionadas da seguinte forma: 5,28 R a cada 2 dias após a implantação da esponja, durante 14 dias, e a cada 4 dias até complementar 28 dias, com dose total de 58,08 R, com os dias de sacrifícios iguais aos anteriores. Foi observado que esta radiação causou retardo na evolução do tecido de granulação nos dois grupos irradiados, quando comparado ao grupo controle, sendo que este retardo foi mais evidente para o grupo que recebeu dose fracionada. Os autores observaram ainda que os efeitos de retardamento na evolução dos tecidos, para os dois grupos irradiados, foram mais evidentes nas fases precoces de desenvolvimento.

Os resultados das microcirurgias vasculares realizadas após a colocação de retalhos cirúrgicos, em cirurgias reconstrutivas, são duvidosos quando a área receptora é previamente irradiada. Em 1992, Aitasalo *et al.*, estudaram a cicatrização entre retalhos de pele de microvasculatura livre, onde foram criadas anastomoses sobre superfícies receptoras irradiadas e não

irradiadas. Utilizaram ratos que tiveram suas virilhas irradiadas com uma dose única de 20 Gy. Sete dias após a irradiação, realizou-se uma ferida padrão no centro da região. Um retalho de pele não irradiado foi sobreposto sobre a região irradiada. A cicatrização desta interface da pele irradiada e retalho transferido foi avaliada. Os autores concluíram que não houve diferenças na capacidade da reparação de retalhos de pele na microcirurgia vascular entre áreas receptoras irradiadas ou não irradiadas.

Bernstein *et al.*, em 1993, realizaram uma revisão de literatura sobre a ação da radiação ionizante na pele, com parâmetro a resistência da ferida ao rompimento. Constataram que após duas semanas as feridas aumentaram 30% de sua resistência original, enquanto aquelas que receberam uma dose de 18 Gy de radiação X, antes da realização da ferida, reduziram 50% de sua resistência. Os autores também relataram a presença de uma diminuição da síntese de colágeno nas feridas irradiadas, recuperando-se 2 semanas depois. Ressaltaram que a radiação é prejudicial, devido o efeito tóxico nos fibroblastos, que são responsáveis pela deposição e maturação do colágeno na ferida.

Wang *et al.*, em 1994, observaram o efeito da radiação de elétrons no processo de reparação de feridas em pele de ratos. Para tanto, foi utilizado um feixe de elétrons de 4 MeV, com profundidade de 3 mm, com uma dose única de 9,6 Gy. Após 7 dias da irradiação, realizou-se uma incisão de 20 mm de comprimento, na área irradiada. O sacrifício dos animais foi após 1, 3, 7 e 14 dias da produção das incisões. As amostras foram analisadas por microscopia

eletrônica de varredura e por microscopia de luz. Os autores observaram que até o 7º dia houve um atraso na formação do tecido de granulação, que se restabeleceu por volta do 14º dia.

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

Em 1997, Almeida avaliou morfológica e ultra-estruturalmente o efeito de baixas doses de radiação de elétrons no processo de reparação tecidual em ratos e comparou os possíveis efeitos produzidos pela radiação, quando esta foi realizada imediatamente e três dias após a abertura da ferida, com o processo de reparação tecidual normal. Para a realização do trabalho, os animais foram submetidos a um procedimento cirúrgico, onde produziu-se uma ferida retangular, medindo 2,3 cm por 1,4 cm, na sua região dorsal anterior. As feridas, bem como o restante do corpo do animal, foram protegidos no momento da irradiação, sendo exposta somente uma região correspondente a 1,0 cm lateralmente a cada borda da ferida. Um grupo de animais foi submetido à radiação imediatamente após a abertura da ferida. Outro grupo sofreu irradiação três dias após a injúria. Os animais foram sacrificados aos 2, 4, 7, 11, 14, 17 e 21 dias após o procedimento

cirúrgico para o primeiro grupo. Para o segundo grupo, os animais foram sacrificados aos 5, 7, 10, 14, 17, 20 e 24 dias, também após a abertura das feridas. O material de cada grupo foi comparado com grupos controles correspondentes, nos quais não foi realizada a irradiação. A reparação tecidual foi avaliada, pelos seguintes métodos: coloração pela hematoxilina-eosina, que possibilitou avaliar a morfologia do tecido de granulação; reação histoquímica de metacromasia pelo azul de toluidina pH 4,0, podendo avaliar-se deste modo a síntese de glicosaminoglicanas e por fim impregnação argêntica, onde observou a síntese de colágeno, através da microscopia de polarização (birrefringência). Os resultados demonstraram que 1,0 Gy de radiação de elétrons com um feixe de 6 MeV, causou um retardo no processo de reparação tecidual, quando aplicado imediatamente e três dias após a abertura da ferida, sendo que quando comparados os dois grupos irradiados, para os dias 7, 14 e 17, o efeito da reparação tecidual foi mais acentuado no grupo que sofreu irradiação três dias após a abertura da ferida.

Monteiro, em 1999, com a finalidade de estudar o efeito da irradiação por elétrons em tecido de reparação, utilizou-se de 75 ratos, divididos em 3 grupos. Foram realizadas feridas excisionais medindo 2 cm x 1 cm. O grupo controle foi analisado nos tempos: 2, 4, 5, 7, 10, 11, 14, 17, 20, 21 e 24 dias. O grupo ferida irradiada imediatamente após a cirurgia foi analisado nos tempos 2, 4, 7, 11, 14, 17 e 21 dias. O grupo tecido de granulação, irradiado 3 dias após a remoção do tecido, foi analisado nos tempos 5, 7, 10, 14, 17, 20 e 24 dias. O feixe

de elétrons foi produzido por um acelerador linear Mevatron 74, com 6 MeV de energia, com dose de 1 Gy . Os resultados mostraram atraso na reparação dos tecidos irradiados imediatamente após a cirurgia e no 3º dia da gênese tecidual, sobretudo naqueles irradiados no 3º dia de formação. Ao final do período experimental, observou que todos os tecidos apresentavam características bastante semelhantes, indicando atraso transitório.

2.2- Radiação ionizante e vitamina E

Segundo Marcus & Coulston, em 1996, a vitamina E foi demonstrada pela primeira vez por Evans & Bishop, em 1922, verificando que ratas necessitavam de um princípio dietético com vitamina E, então desconhecido para manter a gravidez normal. Observaram que os animais com essa deficiência ovulavam e concebiam normalmente, porém, em algum momento da gestação ocorria a morte e reabsorção dos fetos, além de lesões nos testículos. Diante desses fatos a vitamina E foi denominada como "vitamina antiesterilidade".

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

Londer & Myers, em 1952, avaliaram a habilidade da vitamina E, em diminuir os radicais livres, protegendo contra o efeito de uma dose letal de

radiação X corpo todo em ratos. Os animais foram divididos em 4 grupos: No primeiro grupo, foi administrada uma dose de 30 U.I. de alfa-tocoferol, intraperitonealmente um dia antes da irradiação. No segundo grupo, os animais receberam 60 U.I. e o terceiro grupo 90 U.I.. O quarto grupo correspondia ao grupo controle, no qual os animais receberam uma dose de solução salina, intraperitonealmente, um dia antes da irradiação. O aparelho de raios X operou com 200 kVp, 15 mA, com dose de 132 rads por minuto. Os autores observaram que todos os animais do grupo controle morreram com dose total de 650 rads. Os animais que receberam um pré-tratamento de vitamina E, principalmente os que receberam 30 U.I., prolongaram sua sobrevivência, mas não a sobrevivência global. Os autores verificaram também que nos animais que receberam uma dose total de 550 rads houve uma maior sobrevivência, 85% nos animais do grupo 1, 60% nos animais do grupo 2 e 50% nos animais do grupo 3, enquanto que apenas 25 % dos animais do grupo controle sobreviveram.

Hoffer & Roy, em 1975, investigaram a influência da deficiência de vitamina E na progressiva alteração da fragilidade dos eritrócitos em ratos submetidos à irradiação X corpo todo, com dose de 500 rads. Um grupo de 24 ratos foi mantido com uma dieta pobre em vitamina E durante 43 dias e outro grupo de 24 animais com dieta normal. Após esse período de tempo, os animais receberam 500 rads de radiação X, com dose de 25 rads/minuto. Depois da irradiação os animais continuaram a receber suas respectivas dietas. Os animais foram sacrificados em vários tempos e seu sangue coletado. Um teste de

hemólise espontânea foi utilizado para avaliar a fragilidade dos eritrócitos, verificando que os animais que tiveram falta de vitamina E em suas dietas tinham seus eritrócitos mais frágeis que os animais do grupo controle.

Malick *et al*, no ano de 1978, estudaram o efeito radioprotetor da vitamina E na sobrevivência de ratos submetidos à irradiação de 800 Rads de radiação gama do Cobalto 60 (^{60}Co). Os animais foram divididos em 8 grupos, durante 30 dias, variando a concentração de vitamina E na dieta pré e pós-irradiação (30 a 60 U.I. de dl – alfa – tocoferil) e/ou no tratamento pela injeção intraperitoneal de vitamina E (60 U.I. de dl – alfa – tocoferil), imediatamente após a irradiação. Os resultados mostraram que não houve diferença significativa entre os animais que tiveram dietas ricas em vitamina E antes da irradiação e subseqüentemente mantida com a mesma dieta e os animais que tiveram dietas deficientes em vitamina E antes e depois da irradiação. Foi verificada a queda da mortalidade nos grupos que se submeteram às injeções intraperitoneais imediatamente após a irradiação, tanto nos ratos mantidos com dieta rica ou quanto naqueles cuja dieta foi deficiente em vitamina E. Os autores constataram, que o decréscimo na mortalidade com as injeções de vitamina E esta associado ao aumento da resposta imune ou aumento da recuperação da medula óssea.

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

Em 1979, Konings & Drijver, estudaram o efeito da radiação X nas membranas lipídicas em ratos com deficiência de vitamina E. Foi utilizado 2 grupos de animais, no primeiro grupo, os animais receberam alimentação normal, enquanto os animais do segundo grupo receberam uma alimentação com deficiência de vitamina E. A irradiação foi de corpo todo com dose de 1 Gy por minuto. Os autores observaram que os animais com deficiência de vitamina E apresentaram-se mais sensíveis à irradiação X, nos quais as membranas celulares tornaram-se mais vulneráveis à peroxidação lipídica.

Rostock *et al.*, em 1980, avaliaram altas dose de vitamina E como agente radioprotetor. Foram divididos 60 ratos em seis grupos, sendo que cada grupo recebeu radiação gama do ^{60}Co com doses de 0,1 rad, 1500 rads, e 2000 rads. Trinta animais receberam 2,5% de vitamina E na dieta por duas semanas antes da irradiação e foi administrada uma dose única de 150 mg de vitamina E, por via intraperitoneal, 4 horas antes da irradiação, em cada animal. Os pesquisadores compararam as curvas histológicas dos pulmões e dos corações dos animais por 180 dias. Os autores observaram que não houve diferença significativa entre os animais dos grupos que utilizaram a vitamina E no pré-tratamento e os dos grupos controles.

Neste mesmo ano, Konings & Oosterloo, compararam os efeitos da radiação X e de ozônio, com dose de 0,9 e 1 Gy por minuto, com duração de 17 horas respectivamente, na peroxidação lipídica e a relação dos antioxidantes presente nesse processo. Os autores afirmaram que a radiação de ozônio foi mais

danosa, no que diz a respeito da peroxidação lipídica e que os antioxidantes diminuem significativamente esse processo.

Sarria & Prasad, em 1984, observaram o efeito do succinato de dl- α -tocoferil (5 μ g/ml) dissolvido em etanol (concentração de 0.25%), em cultura de neuroblastomas e fibroblastos de ratos, utilizando a radiação gama do ^{60}Co . Os resultados obtidos mostraram que o succinato de dl- α -tocoferil aumentou o efeito da inibição da radiação gama no crescimento da cultura de neuroblastomas, mensurado pela morte e inibição de divisão celular, mas não produziu modificações significativas no efeito da radiação gama na cultura dos fibroblastos de ratos. Nesse trabalho, os autores sugerem que a ação da vitamina E em modificar os efeitos da radiação em células tumorais talvez seja mediada, em parte, por um mecanismo antioxidante.

Em 1985, Shiraishi *et al.*, estudaram a peroxidação da membrana lipídica de células de ratos, induzida pela radiação X, e inibidores desse processo. As substâncias estudadas foram a cefarantine e alfa-tocoferol. Os autores observaram que a vitamina E inibia fortemente a peroxidação das membranas pela irradiação. Entretanto, a cefarantine exibiu pouca inibição.

Taren *et al.*, em 1986, pesquisaram a administração profilática da vitamina E na cicatrização de feridas expostas à radiação ionizante pré-operatória. Os autores utilizaram 36 ratos, divididos em seis grupos (A, B, C, D, E e F). Foi utilizado o acetato de dl- α -tocoferil, dissolvido em óleo sesame para as injeções intraperitoneais. Os animais dos grupos A e B sofreram irradiações pré-

operatórias, sendo que o grupo A não recebeu nenhuma substância, e o grupo B recebeu injeções de 0,2 ml de óleo sesame. Os ratos dos grupos C, D e E receberam as injeções, em 3 doses iguais em dias alternados, de 10, 20, e 40 UI de vitamina E, respectivamente, dissolvidos em 0,2 ml de óleo sesame. O grupo F foi o grupo controle não irradiado. No sétimo dia, os ratos dos grupos A, B, C, D, e E receberam, sob anestesia, uma dose de 600 rads utilizando um feixe de elétrons de 6 MeV, ao longo da linha média do dorso do animal, sendo que a área irradiada mediu 12,5 cm por 1,0 cm, e o restante do corpo do animal foi protegido por um avental de chumbo. Após duas horas desse procedimento, realizaram, sob anestesia, duas incisões de 5,0 cm, com 2,0 cm entre si. Após quatorze dias, os ratos foram sacrificados. Observou-se que a radiação reduziu significativamente a resistência à tensão das feridas cirúrgicas; entretanto não houve relação significativa entre o ganho na resistência à tensão e a dose de vitamina E nas feridas que receberam Irradiação pré-operatória. Os autores, diante disso, administraram em um novo grupo de ratos, 120 UI de vitamina E em 0,2 ml de óleo sesame e obtiveram como resultado um aumento da resistência média à tensão das feridas para 95% do controle não irradiado, sugerindo então, que a vitamina E reduz os efeitos deletérios da radiação.

Em 1993, Rana *et. al.* administraram vitamina E (90 U.I.) em filhotes de galinha antes da irradiação gama do ^{60}Co , com dose sub-letal de 2,25 Gy. Os resultados desse trabalho mostraram que a vitamina E ajuda na recuperação das injúrias causadas pela irradiação, no timo desses filhotes.

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

Em 1994, Simom *et al.*, correlacionaram o efeito radioprotetor da vitamina E na radiação por laser de argônio e cobre em feridas em pele de porcos. Os animais foram divididos em três grupos: o controle, o tratamento tópico de vitamina E, sendo 18 horas antes da irradiação e o tratamento intramuscular de vitamina E, com dose de 5 mg/kg em 3 injeções administradas 24, 12, e 2 horas antes da irradiação. A irradiação ocorreu no dia seguinte. O tempo de cicatrização da ferida foi estatisticamente menor nos animais que receberam o tratamento prévio de vitamina E, principalmente naqueles que a receberam por via intramuscular.

Carrool *et al.*, em 1995, verificaram alguns agentes radioprotetores na prevenção de injúrias provocadas por radiação gama no intestino de ratos.

Foram utilizados 72 ratos, em 8 grupos: o grupo controle sem irradiação; o grupo controle irradiado, com dose de 40 Gy na região do abdômen; e seis grupos, que além da irradiação, receberam tratamentos de agentes radioprotetores: ribose-cisteína, WR-2721, glutamina, vitamina E, MgCl₂/adenosina trifosfato, e a combinação da ribose-cisteína e glutamina. Após duas semanas da irradiação, os ratos sofreram uma resecção do intestino e posteriormente realizaram-se anastomoses. Após uma semana, avaliaram-se as anastomoses e determinou-se a força necessária para o rompimento das mesmas. Os animais do grupo controle não irradiado tiveram as forças de rompimentos das anastomoses maiores, quando comparadas com as dos animais dos demais grupos. As anastomoses dos grupos tratados com ribose-cisteína, WR-2721, ribose-cisteína combinada com glutamina e vitamina E mostrou uma maior resistência à força nas anastomoses realizadas nos intestinos delgados.

Ainda em 1995, Felemovicius *et al.*, estudaram a radioproteção da vitamina E no intestino grosso de ratos. Realizaram-se a exteriorização dos intestinos e os segmentaram em 4 camadas, sendo que cada compartimento foi preenchido com soluções teste, 30 minutos antes da irradiação: solução salina, óleo de soja, fosfato de tocoferol (solubilizado em solução salina) e acetato de dl-alfa-tocoferil (solubilizado em óleo de soja). Os animais foram irradiados com dose de 1100 cGy de radiação X. Os animais foram sacrificados após 5 dias, os 4 segmentos foram analisados quanto a sobrevivência das criptas intestinais, altura da mucosa e a preservação das células globulares. Os autores observaram que

nas três avaliações a vitamina E, nas duas formas, promoveu uma proteção significativa nos intestinos desses animais. Os autores também administraram em outro grupo de animais uma dieta rica em vitamina E, 10 dias antes da irradiação e resultados semelhantes foram observados.

Marcus & Coulston, em 1996, afirmaram que uma das mais importantes características químicas dos tocoferóis é de que eles são antioxidante, impedindo a oxidação de constituintes essenciais, como a ubiquinona (coenzima Q), ou impede a formação de produtos tóxicos da oxidação, como os produtos de peroxidação formados a partir de ácidos graxos insaturados. Afirmam também que um suplemento de vitamina E proporciona proteção contra diversas drogas, metais e substâncias químicas que podem iniciar a formação de radicais livres.

Galligan *et al.*, em 1997, investigaram o efeito radioprotetor de antioxidantes em linfócitos isolados. Nesse trabalho foram administrados intraperitonealmente 5 doses de vitamina C (300 mg/Kg), vitamina E (400 mg/Kg) ou β -caroteno (100 mg/Kg). Após 24 horas foi removido o sangue dos animais por punção cardíaca e os linfócitos foram isolados. Essas células, então, foram irradiadas com doses de 0,1 a 5 Gy, de radiação X, utilizando 300 kVp. A avaliação foi feita pela mensuração das quebras do DNA. Os autores observaram que todos os antioxidantes aumentaram significativamente a proteção dos linfócitos irradiados “in vivo”, sendo que a vitamina C protegeu em todas as doses da irradiação utilizadas e a vitamina E e o β -caroteno para as doses de 3 a 5 Gy.

Porém em se tratando de dietas desses antioxidantes, a vitamina C e E foram os antioxidante mais efetivos contra injúrias no DNA induzidas por baixas doses de radiação.

Konopacka *et al.*, em 1998, avaliaram o efeito radioprotetor da vitamina C, E e β -caroteno em injúrias do DNA em células de ratos. Essas injúrias foram mensuradas pelo teste micronuclear nos eritrócitos da medula óssea e nas células da bexiga esfoliadas em ratos. As vitaminas foram administradas por via oral, 5 dias consecutivos antes ou imediatamente depois da irradiação em várias concentrações: Vitamina C (ácido ascórbico) – 10, 50, 100, 200 e 400 mg/Kg/dia; Vitamina E (alfa-tocoferol) – 50, 100 e 200 mg/Kg/dia; β -caroteno – 3, 6 e 12 mg/Kg/dia. Nos animais do grupo controle foi administrado a mesma quantidade dos solventes: água, solvente da vitamina C e óleo, solvente da vitamina E e solvente do β -caroteno. A irradiação utilizada foi a gama, pelo ^{60}Co , com dose de 2 Gy. Os autores observaram que o pré-tratamento de vitamina E foi efetivo na proteção contra a irradiação, observando diminuição das injúrias no DNA em todas as doses, mas as diferenças significantes com o controle ocorreram nas concentrações 100-200 mg/Kg/dia de alfa-tocoferol. No pré-tratamento de β -caroteno a dose efetiva significativa foi a de 12 mg/Kg/dia. A vitamina C mostrou-se efetiva em altas concentrações (400 mg/Kg/dia), porém pouco visível. Os autores também fizeram uma associação entre vitamina C (50 mg/Kg/dia), vitamina E (200 mg/Kg/dia) e β -caroteno (12 mg/Kg/dia) e observou maior efeito radioprotetor, concluindo que a associação a associação destes compostos pode

ser realizada não somente para remover os radicais livres, mas também para aumentar a capacidade de reparo do DNA.

Os efeitos da suplementação da vitamina E foram avaliadas em culturas de fibroblastos humanos expostos as radiações ultravioletas, por Nocentini *et al.* (2001). Células foram incubadas contendo a vitamina 24 horas antes à exposição. A avaliação deste estudo foi por meio da verificação da presença de injúrias no, imediatamente após a irradiação e depois desta em vários períodos. Como resultados, observou-se que o grupo tratado com vitamina E apresentou persistência para o aparecimento de injúrias no DNA.

Em 2002, Kumar *et al.* compararam o efeito da vitamina E (succinato d-alfa-tocoferil), na indução de injúrias no cromossomo de células cancerígenas, e em células normais. Para isso, utilizaram 3 culturas de fibroblastos humanos e 3 culturas de células tumorais (câncer cervical – HeLa, e carcinoma de ovário – OVGI e SKOV3). Após 30 minutos da irradiação gama (100 cGy), observaram injúrias nos cromossomos em todas as células cancerígenas. Estes danos não foram verificadas nas culturas de fibroblastos

A irradiação ultravioleta conduz a distintas mudanças no tecido conjuntivo da pele, como degradação do colágeno. Muitas destas alterações é na matriz extracelular que são mediadas pelo aumento das MMPs (matriz de metaloproteinase) na redução de seu antagonista (inibidores da metaloproteinase). Hantke *et al.* (2002) estudaram várias substância que reduzem estas MMPs após a radiação solar (vitamina C, vitamina E e flavonóides).

Utilizaram fibroblastos da derme para este estudo, onde observou redução dos níveis de MMPs, principalmente os flavonóides.

Manzi *et al.*, em 2003, avaliaram a ação da vitamina E, como radioprotetora no processo de reparação tecidual em ratos. Após sofrerem um procedimento cirúrgico, que constituiu da produção de uma ferida na região dorsal anterior. Os animais foram divididos em 8 grupos: grupo C (controle) – constituindo de animais onde foi realizada somente a ferida, grupo VE – pré-tratamento com vitamina E (90 UI), grupo IR – irradiação 3 dias após à cirurgia, grupo VEIR – pré tratamento com 90 UI de vitamina E e irradiação de suas bordas 3 dias após à cirurgia e grupo OIR – pré tratamento com óleo de oliva e irradiação de suas bordas 3 dias após à cirurgia. A ação radioprotetora da vitamina E foi avaliada pela coloração por hematoxilina-eosina para análise morfológica do tecido de granulação, aos 4, 7, 14 e 21 dias após a cirurgia. A análise dos resultados mostrou que o retardo no processo de reparação tecidual causado por 6 Gy de radiação de elétrons com um feixe de 6 MeV, não ocorreu no grupo de animais que recebeu vitamina E, mostrando-se esta substância efetiva como radioprotetora.

Ainda em 2003, Jones *et al.* desenvolveram um modelo de cultura celular para estudar a radioproteção da vitamina E. A célula estudada foi o fibroblasto, onde foram expostos à radiação ultravioleta. Os critérios para avaliação morfológica foram quanto ao tamanho e forma celular, presença de pleomorfismo nuclear e quanto às alterações na membrana celular e no citoplasma destas células. O experimento foi dividido em 2 fases: na primeira fase, as células foram

expostas à radiação por intervalos de 30, 45 e 60 minutos, e analisadas a cada intervalo; e na segunda fase, a vitamina E foi administrada nas células antes da exposição de 45 minutos. Observou-se que, na exposição de 45 minutos causou injúrias nas células estudadas, além de fragmentações. Entretanto, no grupo que utilizou a vitamina E, verificou-se menor dano nessas células.

3- Proposição

Propõe-se neste trabalho a avaliação do efeito radioprotetor da vitamina E em diferentes doses no processo de reparação tecidual, verificando-se o desenvolvimento morfológico e histométrico do tecido de granulação e as suas possíveis alterações.

4- Materiais e Métodos

Materiais

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

Os procedimentos experimentais consistiram de 6 fases distintas: Fase 1: Terapêutica; Fase 2: Anestesia; Fase 3: Cirúrgica; Fase 4: Irradiação; Fase 5: Obtenção das peças e Fase 6: Preparação das lâminas para microscopia óptica. Para a realização destas fases, foram utilizados os seguintes materiais:

Fase 1: Terapêutica

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

Fase 2: Anestesia

➤ Solução anestésica injetável de pentabarbital de sódio, Hypinol a 3%®, do Laboratório Fantoveter, divisão Cristália;

➤ Seringas hipodérmicas para insulina com agulhas intradérmicas;

Fase 3: Cirúrgica

➤ Mesa cirúrgica, contendo tesoura reta de ponta fina, pinça reta, pinça dente de rato, cabo de bisturi, lâminas de bisturi nº 11 e gaze esterilizada;

➤ Gabarito de plástico - retângulo de 2,5 cm x 1,5 cm;

Fase 4: Irradiação

➤ Acelerador linear, modelo Mevatron 74, da Siemens;

➤ Lâmina de chumbo de 4 mm de espessura;

Fase 5: Obtenção das peças

➤ Éter etílico P.A.;

➤ Solução de cloreto de sódio;

➤ Papel filtro;

➤ Recipientes de vidro para o armazenamento das peças;

➤ Fixador de Lillie;

➤ Campânula;

Fase 6: Preparação das lâminas para a microscopia óptica

- ➔ Álcool 70%;
- ➔ Álcool absoluto;
- ➔ Xilol;
- ➔ Paraplasty Plus para inclusão;
- ➔ Micrótomo;
- ➔ Estufa;
- ➔ Hematoxilina – Eosina .

Métodos

A amostra foi dividida, de forma aleatória, em 8 grupos (**C**, **VE60**, **VE90**, **IR**, **VE60IR**, **VE90IR**, **OOL** e **OOLIR**). Cada animal foi identificado com uma marca código, utilizando-se um pincel atômico. Os animais do grupo **C** sofreram apenas a cirurgia. Na fase 1, os ratos do grupo **VE60** receberam 3 doses de injeções intraperitoneais de acetato de dl-alfa-tocoferil (vitamina E), com 60 U.I. em cada dose, dissolvidas em 1 ml de óleo de oliva, com intervalo de 48 horas e no sétimo dia foram submetidos à cirurgia. Os animais do grupo **VE90** diferenciaram-se em relação aos animais do grupo **VE60** apenas em relação à dose de vitamina E, nos quais foram administradas 90 U.I.. Os animais do grupo **IR** não receberam tratamento prévio com vitamina E, porém 3 dias após a cirurgia, sofreram irradiação. Os animais do grupo **VE60 IR** foram também submetidos a 3 doses intraperitoneais de vitamina E com doses e procedimentos idênticos aos do grupo **VE60**, inclusive no que diz respeito à realização da cirurgia, porém, 3 dias

após a cirurgia, as bordas de suas feridas foram irradiadas. Os ratos do grupo **VE90 IR** diferenciaram-se dos animais do grupo anterior pela dosagem de vitamina E, que foi de 90 U.I. cada injeção. Foram administrados nos animais do grupo **OOL** 3 injeções de 1 ml de óleo de oliva com intervalo de 48 horas e no sétimo dia foi realizada a cirurgia. Finalizando, os animais do grupo **OOL IR** tiveram o mesmo tratamento dos animais do grupo **OOL**, porém após 3 dias da cirurgia, tiveram as bordas das feridas irradiadas.

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

TABELA 1

Procedimentos realizados em cada grupo.

Grupos	Procedimentos
C	Ferida
VE60	Ferida + Vitamina E (3 doses de 60 U.I.)
VE90	Ferida + Vitamina E (3 doses de 90 U.I.)
IR	Ferida + Irradiação
VE60IR	Ferida + Vitamina E (3 doses de 60 U.I.) + Irradiação
VE90IR	Ferida + Vitamina E (3 doses de 90 U.I.) + Irradiação
OOL	Ferida + óleo de oliva (3 doses de 1 ml)
OOLIR	Ferida + óleo de oliva (3 doses de 1 ml) + Irradiação

Para todos os grupos estudados, obteve-se as peças após 4, 7, 14 e 21 dias da realização da cirurgia.

Na fase 2, os animais foram anestesiados por injeção intraperitoneal de pentabarbital de sódio, com dose de 40 mg/Kg de peso corpóreo. A tricotomia

foi realizada em uma grande área da região dorsal, manualmente, a fim de evitar-se a irritação química e mecânica na pele dos animais.

Na fase 3, para a produção da ferida, foram realizadas quatro incisões, que unidas entre si, possibilitavam a retirada de um retângulo de tecido dérmico de 2,5 cm x 1,5 cm na região dorsal anterior de cada animal, com distância de aproximadamente 10 mm à direita da espinha dorsal, com os lados maiores do retângulo paralelos a esta. A profundidade de cada incisão atingiu aproximadamente 2 mm, tendo como base da ferida o tecido muscular. As feridas foram realizadas sempre na mesma região, para promover uniformidade da amostra.

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

Após o tempo previamente estabelecido para a reparação tecidual, os animais foram sacrificados com éter etílico, para a remoção das peças (fase 5). Cada peça cirúrgica era constituída por uma porção de tecido, contendo a ferida ou cicatriz no centro, circundada por tecido normal. As incisões para a retirada dessas peças, foram realizadas sempre na mesma profundidade daquelas

produzidas na confecção das feridas. Após removidas, as peças foram devidamente lavadas com solução fisiológica, secas em papel absorvente e mantidas em recipiente com solução fixadora de Lillie até à inclusão. Nesta solução, as peças permaneceram por, no mínimo, 72 horas.

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

a- Coloração por Hematoxilina – Eosina (HE):

Com esta coloração, observou-se as características histológicas da maturação do tecido, desde o período inicial (4º dia) até o final (21º dia). Avaliou-se, também, a dimensão das feridas e a presença do infiltrado inflamatório. Foi observado o padrão de epitelação das feridas nos vários tratamentos, a morfologia do tecido de granulação e a maturação das fibras colágenas.

b- Análise morfométrica dos fibroblastos

O estudo morfométrico para a contagem dos fibroblastos foi realizada em microscópio óptico ZEISS Germany, com aumento de 40/0.65, por meio de uma ocular contendo retículo, lente PK 8 x mn, fabricação ZEISS; West Germany. A contagem dos fibroblastos foi realizada nos grupos de 4 e 7 dias, que é o

período de maior atividade fibroblástica, sendo avaliados 10 campos em cada lâmina. A partir das medidas, foram obtidas as médias relativas a cada grupo, para então serem submetidas ao teste de Tukey, ao nível de significância de 5%.

5- Resultados

1- Descrição morfológica: Coloração por Hematoxilina-Eosina

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

4º dia de reparação tecidual

GRUPOS C, VE60, VE90, VE60IR e VE90IR- A área da ferida, que apresentou-se extensa, encontrando-se coberta por uma crosta de material necrótico que serve como proteção para o tecido de granulação incipiente, tendo como célula inflamatória predominante o linfócito. Este tecido de granulação apresentou-se com poucos fibroblastos, muitas células redondas, início de néo formação vascular e com formação incipiente de fibras, sendo que nos grupos **VE60** e **VE90** este tecido apresentou um processo de reparo mais adiantado do que os demais grupos. (FIG. 1, 1a, 2, 2a, 3, 3a, 5, 5a, 6 e 6a).

GRUPOS IR, OOL e OOLIR- A área da ferida nos animais destes grupos mostrou-se mais extensa que nos grupos citados anteriormente,, bem como a espessura da crosta. O tecido de granulação ainda foi ausente em várias

regiões da ferida e, nas regiões que estava presente, a quantidade de células e fibras também foi menor do que nos grupos supra citados (FIGS. 4, 4a, 7, 7a, 8 e 8a).

7º dia de reparação tecidual

GRUPOS C, VE60, VE90, VE60IR e VE90IR - Observou-se que a área da ferida sofreu uma redução, apresentando-se ainda recoberta pela crosta superficial, porém sem a presença de tecido necrótico abaixo desta crosta. A ferida apresentou-se com tecido de granulação típico, ou seja, vasos neo formados, grande número de fibroblastos e presença de fibras, com diminuição das células redondas. O tecido de granulação dos grupos **VE60** e **VE90** mostrou-se mais organizado. O epitélio ainda esteve ausente (FIGS. 9, 9a, 10, 10a, 11, 11a, 13, 13a, 14 e 14a).

GRUPOS IR, OOL e OOLIR- A área da ferida também encontrou-se reduzida, mas apresentando-se mais extensa quando comparada à área dos grupos acima citados. A crosta ainda mostrou-se presente, sem a presença do tecido necrótico abaixo. O tecido de granulação apresentou neo formação vascular, entretanto, com menor número de vasos. Foram observados grande número de fibroblastos, com o tecido apresentando poucas fibras e células redondas ainda em grande número. O epitélio também mostrou-se ausente nesta fase da reparação tecidual (FIGS. 12, 12a, 15, 15a, 16 e 16a).

14º dia de reparação tecidual

GRUPOS C, VE60, VE90, VE60IR e VE90IR - A ferida contraiu-se bastante e a crosta foi eliminada. O tecido de granulação se apresentou maduro, havendo grande quantidade de fibras colágenas em forma de feixes,, vasos sangüíneos funcionais e diminuição no número de fibroblastos. O epitélio recobriu toda a ferida, apresentando-se espesso e com criptas com grandes projeções para o tecido conjuntivo. Nos grupos **VE60** e **VE90**, este epitélio apresentou-se mais delgado (FIGS. 17, 17a, 18, 18a, 19, 19a, 21, 21a, 22 e 22a).

GRUPO OOL - O tamanho da ferida foi semelhante ao dos grupos citados anteriormente, porém com resquícios de crosta. No que se refere ao tecido de granulação, este se mostrou bastante celular, ou seja, o número de fibroblastos ainda foi elevado, quando comparado aos outros grupos. A formação do epitélio também esteve atrasada, apenas iniciando sua migração (FIGS. 23 e 23a).

GRUPO IR - O tamanho da ferida ainda apresentou-se grande e sem a presença da crosta. O tecido de granulação apresentou-se mais atrasado em relação aos grupos anteriormente citados, ou seja, mais celular e menos fibroso, embora os vasos sangüíneos já indicassem funcionamento. O epitélio já recobria toda a ferida (FIGS. 20 e 20a).

GRUPO OOLIR - Este foi o grupo que apresentou o processo de reparo mais atrasado, pois a ferida mostrou-se extensa e o epitélio ainda ausente.. O tecido de granulação foi muito semelhante a do grupo IR, ou seja, poucas fibras colágenas e muitos fibroblastos (FIGS. 24 e 24a).

21º dia de reparação tecidual

GRUPOS C, VE60, VE90, VE60IR e VE90IR O epitélio, que recobriu toda a ferida, mostrou-se maduro, ou seja, pouco espesso, sem grandes projeções de criptas para o tecido conjuntivo adjacente, e já queratinizado. Pode-se observar alguns anexos da pele, como glândulas sebáceas e folículos pilosos.. O tecido apresentou-se fibroso, com um grande número de feixes de fibras colágenas e poucos fibroblastos, em fase de cicatrização (FIGS. 25, 25a, 26, 26a, 27, 27a, 29, 29a, 30 e 30a).

GRUPOS IR, OOL e OOLIR - As feridas apresentaram-se menos contraídas que nos grupos já descritos. O epitélio recobriu toda a ferida, mas não apresentou-se maduro, pois não foram observados anexos da pele e o processo de queratinização mostrou-se atrasado. O tecido de granulação mostrou-se mais celular e menos fibroso, quando comparado com os demais grupos. (FIGS. 28, 28a, 31, 31a, 32 e 32a).

2- Análise morfométrica dos fibroblastos.

Os dados obtidos na contagem dos fibroblastos, foram submetidos ao Teste de Tukey para os grupos dentro de cada período de tempo.

A análise estatística dos resultados referentes ao 4º dia, estão apresentados na TAB. 2 e na FIG. 33 e mostra que não existe diferença significativa ($p < 0.05$) entre as médias do número de fibroblastos dos grupos **C**, **VE60**, **VE90**, **VE60IR** e **VE90IR**, que correspondem aos grupos controle e os que tiveram o tratamento prévio com vitamina E, tantos os não irradiados quanto os irradiados. O grupo **OOL** vem em seguida, com média significativamente menor ao demais citados. E os grupos **IR** e **OOLIR** apresentaram médias estatisticamente menores.

Não foram feitos os gráficos da reparação tecidual aos 14 e 21 dias das medias dos números de fibroblastos dos grupos, em virtude de nestes períodos, o numero de fibroblastos terem diminuído, e sendo substituído por feixes de fibras colágenas.

TABELA 2

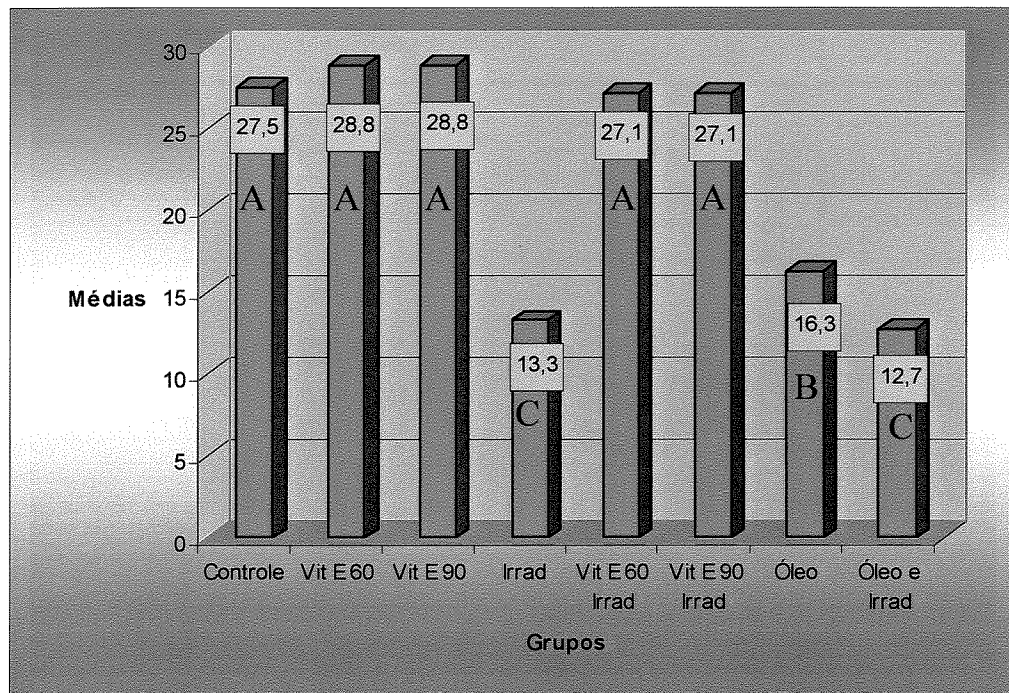
Médias e desvios padrão dos números de fibroblastos no 4º dia de
reparação tecidual

Grupos	Médias		Desvios
			Padrão
VE90- Ferida+Vit.(90UI)	28.8	A	1.53
VE60- Ferida+Vit.(60UI)	28.8	A	1.24
C- Ferida	27.5	A	1.02
VE90IR- Ferida+Vit(90UI)+IRad	27.1	A	1.04
VE60IR - Ferida+Vit(60UI)+IRad	27.1	A	0.94
OOL- Ferida+Óleo	16.3	B	1.41
IR- Ferida+Irradiação	13.3	C	1.26
OOLIR- Ferida+Óleo+IRad.	12.7	C	1.26

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

Observação Histométrica

Gráfico das médias do número de fibroblastos em função do grupo, no 4º dia de reparação tecidual.



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

FIGURA 33 – Gráfico das médias do número de fibroblastos em função do grupo, no 4º dia de reparação tecidual.

A TAB. 3 e a FIG. 34 são referentes à análise estatística utilizando-se o Teste de Tukey dos resultados do 7º dia de reparação tecidual. Entre os grupos **C**, **VE60**, **VE90**, **VE60IR** e **VE90IR**, as médias do número de fibroblasto não diferem entre si ($p < 0.05$), apresentando os maiores valores. Porém os grupo **IR**, **OOL** e **OOLIR** apresentaram médias estatisticamente menores que o grupo **C**. Esses grupos, portanto, mostraram-se mais atrasados que os grupos que tiveram tratamento prévio com vitamina E.

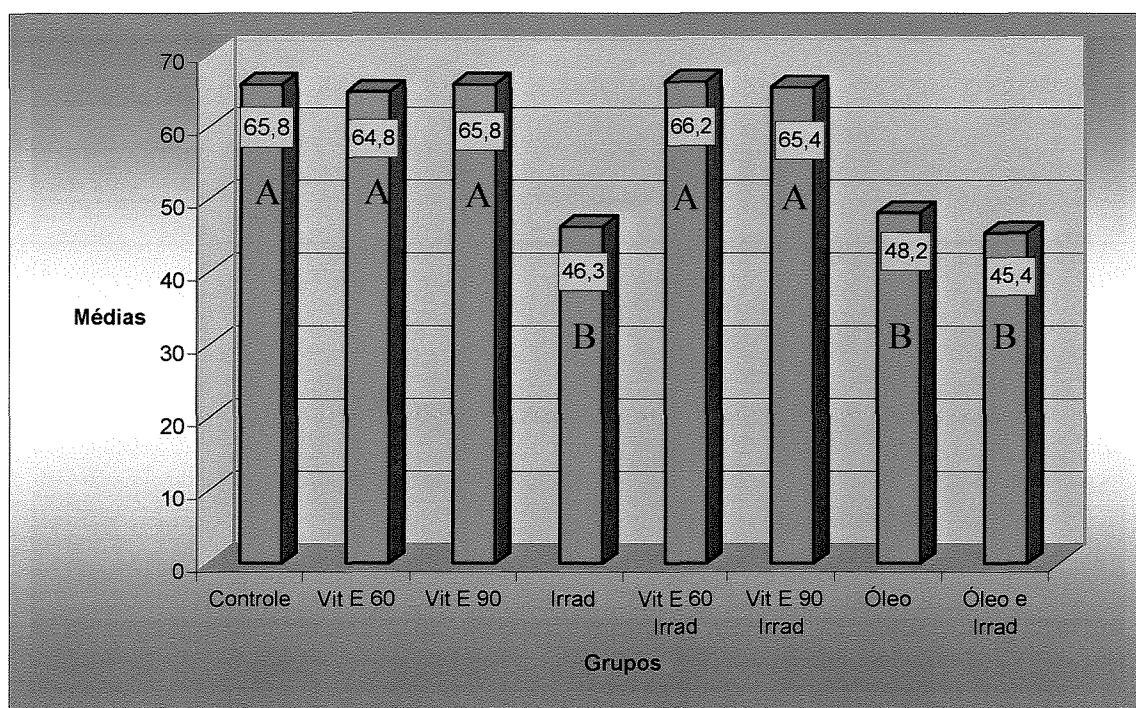
TABELA 3

Médias e desvios padrão das áreas birrefringentes (pixel²) no 7º dia
de reparação tecidual

Grupos	Médias		Desvios
			Padrão
VE60IR - Ferida+Vit(60UI)+IRad	66.2	A	1.40
VE90- Ferida+Vit.(90UI)	65.8	A	1.88
C- Ferida	65.8	A	1.40
VE90IR- Ferida+Vit(90UI)+IRad	65.4	A	1.32
VE60- Ferida+Vit.(60UI)	64.8	A	1.32
OOL- Ferida+Óleo	48.2	B	2.27
IR- Ferida+Irradiação	46.3	B	1.48
OOLIR- Ferida+Óleo+IRad.	45.4	B	1.90

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

Gráfico das médias do numero de fibroblastos em função do grupo, no 4º dia de reparação tecidual.



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

FIGURA 34 – Gráfico das médias dos números de fibroblastos em função do grupo, no 7º dia de reparação tecidual.

Coloração por Hematoxilina-Eosina - 4º Dia

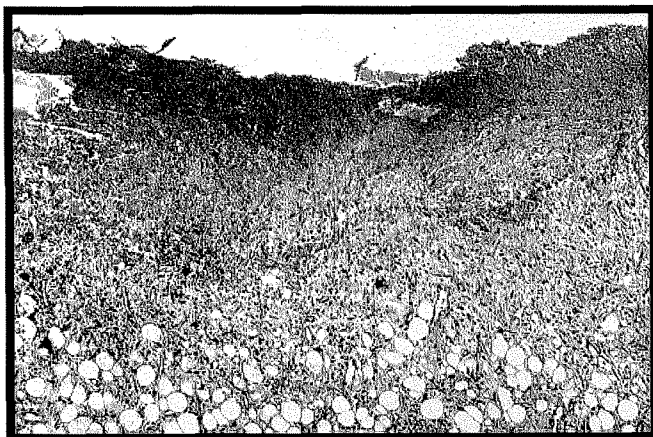


FIGURA 1- Grupo C - Ferida
Aumento original 6.3 x 1.25 x 10

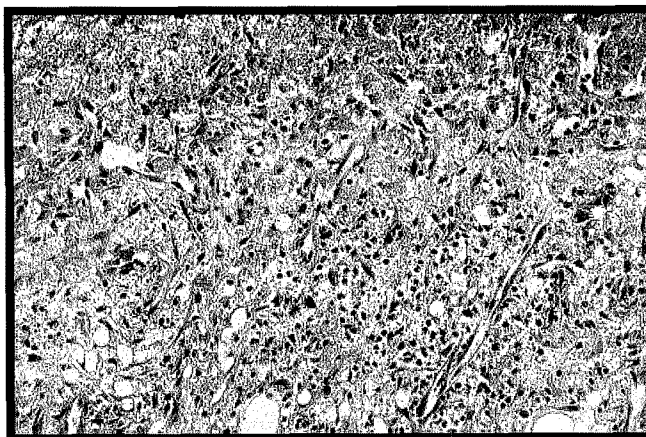


FIGURA 1a- Grupo C - Ferida
Aumento original 16 x 1.25 x 10

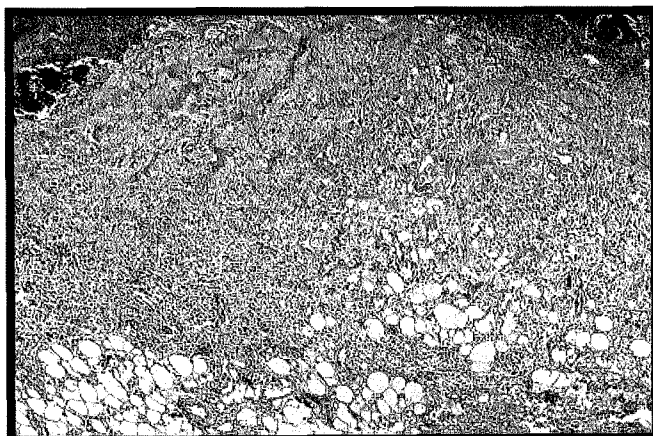


FIGURA 2- Grupo VE60 - Ferida + Vit. E (3-60UI)
Aumento original 6.3 x 1.25 x 10

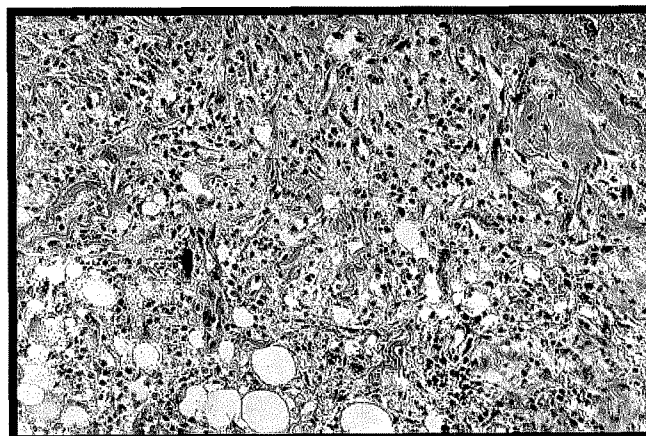


FIGURA 2a- Grupo VE60 - Ferida + Vit. E (3-60UI)
Aumento original 16 x 1.25 x 10

Coloração por Hematoxilina-Eosina - 4º Dia



FIGURA 3- Grupo VE90 – Ferida + Vit. E (3-90UI)
Aumento original 6.3 x 1.25 x 10



FIGURA 3a- Grupo VE90 – Ferida + Vit. E (3-90UI)
Aumento original 16 x 1.25 x 10



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

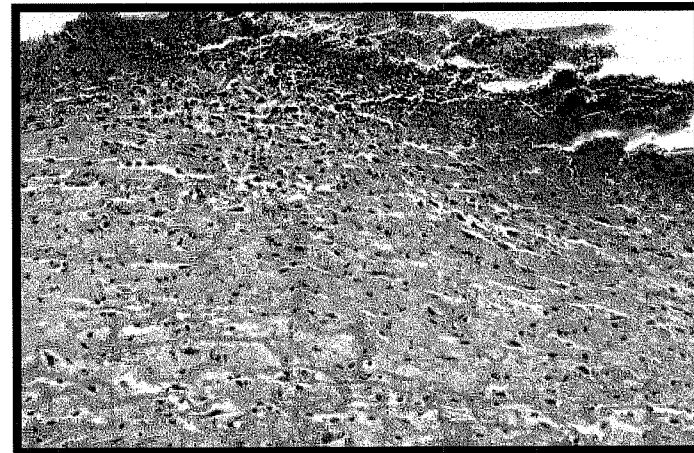


FIGURA 4a- Grupo IRR - Ferida + Irradiação
Aumento original 16 x 1.25 x 10

Coloração por Hematoxilina-Eosina - 4º Dia



FIGURA 5- Grupo VE60IRR – Ferida + Vit. E (3-60UI) + Irrad.
Aumento original 6.3 x 1.25 x 10



FIGURA 5a- Grupo VE60IRR – Ferida + Vit. E (3-60UI) + Irrad.
Aumento original 16 x 1.25 x 10

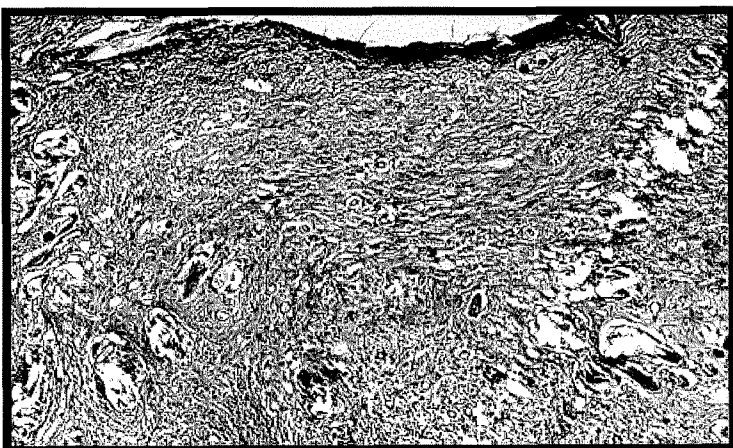


FIGURA 6- Grupo VE90IRR- Ferida + Vit. E (3-90UI) + Irrad.
Aumento original 6.3 x 1.25 x 10

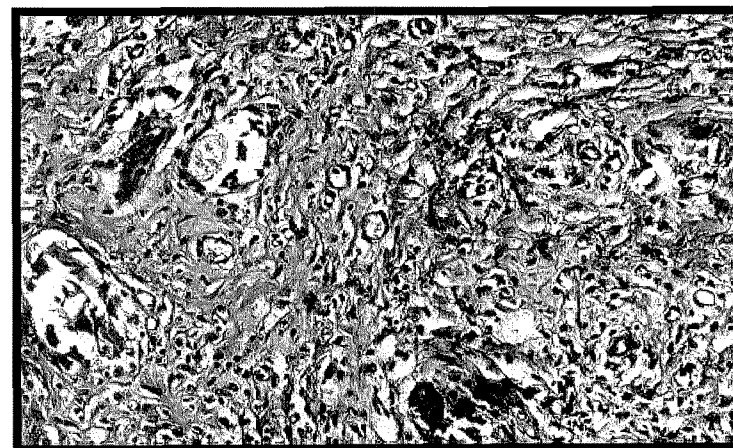


FIGURA 6a- Grupo VE90IRR- Ferida + Vit. E (3-90UI) + Irrad.
Aumento original 16 x 1.25 x 10

Coloração por Hematoxilina-Eosina - 4º Dia

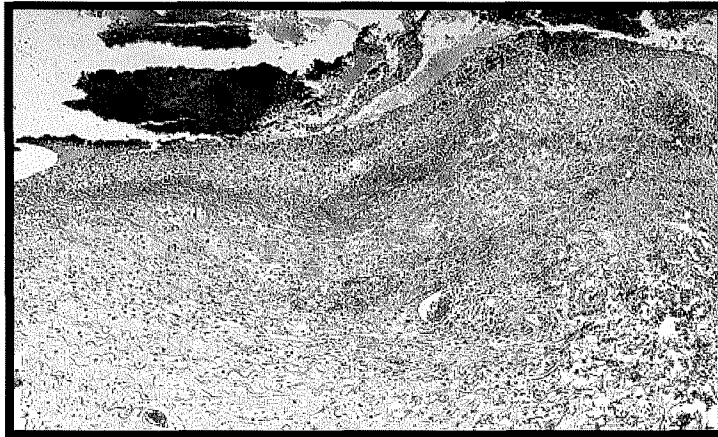


FIGURA 7- Grupo OOL – Ferida+ Óleo (3-1ml)
Aumento original 6.3 x 1.25 x 10

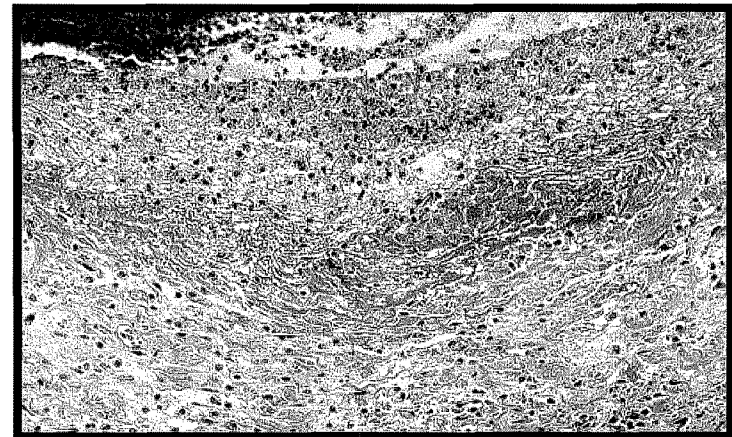


FIGURA 7a- Grupo OOL – Ferida + Óleo (3-1ml)
Aumento original 16 x 1.25 x 10

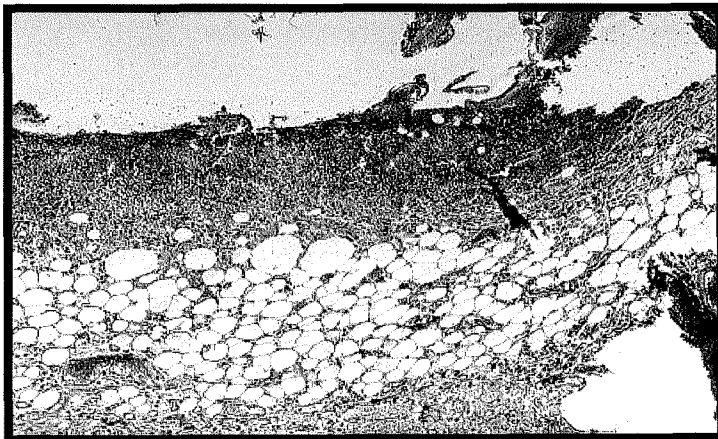


FIGURA 8- Grupo OOLIRR - Ferida + Óleo (3-1ml)+
Irrad.
Aumento original 6.3 x 1.25 x 10



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

Coloração por Hematoxilina-Eosina - 7º Dia

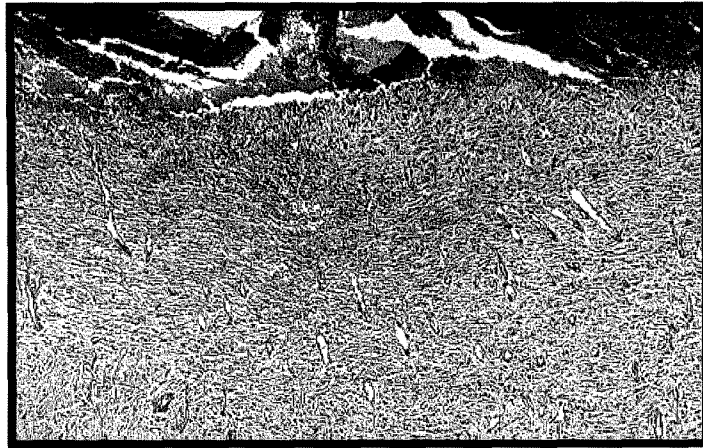


FIGURA 9- Grupo C - Ferida
Aumento original 6.3 x 1.25 x 10

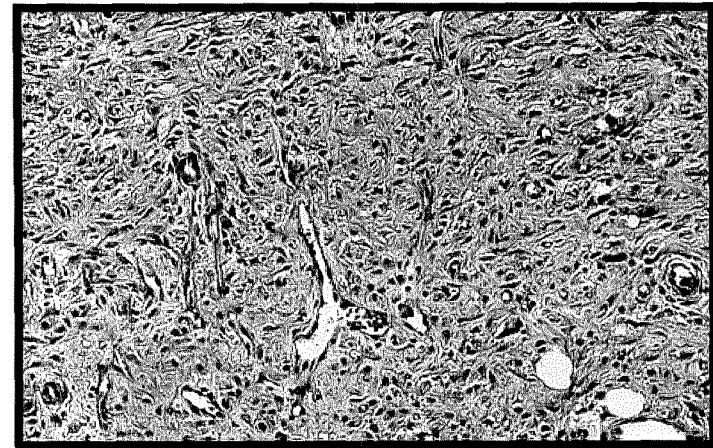


FIGURA 9a- Grupo C - Ferida
Aumento original 16 x 1.25 x 10

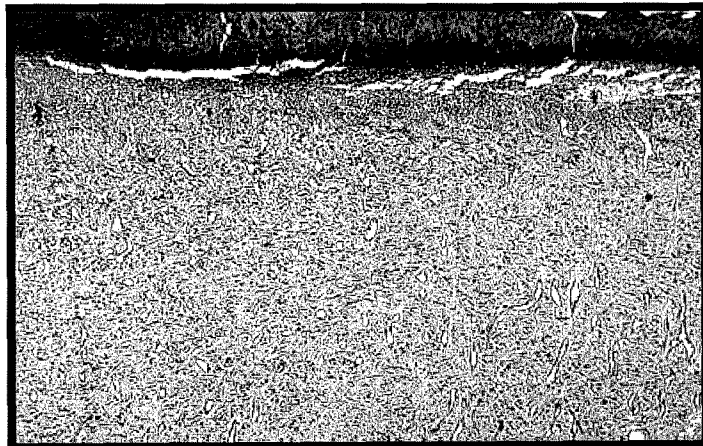


FIGURA 10- Grupo VE60 - Ferida + Vit. E (3-60UI)
Aumento original 6.3 x 1.25 x 10

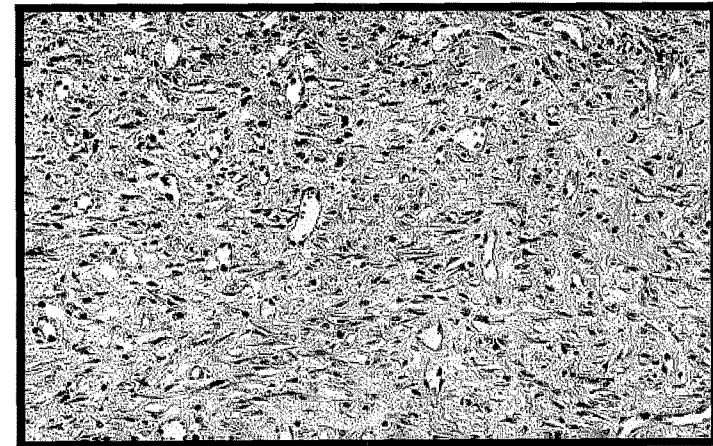


FIGURA 10a- Grupo VE60 - Ferida + Vit. E (3-60UI)
Aumento original 16 x 1.25 x 10

Coloração por Hematoxilina-Eosina - 7º Dia

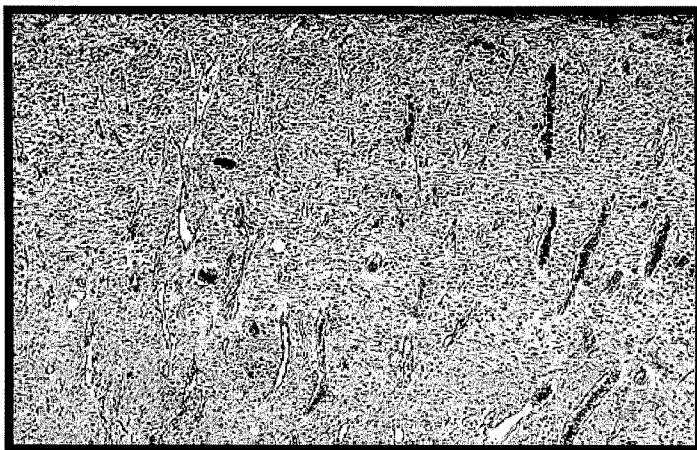


FIGURA 11- Grupo VE90 – Ferida + Vit. E (3-90UI)
Aumento original 6.3 x 1.25 x 10

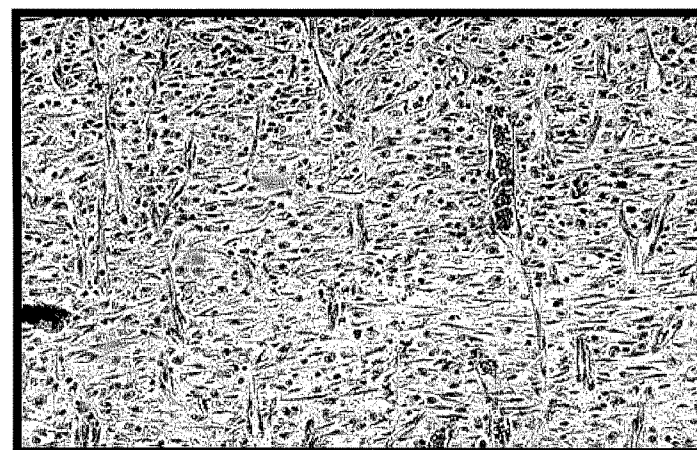


FIGURA 11a- Grupo VE90 – Ferida + Vit. E (3-90UI)
Aumento original 16 x 1.25 x 10

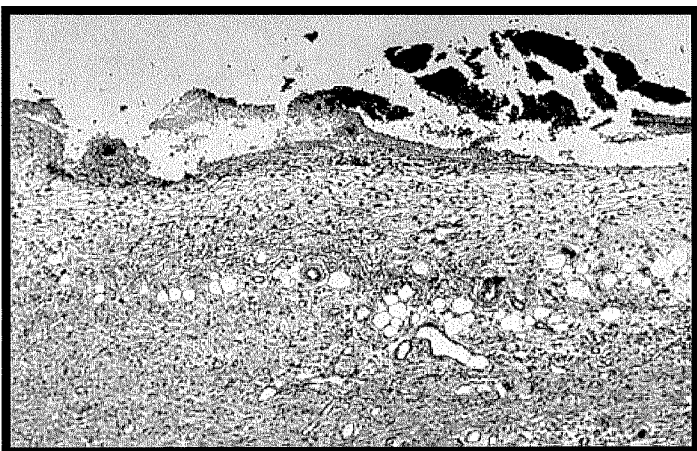


FIGURA 12- Grupo IRR - Ferida + Irradiação
Aumento original 6.3 x 1.25 x 10

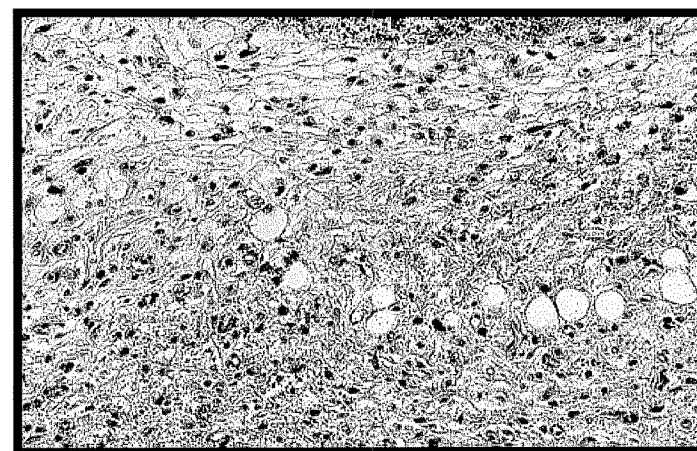


FIGURA 12a- Grupo IRR - Ferida + Irradiação
Aumento original 16 x 1.25 x 10

Coloração por Hematoxilina-Eosina - 7º Dia

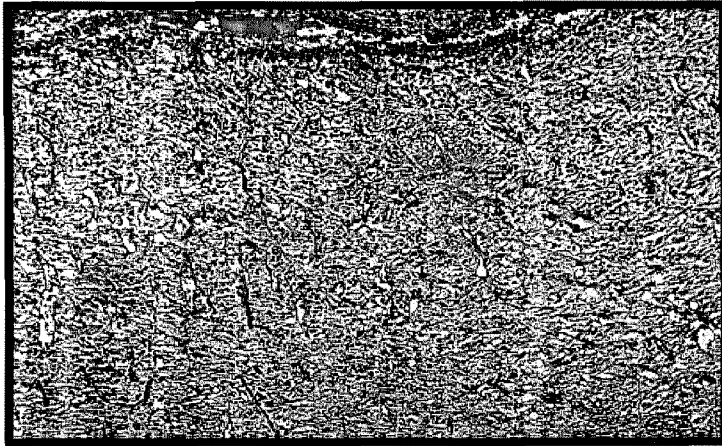


FIGURA 13- Grupo VE60IRR – Ferida + Vit. E (3-60UI) + Irrad.
Aumento original 6.3 x 1.25 x 10

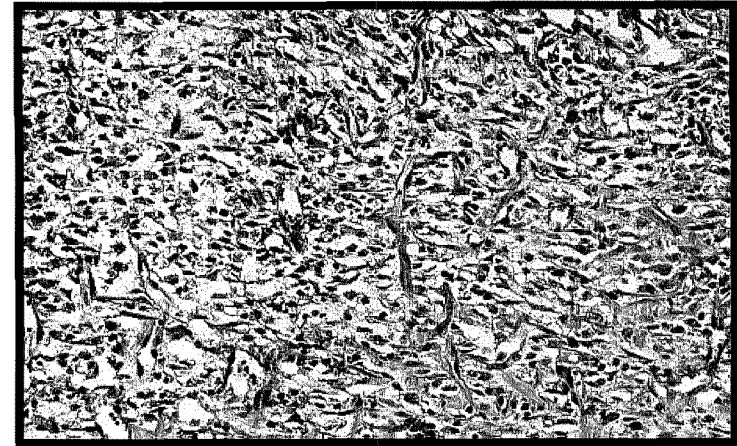


FIGURA 13a- Grupo VE60IRR – Ferida + Vit. E (3 -60UI) + Irrad.
Aumento original 16 x 1.25 x 10

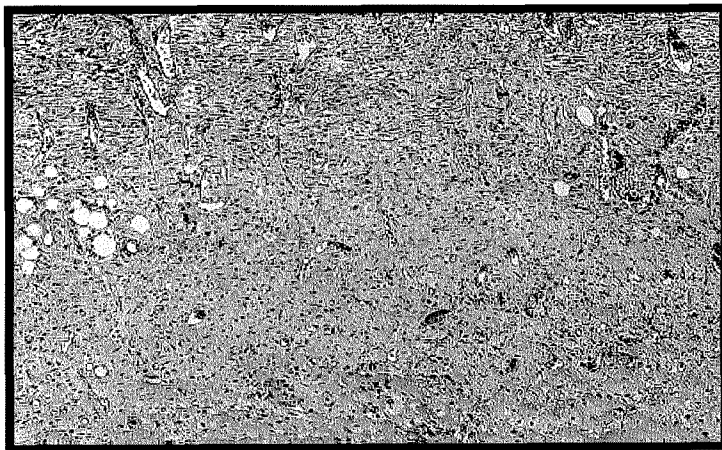


FIGURA 14- Grupo VE90IRR - Ferida + Vit. E (3-90UI) + Irrad.
Aumento original 6.3 x 1.25 x 10

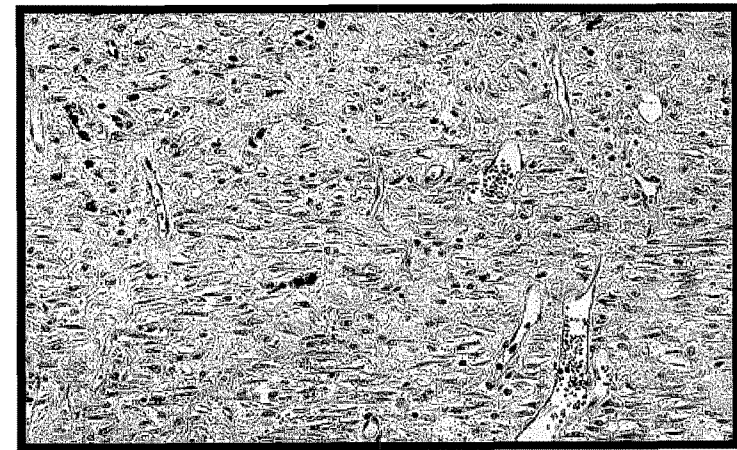


FIGURA 14a- Grupo VE90IRR - Ferida + Vit. E (3-90UI) + Irrad.
Aumento original 16 x 1.25 x 10

Coloração por Hematoxilina-Eosina - 7º Dia

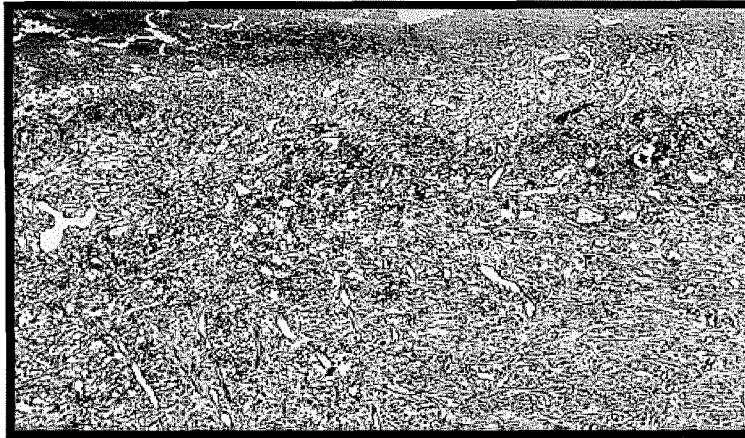


FIGURA 15- Grupo OOL – Ferida+ Óleo (3-1ml)
Aumento original 6.3 x 1.25 x 10

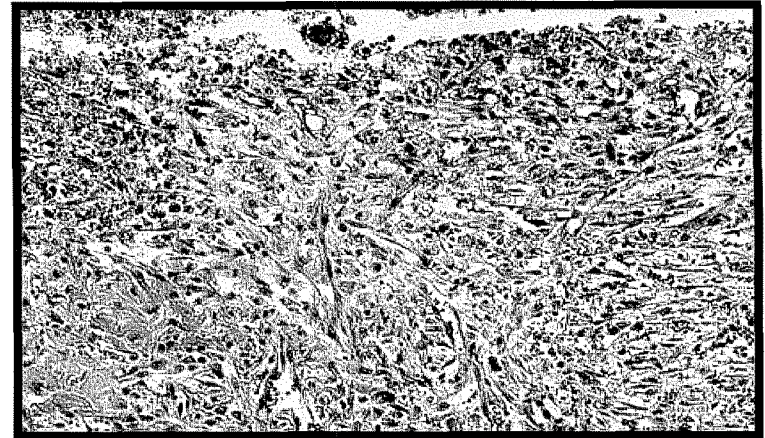


FIGURA 15a- Grupo OOL – Ferida + Óleo (3-1ml)
Aumento original 16 x 1.25 x 10

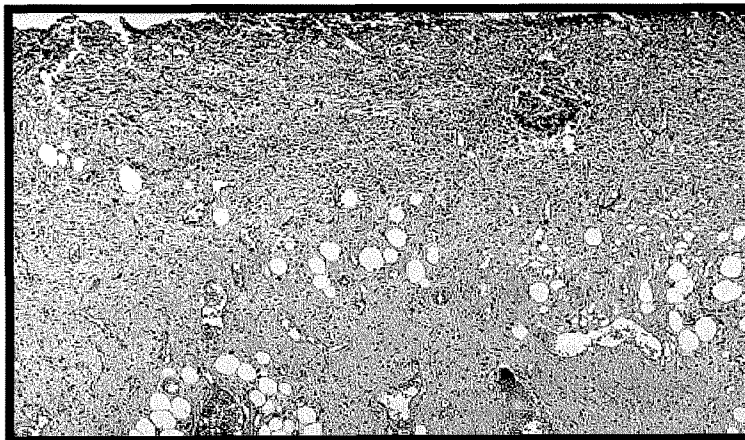


FIGURA 16- Grupo OOLIRR - Ferida + Óleo (3-1ml) + Irrad.
Aumento original 6.3 x 1.25 x 10



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

Coloração por Hematoxilina-Eosina - 14º Dia



FIGURA 17- Grupo C - Ferida

Aumento original 6.3 x 1.25 x 10



FIGURA 17a- Grupo C - Ferida

Aumento original 16 x 1.25 x 10



FIGURA 18- Grupo VE60 - Ferida + Vit. E (3-60UI)

Aumento original 6.3 x 1.25 x 10



FIGURA 18a- Grupo VE60 - Ferida + Vit. E (3-60UI)

Aumento original 16 x 1.25 x 10

Coloração por Hematoxilina-Eosina - 14º Dia



FIGURA 19- Grupo VE90 – Ferida + Vit. E (3-90UI)
Aumento original 6.3 x 1.25 x 10

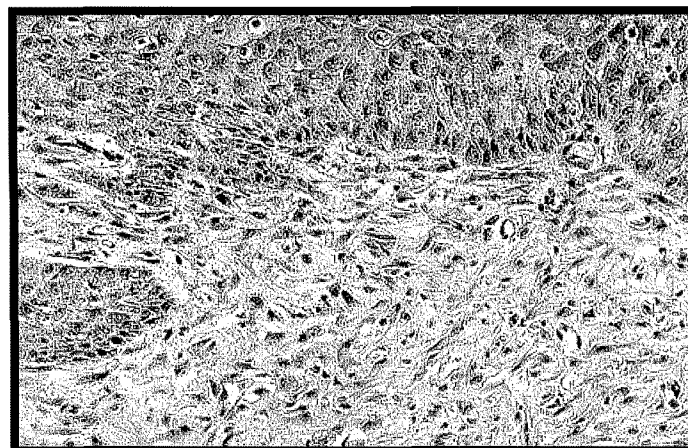


FIGURA 19a- Grupo VE90 – Ferida + Vit. E (3-90UI)
Aumento original 16 x 1.25 x 10



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

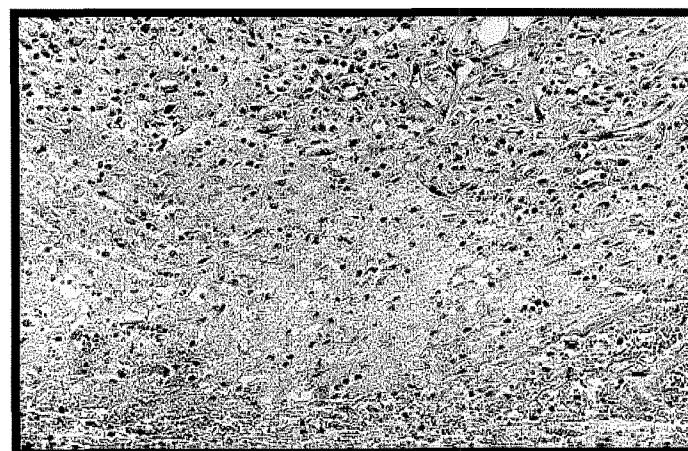


FIGURA 20a- Grupo IRR - Ferida + Irradiação
Aumento original 16 x 1.25 x 10

Coloração por Hematoxilina-Eosina - 14º Dia



FIGURA 21- Grupo VE60IRR – Ferida + Vit. E (3-60UI) + Irrad.
Aumento original 6.3 x 1.25 x 10

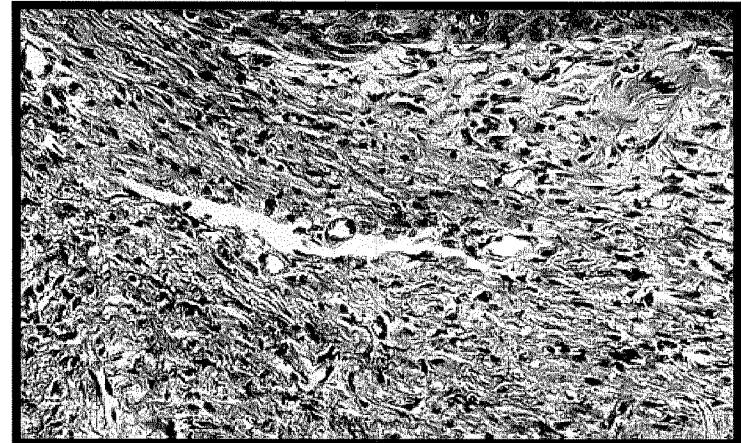


FIGURA 21a- Grupo VE60IRR – Ferida + Vit. E (3-60UI) + Irrad.
Aumento original 16 x 1.25 x 10

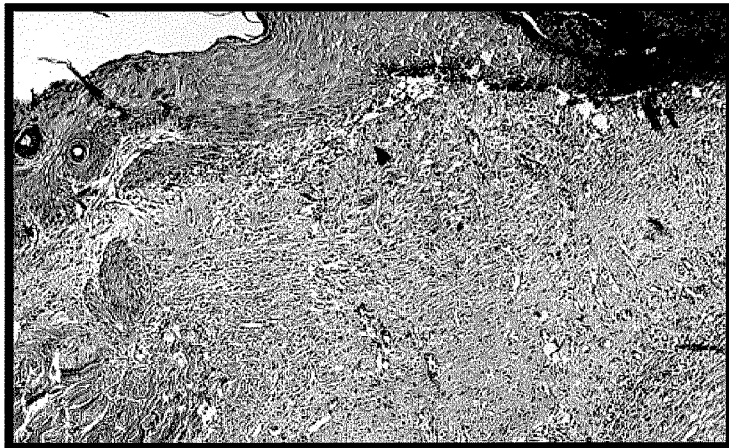


FIGURA 22- Grupo VE90IRR - Ferida + Vit. E (3-90UI) + Irrad.
Aumento original 6.3 x 1.25 x 10

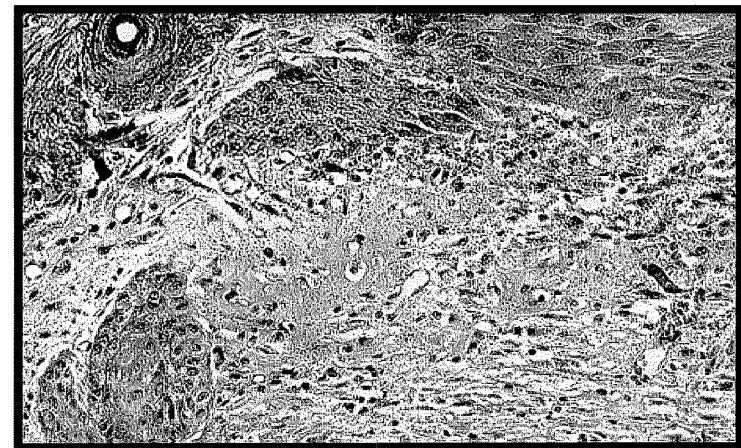


FIGURA 22a- Grupo VE90IRR - Ferida + Vit. E (3-90UI) + Irrad.
Aumento original 16 x 1.25 x 10

Coloração por Hematoxilina-Eosina - 14º Dia



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



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

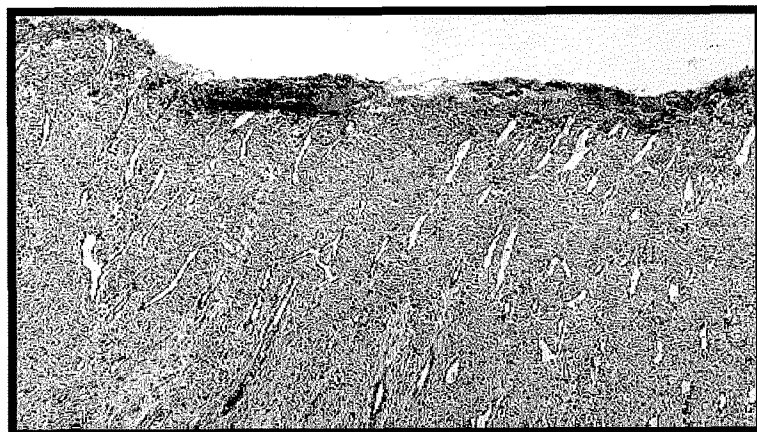


FIGURA 24- Grupo OOLIRR - Ferida + Óleo (3-1ml) + Irrad.
Aumento original 6.3 x 1.25 x 10



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

Coloração por Hematoxilina-Eosina - 21º Dia



FIGURA 25- Grupo C - Ferida
Aumento original 6.3 x 1.25 x 10

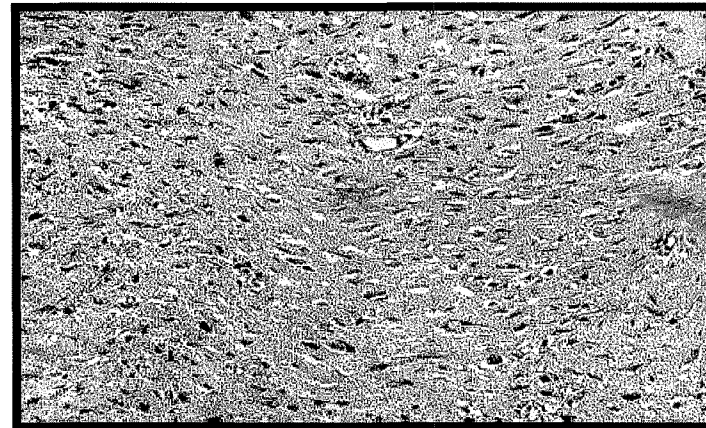


FIGURA 25a- Grupo C - Ferida
Aumento original 16 x 1.25 x 10



FIGURA 26- Grupo VE60 - Ferida + Vit. E (3-60UI)
Aumento original 6.3 x 1.25 x 10

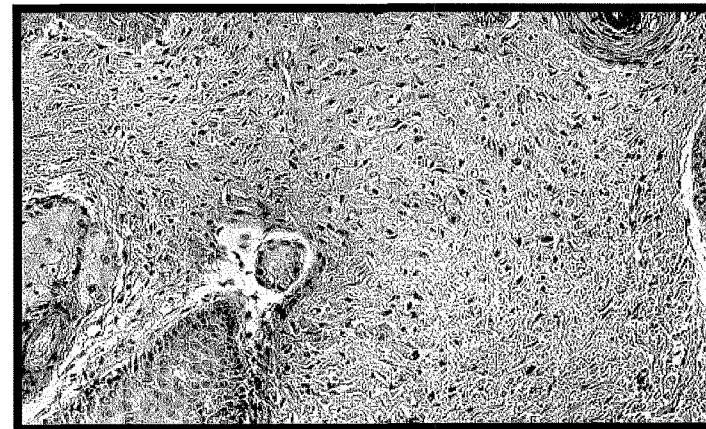


FIGURA 26a- Grupo VE60 - Ferida + Vit. E (3-60UI)
Aumento original 16 x 1.25 x 10

Coloração por Hematoxilina-Eosina - 21º Dia

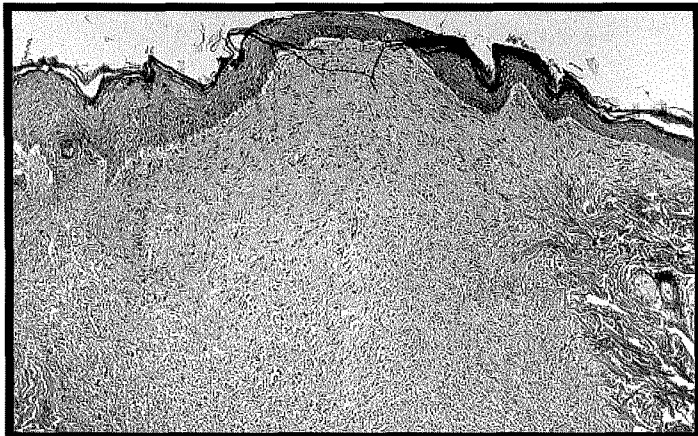


FIGURA 27- Grupo VE90 – Ferida + Vit. E (3-90UI)

Aumento original 6.3 x 1.25 x 10

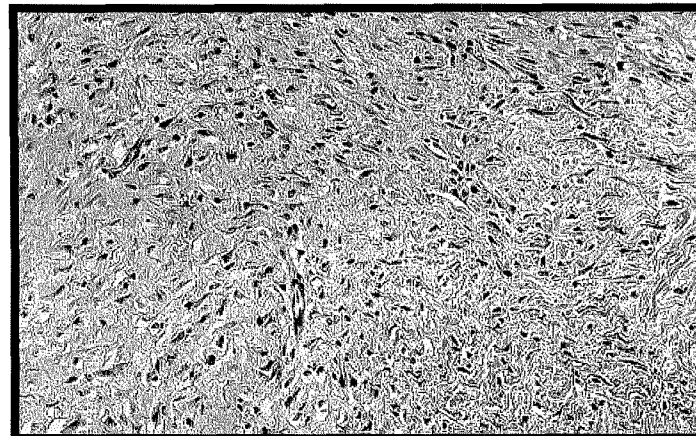


FIGURA 27a- Grupo VE90 – Ferida + Vit. E (3-90UI)

Aumento original 16 x 1.25 x 10



FIGURA 28- Grupo IRR - Ferida + Irradiação

Aumento original 6.3 x 1.25 x 10

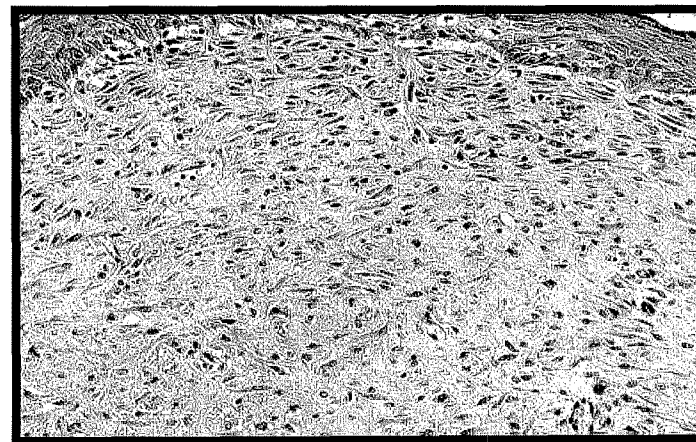


FIGURA 28a- Grupo IRR - Ferida + Irradiação

Aumento original 16 x 1.25 x 10

Coloração por Hematoxilina-Eosina - 21º Dia

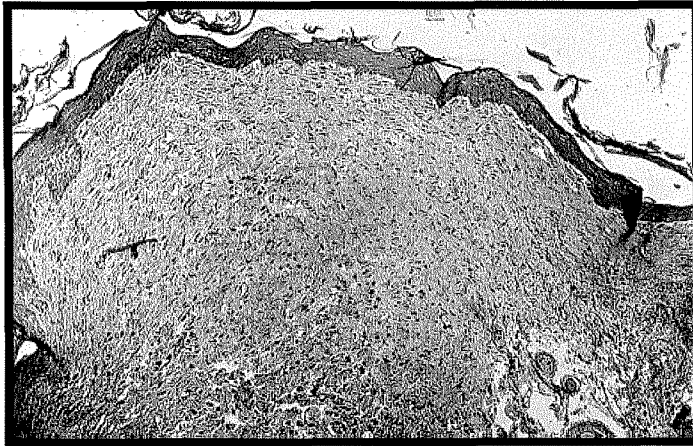


FIGURA 29- Grupo VE60IRR – Ferida + Vit. E (3-60UI) + Irrad.
Aumento original 6.3 x 1.25 x 10

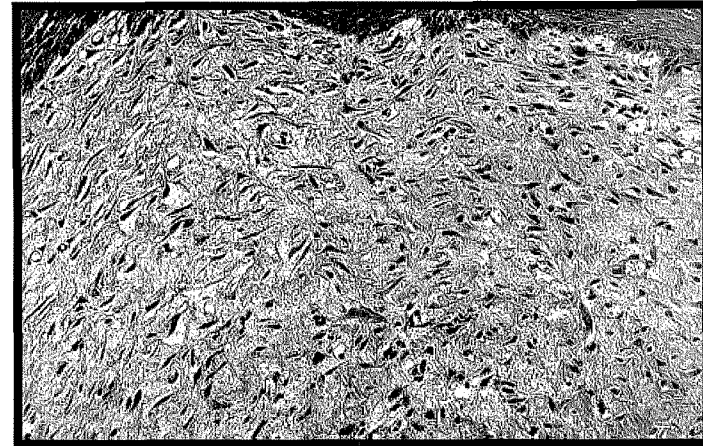


FIGURA 29a- Grupo VE60IRR – Ferida + Vit. E (3-60UI) + Irrad.
Aumento original 16 x 1.25 x 10



FIGURA 30- Grupo VE90IRR - Ferida + Vit. E (3-90UI) + Irrad.
Aumento original 6.3 x 1.25 x 10

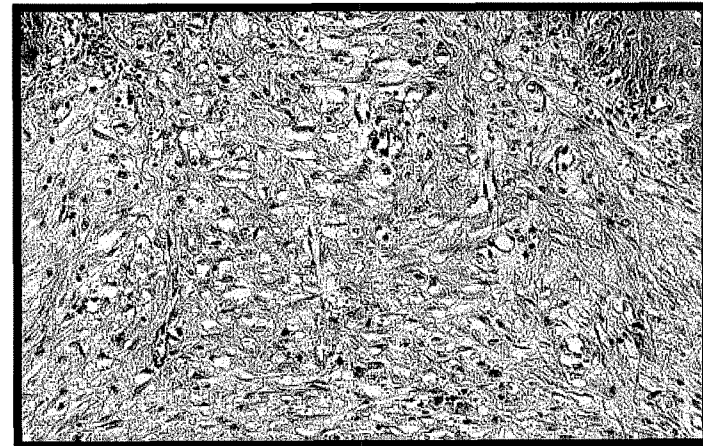


FIGURA 30a- Grupo VE90IRR - Ferida + Vit. E (3-90UI) + Irrad.
Aumento original 16 x 1.25 x 10

Coloração por Hematoxilina-Eosina - 21º Dia



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

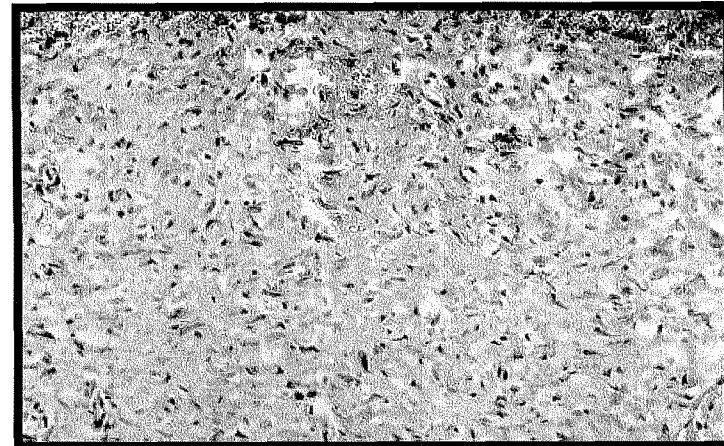


FIGURA 31a- Grupo OOL – Ferida + Óleo (3-1ml)
Aumento original 16 x 1.25 x 10



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

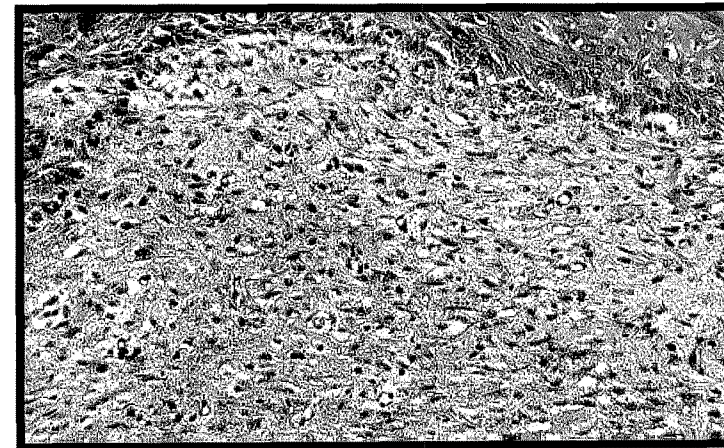


FIGURA 32a- Grupo OOLIRR - Ferida + Óleo (3-1ml) + Irrad.
Aumento original 16 x 1.25 x 10

6- Discussão

A reparação tecidual é resultado de uma seqüência de eventos fisiológicos que pode ser dividida em três fases: a inflamatória, a proliferativa e a de maturação. Estes eventos promovem uma série de fenômenos exsudativo-vasculares, tentando restabelecer a normalidade do tecido pelo aumento da permeabilidade vascular, vasodilatação, remoção de resíduos celulares, diapedese de elementos celulares (como macrófagos, linfócitos e plaquetas), que agem tanto liberando mediadores químicos (fatores intrínsecos) quanto na ação fagocitária e reorganização da rede de colágeno pelos fibroblastos.

Em relação às células que participam do processo de reparação, na fase de inflamação, observa-se a presença de neutrófilos polimorfonucleares, monócitos e linfócitos que apresentam função de limpeza da região da ferida e remoção de corpos estranhos e partículas patogênicas. Após este período, tem-se o início da formação do tecido de granulação (fase proliferativa), onde se observa predominância de fibroblastos e angioblastos, estes últimos formadores do grande número de vasos sanguíneos que caracterizam este tecido. E finalmente, na fase de maturação, verifica-se diminuição celular e aumento de feixes de fibras colágenas orientados, formando então a cicatriz.

Esse complexo processo que ocorre para reparar um dano tecidual pode sofrer alterações. Existem condições que contribuem para evolução de forma

mais rápida e condições que podem interferir nesse processo, podendo-se exemplificar como fator interno, do próprio organismo, a diabetes e como fator externo, a radiação ionizante. Nesta pesquisa, foi utilizada a irradiação ionizante como fator extrínseco, visto que muitas pesquisas (Pohle *et al.*(1931), Stein *et al.*(1957), Dotto *et al.*(1970), Moore (1984), Rudolph *et al.*(1988), Abdalla *et al.* (1991), Bernstein *et al.*(1993), Wang *et al.*(1994), Almeida (1997), Monteiro (1999) e Manzi *et al.* (2003)) demonstraram que a radiação promove um retardo neste processo.

O tecido de reparo correspondente às feridas produzidas na pele de ratos foi o tecido de escolha para ser submetido à radiação ionizante nesta pesquisa, pois Grillo (1963) afirma que os fibroblastos presentes no processo de reparação teciduais têm sua origem principalmente do tecido conjuntivo das bordas da lesão. Assim, injúrias nesta região terão efeito deletérios maior na reparação tecidual. Nos grupos de animais que tiveram as bordas das feridas irradiadas, foi administrada uma dose de radiação de elétrons de 6 Gy, 3 dias após a realização da ferida, visto que Abdalla *et al.* (1991), Almeida (1997) e Monteiro (1999) observaram que houve retardo maior no processo de reparação nos animais que foram submetidos a irradiação 3 dias após a produção da ferida comparado com a reparação dos animais que foram submetidos a irradiação imediatamente após à cirurgia.

No grupo que sofreu irradiação (IR), os mesmos aspectos da seqüência da reparação tecidual foram observados, notando-se mais evidentes os

fenômenos de necrose tecidual e exsudativo-vasculares no 4º dia do processo de reparo, observados também por Abdalla *et al* (1991), Almeida (1997), Monteiro (1999) e Manzi *et al.* (2003). Pode-se ainda observar que no 7º dia de reparação tecidual, o grupo controle já mostrava disposição ordenada de vasos neo formados, fato anteriormente relatado por Vizioli (1971). No grupo irradiado, observou-se um retardo na organização tecidual, sendo esse resultado, em parte, coincidente com o trabalho de Dotto *et al*, (1970), que observaram também menor proliferação tecidual para os dias iniciais de formação do tecido de granulação.

O retardo no processo de reparação permaneceu até os últimos tempos estudados; entretanto, a radiação de elétrons interferiu retardando mas não impedindo esse processo, fato observado também nos trabalhos de Abdalla *et al.* (1991), Almeida (1997), Monteiro (1999) e Manzi (2003). Já Wang *et al* (1994), relataram para a radiação de elétrons, com dose de 9,6 Gy, um retardo na reparação tecidual até o 7º dia, sendo esta restabelecida no 14º dia. Neste trabalho, o retardo deste processo permaneceu até o 21º dia de observação. Esta diferença pode ser devida ao fato que, no trabalho de Wang *et al.* (1994), a irradiação foi realizada 7 dias antes do procedimento cirúrgico, no pré operatório, sendo que só as células inativas foram irradiadas. Neste trabalho, o período em que ocorreu a irradiação correspondeu à fase proliferativa da inflamação. Foi observado no trabalho de Monteiro (1999) um atraso transitório no processo de reparação tecidual, que pode ser explicado pelo fato que a autora irradiou a ferida cirúrgica e protegeu as bordas..Isso deve ter provocado danos nos fibroblastos

que iniciam o processo de cura e reparo das feridas. Assim, uma injúria direta a estas células acarretará atraso no processo de reparação tecidual, como afirmaram Bernstein *et al.* (1993) e Drake & Scott (1995).

A célula de maior participação no processo de reparação tecidual é o fibroblasto, devido à sua função de produzir fibras e matriz extracelular. O processo de reparação tecidual é concluído quando o colágeno produzido atinge sua maturação, restabelecendo a integridade da área lesada. Portanto, observar-se a população de fibroblastos constitui um parâmetro para a avaliação da produção de colágeno e assim, do processo de reparação tecidual. No grupo que sofreu apenas a irradiação (IR) notou-se que a proliferação dos fibroblastos foi significativamente menor que no grupo controle (C), tanto no 4º quanto no 7º dia de reparação. Portanto, o efeito da radiação ionizante prejudicando a reparação tecidual pode estar relacionada com a diminuição do número de fibroblastos presentes.

Segundo Grillo (1963) e Rudolph *et al* (1988), os fibroblastos presentes na reparação tecidual originam-se do tecido conjuntivo adjacente à lesão e não da corrente sanguínea, como os macrófagos. Neste trabalho e em outros (Abdalla *et al*, 1991; Almeida, 1997 e Manzi *et al*, 2003), a irradiação foi realizada nas bordas da ferida, podendo-se afirmar que as células precursoras ou fibroblastos ativos sofreram a ação direta da radiação de elétrons, sugerindo que o atraso observado na reparação tecidual do grupo irradiado pode ser também

decorrente de danos nos fibroblastos. Isso resultaria em menor quantidade de colágeno, levando ao atraso a maturação do mesmo, o que está de acordo com o trabalho de Drake & Scott (1995), que afirmam serem permanentes os danos que ocorrem nos fibroblastos.

Quando comparado o grupo controle (**C**) aos grupos que tiveram apenas o tratamento prévio de vitamina E (**VE60** e **VE90**), observou-se que estes, na análise das lâminas coradas por Hematoxilina-Eosina, apresentaram-se mais adiantados e organizados. Porém, na avaliação quantitativa da quantidade de fibroblastos, não houve diferenças estatísticas entre os grupos com diferentes doses da vitamina, e estes com o grupo controle (**C**). Estes resultados sugerem que a vitamina E favorece de alguma maneira o processo de reparação tecidual, exceto pelo aumento do número de fibroblastos. Talvez esta ajuda seja devida à propriedade antioxidante da vitamina E, característica mais importante dos tocoferóis, a qual impede a oxidação de constituintes essenciais dos tecidos, como a ubiquinona (coenzima Q), ou impede a formação de produtos tóxicos da oxidação, como os produtos da peroxidação formados a partir de ácidos graxos insaturados, ou seja, os radicais livres (Marcus & Coulston (1996)).

Abordando o efeito radioprotetor da vitamina E pelos grupos **VE60IR** e **VE90IR**, observou-se que, na análise das lâminas coradas por hematoxilina-eosina, não houve diferença na morfologia dos tecidos do grupo controle (**C**) em todos os períodos analisados (4º, 7º, 14º e 21º dia de reparação tecidual). Estes resultados também foram observados na análise quantitativa do número de

fibroblastos nos períodos estudados (4º e 7º dia). Assim, pode-se afirmar que a vitamina E, na forma dl-alfa-tocoferil, teve um efeito radioprotetor no processo de reparação tecidual, por apresentar resultados semelhantes ao grupo controle e melhores que o grupo **IR**.

Neste trabalho, foi avaliado o efeito radioprotetor da vitamina E em duas doses, de 60 U.I.e 90 U.I., pois observou-se na literatura relacionada que não havia uma padronização das dosagens de vitamina E entre os autores, sendo então melhor utilizar-se duas dosagens para verificar possíveis diferenças entre elas. Foi observado, tanto de maneira qualitativa como quantitativa, que não houve diferença entre os grupos com associação da irradiação com o pré tratamento de vitamina E nas duas dosagens, sugerindo que é necessário apenas uma certa quantidade para que a vitamina E promova seu efeito radioprotetor. O excesso de vitamina E não promoverá um efeito maior. Entretanto, Londer & Myers (1952), observaram que quanto maior a quantidade de vitamina E, menor a sua radioproteção. Isso pode ser decorrente do fato de que os autores utilizaram uma dose letal de radiação X no corpo todo do animal e talvez a vitamina E em excesso promova um efeito prejudicial ao organismo. Já no trabalho de Taren *et al.* (1986), observou-se que pequenas concentrações de vitamina E, nos grupos que receberam 3 doses de 10, 20 e 40 UI, não promovia a ação radioprotetora. Quando foram utilizadas 3 doses de 120 UI de vitamina E essa ação foi promovida. Esta diferença de resultados entre os trabalhos supra citados talvez seja devido à área irradiada e ao tipo de análise utilizado, uma vez que Londer &

Myers (1952) avaliaram a habilidade da vitamina E na proteção da morbidade de uma dose letal de radiação X e Taren *et al.* (1986) avaliaram a resistência à tensão das feridas cirúrgicas expostas à irradiação local.

Felemovicius *et al.* (1995) discutem em seu trabalho que os efeitos da radiação ionizante são mediados principalmente pelos radicais livres de oxigênio gerados pela interação com a molécula da água. Os radicais livres são moléculas de oxigênio contendo um elétron não pareado na última órbita da eletrosfera, o que lhes confere uma capacidade de induzir injúrias aos tecidos. Estas reações, que são altamente oxidantes, removem átomos de hidrogênio dos ácidos graxos, causando a peroxidação lipídica, resultando em mudanças na permeabilidade e fluidez das membranas celulares, levando-as à morte. Assim, o efeito radioprotetor da vitamina E deve-se, provavelmente, à sua ligação química com os radicais livres produzidos pela irradiação, uma vez que estes, ligados quimicamente com um antioxidante, não poderão promover tais ações danosas ao organismo. Essa hipótese da ação da vitamina E como radioprotetor é aceita e afirmada por muitos autores (Malick *et al.* (1978) Konings & Drijver (1979), Konings & Oosterloo (1980), Shiraishi *et al.* (1985) Rana *et al.* (1993), Simon *et al.* (1994), CarrOOL *et al.* (1995), Felemovicius *et al.* (1995), Nocentini *et al.* (2001, Kumar *et al.* (2002), Hantke *et al.* (2002), Manzi *et al.* (2003), Jones *et al.* (2003)) que estudaram a vitamina E e outros antioxidantes.

O tipo celular também deve ser levado em consideração, visto que os trabalhos de Kagerud *et al.* (1978) e de Sarria Prasad (1984), verificaram que a

vitamina E não promoveu efeito radioprotetor em células tumorais e sim um efeito deletério de maneira que houve aumento na inibição do crescimento das células tumorais pela radiação. Este fato é de grande importância para os pacientes que necessitam da radioterapia, uma vez que a vitamina E promove uma radioproteção em células normais e aumento dos efeitos danosos nas células do tumor. No mesmo trabalho de Sarria & Prasad (1984) observou-se que não houve modificações significativas no efeito da radiação sobre cultura de fibroblastos, resultado positivo considerando-se que houve aumento da mortalidade das células tumorais e não dos fibroblastos frente à radiação gama, que é considerada bastante ionizante. Esses autores sugerem que a ação da vitamina E talvez esteja associada com o aumento da resposta imune ou com o aumento da recuperação da medula óssea, além da ligação química do dl-alfa-tocoferil com os radicais livres.

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

Os resultados do presente trabalho também não concordam com os achados de El-Nahas *et al.* (1993), que observaram que a vitamina E não se mostrou efetiva na radioproteção nas aberrações cromossômicas e na atividade mitótica das células da medula óssea. Os autores também afirmaram que o óleo de oliva, o veículo da vitamina E, promove ação radioprotetora e esta ação é suprimida pela presença da vitamina E. No presente trabalho, por outro lado, o efeito do óleo de oliva e a associação deste óleo com a radiação de elétrons promoveram um atraso na reparação tecidual das feridas produzidas, tornando-se claro que o efeito radioprotetor no processo de reparação tecidual é dado pelo dl-alfa-tocoferil e não pelo óleo de oliva. Talvez esta diferença de resultado possa ser devida à via de administração da vitamina E e do óleo de oliva, pois no trabalho de El-Nahas *et al.* (1993) a administração foi feita por via oral e nesta pesquisa a via escolhida foi a intraperitoneal.

7- Conclusões

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

1- A vitamina E pela histomorfologia mostrou-se efetiva, como substância radioprotetora, possibilitando uma evolução satisfatória do tecido de reparo irradiado.

2- A média do número de fibroblastos dos tecidos de granulação dos animais tratados com vitamina E foi estatisticamente semelhante às médias dos animais do grupo controle e maior que as médias dos animais do grupo irradiado.

3- O óleo de oliva, utilizado como veículo da vitamina E, quando administrado isoladamente, produziu um retardo significativo na evolução do tecido de reparo, tanto no tecido irradiado quanto no tecido não irradiado.

8- Referências Bibliográficas

1. ABDALLA, C.M. *et al.* Estudo histológico da gênese e evolução do tecido de granulação sob efeito de baixas doses de radiação X. **Rev Fac Odont São Paulo**, São Paulo, v.5, n.2, p.90-95, Jul./Dec. 1991.
2. AITASALO K. *et al.* Healing of microvascular free skin flaps in irradiated recipient tissue beds. **Am J Surg**, New York, v.164, n.6, p.662-666, Dec. 1992.
3. ALMEIDA, S.M. **Efeito da radiação de elétrons na reparação tecidual**. Piracicaba, 1997. 103p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas.
4. BERNSTEIN, E.F. *et al.* Biology of chronic radiation effect on tissue and wound healing. **Clin Plast Surg**, Philadelphia, v.20, n.3, p.435-453, July 1993.
5. CARROOL, M.P. *et al.* Efficacy of radioprotective agents in preventing small and large bowel radiation injury. **Dis Colon Rectum**, Philadelphia, v.38, n.7, p.716-722, July 1995
6. DOTTO, C.A. *et al.* Quantitative study of vascular response in irradiated wounds. **Surg Gynecol Obstet**, Chicago, v.130, n.5, p.875-878, May 1970.
7. DRAKE, B.D., SCOTT, N.O. Wound healing considerations in chemotherapy and radiation therapy. **Clin Plast Surg**, Philadelphia, v.22, n.1, p.31-37, Jan. 1995.

8. EL-NAHAS, S.M. *et al.* Radioprotective effect of vitamins C and E. **Mutat Res**, Amsterdam, v.301, n.2, p.143-147, Feb. 1993.

9. EVANS, H.M., BISHOP, K.S. On the relationship between fertility and nutrition. II. The ovulation rhythm in the rat on inadequate nutritional regimes. **J Metab Res**, Morristown, v.1, p.319-356, 1922

10. EVANS, H.M. *et al.* The isolation from wheat germ oil of an alcohol alpha-tocopherol, having properties of vitamin E. **J Biol Chem**, Bethesda, v.113, p.329-332, 1936.

11. FELEMOVICIUS, I. *et al.* Intestinal radioprotection by vitamin E (alpha-tocopherol) **Ann Surg**, Philadelphia, v.222, n.4, p.504-510, Oct. 1995.

12. GALLIGAN, E.S. *et al.* An investigation of the radioprotective effect of dietary antioxidants on isolated murine lymphocytes. **Biochem Soc Trans**, London, v.25, n.1, p.136, Feb. 1997

13. GRILLO, H.C. Origin of fibroblasts in wound healing: an autoradiographic study of inhibition of cellular proliferation by local x-irradiation. **Ann Surg**, Philadelphia, v.157, n.3, p.453-467, Mar. 1963.

14. GUIDUGLI NETO, J. The effect of Roentgen radiation on the capillary sprouts and superficial loops of granulation tissue I. Quantitative study of the vascular volume. **Rev Fac Odontol Univ Sao Paulo**, São Paulo, v.1, n.4, p.6-8, out./dez. 1987.

15. HANTEKER, B., LAHMANN C., VENZKE, K., FISCHER, T., KOCOUREK, A., WINDSOR, L.J., BERGEMANN, J., STAB, F., TSCHESCHE, H. Influence of flavonoids and vitamins on the MMP- and TIMP-expression of human dermal fibroblasts after UVA irradiation. **Photochem Photobiol Sci.** New York , v.1, n.10, p. 826-833, 2002.
16. HOFFER, A., ROY, M.R. Vitamin E decreases erythrocyte fragility after whole-body irradiation. **Radiat Res**, New York, v.61, n.3, p.439-443, Mar. 1975.
17. JONES, P. *et al.* Morphometric analysis of MRC-5 fibroblast like cells exposed to intermittent UV radiation. **Biomed Sci Instrum**, New York, v.39, p.415-420, 2003.
18. KAGERUD, A. *et al.* Tocopherol and local x-ray irradiation of two transplantable rat tumors. **Cancer Lett**, Limerick, v.5, n.3, p.123-129, Sept. 1978
19. KONINGS, A.W.T., DRIJVER, E.B. Radiation effects on membranes. I. Vitamin E deficiency and lipid peroxidation. **Radiat Res**, New York, v.80, n.3, p.494-501, Dec. 1979.
20. KONINGS, A.W., OOSTERLOO, S.K. Radiation effect on membranes. II. A comparison of the effects of X irradiation and ozone exposure with respect to the relation of antioxidant concentration and capacity for lipid peroxidation. **Radiat Res**, New York, v.81, n.2, p.200-207, Feb. 1980.
21. KONOPACKA, M. *et al.* Modifying effect of vitamins C, E and beta-carotene against gamma-ray-induced DNA damage in mouse cells. **Mutat Res**, Amsterdam, v.417, n.2/3, p.85-94, Sept. 1998.

- 22 KUMAR B., JHA, M.N., COLE, W.C., BEDFORD, J.S. D-alpha-tocopheryl succinate (vitamin E) enhances radiation-induced chromosomal damage levels in human cancer cells, but reduces it in normal cells. **Am Coll Nutr**, New York, v.21, n.4, p.:339-43, 2002.
- 23 LONDER, H.N., MYERS, C.E. Radioprotective effect of vitamin E. **Am J Clin Nutr**, New York, v.31, n.4, p.705, 1952
- 24 MAC DONALD, R.A. Origin of fibroblasts in experimental healing wounds: autoradiographic studies using tritiated thymidine. **Surgery**, Saint Louis, v.46, n.2, p.376-382, Aug. 1959.
- 25 MALICK, R.M. *et al.* Effect of vitamin E on post irradiation death in mice. **Experientia**, Basel, v.34, n.9, p.1216-1217, Sep 1978
- 26 MANZI, F.R. Estudo morfológico do efeito radioprotetor da vitamina E (dl-alfa-tocoferil) na reparação tecidual em ratos. **Radiol Bras** v.36 n.6 São Paulo nov./dez. 2003.
- 27 MARCUS, R. & COULSTON, A.M. Vitaminas lipossolúveis: vitaminas A, K, e E. *In*: GOODMAN, L.S., GILMAN, A.G. **As bases farmacológicas da terapêutica**, 9.ed., Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 1996. Cap.63, p.1165-1178.
- 28 MONTEIRO, S.A.C. **Efeito da Irradiação por elétrons em feridas e em tecido de granulação**. Piracicaba, 1999. 99p. Tese (Doutorado) - Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas.
- 29 MOORE, M.J. The effect of radiation on connective tissue. **Otolaryngol Clin North Am**, Philadelphia, v.17, n.2, p.389-398, May 1984.

- 30 NOCENTINI, S. *et al.* Exacerbating effect of vitamin E supplementation on DNA damage induced in cultured human normal fibroblasts by UVA radiation. **Photochem Photobiol** v.73, n.4, p.370-377, Apr 2001.
- 31 POHLE, E.A., RITCHIE, G., Wright, .W. Studies of the effect of Roentgen Rays on Healing of Wounds. III. Histological changes in skin wounds in rats following postoperative irradiation with very small and moderate doses. **Radiology**, Easton, v.52, p.707-713, May 1931.
- 32 RANA, K. *et al.* Radioprotection of chick thymus by vitamin E. **Indian J Exp Biol**, New Delhi, v.31, n.10, p.847-849, Oct 1993
- 33 ROSTOCK, R.A. *et al.* Evaluation of high-dose vitamin E as a radioprotective agent. **Radiology**, Easton, v.136, n.3, p.763-765, Sept. 1980
- 34 RUDOLPH, R. *et al.* Slowed growth of cultured fibroblasts from human radiation wounds. **Plast Reconstr Surg**, Baltimore, v.82, n.4, p.669-675, Oct. 1988.
- 35 SARRIA, A., PRASAD, K.N. DI-alpha-tocopheryl succinate enhances the effect of γ -irradiation on neuroblastoma cells in culture. **Proc Soc Exp Biol Med**, New York, v.175, n.1, p.88-92, Jan. 1984.
- 36 SHIRAISHI, N. *et al.* Radiation-induced peroxidation of lipid dissolved in organic solvent and its inhibition by alpha-tocopherol and cepharanthine. **Physiol Chem Phys Med NMR**, Melville, v.17, n.3, p.243-246, 1985.
- 37 SIMON, G.A. *et al.* Wound healing after laser injury to skin – the effect of occlusion and vitamin E. **J Pharm Sci**, Washington, v.83, n.8, p.1101-1106, Aug. 1994.

- 38 STEIN, M., BRADY, L.W., RAVENTOS, A. The effects of radiation on extraction-wound healing in the rat. **Cancer**, Philadelphia, v.10, n.6, p.1167-1181, Nov./Dec. 1957.
- 39 STEWART, R.J. *et al.* The wound fibroblast and macrophage. II: Their origin studied in a human after bone marrow transplantation. **Br J Surg**, Guilford, v.68, p.129-131, 1981.
- 40 TAREN, D.L. *et al.* Increasing the breaking strength of wounds exposed to preoperative irradiation using vitamin e supplementation. **Int J Vitam Nutr Res**, Bern, v.57, n.2, p.133-137, Dec. 1986.
- 41 UZUNIAN A. Electrón microscopy of cOOLagen resorption by fibroblasts in wound repair of the albino rat skin. **Rev Bras Pesq Méd Biol**, São Paulo, v.12, n.4-5, p.347-350, 1979.
- 42 VIZIOLI, M.R. Macromolecular organization of rat sponge-induced granulation tissue as reveled by dichroism. **Acta Anat (Basel)**, Basel, v.80, n.10, p.73-80, Nov. 1971.
- 43 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.