

PLAUTO CHRISTOPHER ARANHA WATANABE

*Este exemplar foi devidamente corrigido, conforme
resolução CCPG/036/83
Piracicaba, 28/01/93
MRVigol*

EFEITOS DE BAIXAS DOSES DE RADIAÇÃO
SOBRE A GENESE E EVOLUÇÃO DO TECIDO
DE GRANULAÇÃO. ANALISES QUANTITATIVA
E QUALITATIVA.

TESE APRESENTADA A FACULDADE DE ODONTOLOGIA
DE PIRACICABA-UNICAMP, PARA OBTENÇÃO DO
GRAU DE MESTRE EM ODONTOLOGIA NA ÁREA
DE CONCENTRAÇÃO RADIOLOGIA.

PIRACICABA-SP

1992

W29e

18946/BC

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

PLAUTO CHRISTOPHER ARANHA/WATANABE *π*/23/

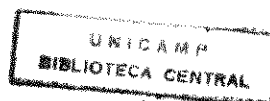
EFEITOS DE BAIXAS DOSES DE RADIAÇÃO
SOBRE A GENESE E EVOLUÇÃO DO TECIDO
DE GRANULAÇÃO. ANALISES QUANTITATIVA
E QUALITATIVA.

TESE APRESENTADA A FACULDADE DE ODONTOLOGIA
DE PIRACICABA-UNICAMP, PARA OBTENÇÃO DO
GRAU DE MESTRE EM ODONTOLOGIA NA ÁREA
DE CONCENTRAÇÃO RADIOLOGIA.

ORIENTADOR: PROF. DR. MARIO ROBERTO/VIZIOLI *π*
COORIENTADOR: PROF. DR. FRAB NORBERTO/BOSCOLO *π*

PIRACICABA-SP

1992



Do meu sogro Gerson Bernardes de Carvalho,

que em sua eterna simplicidade, nos deixou uma lição de vida, e
muitas

SAUDADES

Ao meu pai Oswaldo Aranha Watanabe.

amigo em todos os momentos, sonhador como eu, pois sonhamos este momento singular juntos. A minha realização também é a sua.

A minha mãe Anna Penha Watanabe.

lutadora incansável, a vida tem sido por demais dura, mas reconheço que dentro da sua ingênua simplicidade o orgulho deste momento é o auge de sua realização como mãe.

Ofereço este trabalho

A minha "Querida" esposa Marlivia G. de Carvalho Watanabe.

por ser companheira, amiga, mulher, sempre ao meu lado, e
pelo tudo que representa em minha vida,

Dedico este trabalho e o meu AMOR

A MISAO, aos meus irmãos Ari, Poty, Glauco; minha irmã Daniele e minha sogra.

que muito representam em minha vida,

dedido este trabalho.

Ao Prof. Dr. Mario Roberto Vizioli, Titular da Disciplina de Patologia da FOP-UNICAMP,

pela segurança e boa vontade demonstradas na orientação deste trabalho de pesquisa, mesmo nas horas de descanso,

o meu sincero reconhecimento e gratidão

AGRADECIMENTOS

A todos os funcionários da Faculdade de Odontologia de Piracicaba da UNICAMP que, direta ou indiretamente colaboraram de alguma forma na realização deste trabalho de pesquisa.

Ao Prof. Dr. Frab Norberto Boscolo, Coordenador do curso de Pós-Graduação em Radiologia e meu Co-orientador, pela compreensão, orientação e amizade.

Ao Corpo Docente do Curso de Pós-Graduação da FOP-UNICAMP pelos ensinamentos e salutar amizade.

A Reitoria da UNICAMP e a Direção da FOP pelo estímulo científico prestado durante todo o curso de Pós-Graduação.

Aos amigos e "gurus" Profs. Jose Roberto Tamburus e Luiz Carlos Fardini, pela confiança em mim depositada.

INDICE

1 -INTRODUÇÃO.....	1
2 -REVISTA DA LITERATURA.....	6
3 -PROPOSIÇÃO.....	30
4 -MATERIAL E METODO.....	32
4.1 -Animais utilizados.....	33
4.2 -Material utilizado.....	33
4.3 -Tricotomia e procedimento cirúrgico.....	34
4.4 -Distribuição dos grupos experimentais.....	35
4.5 -Equipamento de raios X.....	36
4.6 -Dose de radiação.....	37
4.6.1 -Dosimetria.....	37
4.7 -Sacrifício dos animais.....	39
4.8 -Métodos de exame dos tecidos de granulação.....	40
5 -RESULTADOS.....	42
6 -DISCUSSÃO.....	71
6.1 -Coloração por H.E.....	73
6.2 -Coloração pelo azul de toluidina ph=4.....	79
6.3 -Impregnação pela Prata.....	82
7 -CONCLUSOES.....	86
8 -RESUMO.....	89
9 -SUMMARY.....	91
10-REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	93
11-APENDICE.....	99

1. INTRODUCAO

A origem da descoberta dos raios X data do século XIX, mais precisamente, do ano de 1895. Neste mesmo século, também surgiram as ciências do magnetismo e da eletricidade. Com a descoberta do magnetismo, as experiências com a eletricidade, tubos a vácuo e raios catódicos conduziram o cientista alemão Wilhem Conrad Röntgen, em oito de novembro de 1895, à descoberta dos raios X.

Após estudos enfáticos, Röntgen conseguiu demonstrar a maioria das propriedades dos raios X, relatando-as em dezembro de 1895, março de 1896 e maio de 1897. Roentgen relatou que os novos raios eram invisíveis e produziam fluorescência em certas substâncias; tinham a propriedade de se propagar em linha reta; impressionavam chapas fotográficas (semelhante à luz comum); nunca eram refletidos ou refratados por métodos experimentais, sendo diferentes dos raios catódicos, por não sofrerem desvios sob a influência de um campo magnético.

O Dr. Edmund Kells, cirurgião dentista que produziu a primeira radiografia odontológica da história, assim como Röntgen, foi um dos mártires da ciência radiológica, por desconhecer os perigos inerentes aos raios X. Os cientistas da época não tinham conhecimentos suficientes dos desastrosos efeitos de contínuas e pequenas exposições aos raios X; com o passar do tempo, notou-se, discretamente, que os indivíduos que sofriam longas exposições aos raios X exibiam uma suave inflamação, semelhante a uma queimadura por raios solares, mas estes efeitos desapareceriam após pouco tempo. Então, acreditava-se que as pequenas exposições, mesmo que frequentes, não produziriam efeitos danosos.

Os primeiros aparelhos de raios X foram projetados de maneira grosseira, sendo que os tubos necessitavam de ajustes no momento de cada exposição. Para esta finalidade, o operador colocava a sua mão entre o tubo de raios X e um fluoroscópio, ajustando a voltagem através de um reostato até se conseguir a melhor imagem de sua mão, vista sobre um "ecran" fluorescente. O Dr. Kells também utilizou-se desse método, para as tomadas radiográficas de seus pacientes desde o ano de 1896, sendo que, nenhum efeito havia se tornado evidente por um período de doze anos após os primeiros contatos com os raios X. A partir desse período, começaram a aparecer tumores cancerosos nos dedos de ambas as mãos, conduzindo o cientista a sofrer 35 operações, incluindo várias amputações, que o levaram à morte em maio de 1928, aos 72 anos de idade. Dentro de sua filosofia positivista, o Dr. Kells, quando já agonizava em seu leito, ainda publicou um último artigo científico, que resumia o seguinte:

"Devo murmurar pelo tratamento injusto que o destino me crucificou? Não, não posso fazê-lo; quando penso nos milhares de indivíduos sofridos que são beneficiados todos os dias pelo uso dos raios X, não posso queixar-me que uns poucos sofram pelo benefício de milhões, é a lei da natureza".

Röntgen, Kells e muitos outros pagaram o preço da evolução da ciência, evidenciando ao mundo os efeitos danosos produzidos pelos raios X no corpo humano, assim como, os mais diversos benefícios que a Radiologia trouxe a partir do século XIX e, com ela, as inúmeras pesquisas científicas que exploravam a nova ciência.

Com o aperfeiçoamento dos aparelhos de raios X, inúmeros trabalhos de pesquisa sobre dosimetria têm sido desenvolvidos, também há muita ênfase sobre os efeitos produzidos pela radiação no organismo animal. Os trabalhos sobre os efeitos dos diversos tipos de radiações, inclusive a radiação X, em células cancerosas são numerosos, sendo esse aspecto da Radiologia conhecido como Radioterapia Oncológica.

Os avanços foram grandes também no estudo dos efeitos da radiação nos mais diversos órgãos e tecidos humanos e animais, sendo muito extensa a literatura acêrca dos efeitos que os mais variados agentes patogênicos causam sobre a gênese e evolução do tecido reparador. Entre os agentes pesquisados estão os biológicos (bactérias, vermes, etc), químicos (medicamentos e outras drogas) e físicos (traumatismo, corrente elétrica, etc). Mas, na verdade, pouco se sabe a respeito dos efeitos provocados mais especificamente pela radiação X sobre o processo de reparo, principalmente, quando do uso de baixas doses de radiação.

A cicatrização de feridas é um dos mais interessantes dos muitos fenômenos que caracterizam o organismo vivo. A capacidade do tecido lesado de reparar-se é uma resposta da própria vida e dentro desse processo pode repousar a compreensão final da mãe natureza. Diz-se que uma ferida não curada, eventualmente, poderá resultar-se na morte do organismo. Por essa razão, a reparação deve ser considerada como um dos mecanismos primários de sobrevivência, a partir do próprio nascimento. Deve ficar muito bem entendido que a cura de uma ferida não é um fenômeno isolado e solitário, mas na realidade uma série complexa de eventos biológi-

cos.

A cura de todos os tecidos, após a agressão, apresenta em essência um padrão idêntico, podendo ser consideravelmente modificado na dependência de inúmeros fatores intrínsecos e extrínsecos, como, por exemplo, a radiação X.

Existe alguma controvérsia a respeito dos efeitos da radiação X na cura de feridas. Há relatos que afirmam que baixas doses de radiação, agindo no tecido de granulação, estimulariam o processo de reparo, e altas doses retardariam o mesmo. Outros afirmam apenas que a radiação retarda a evolução e gênese do tecido de granulação.

Por todos esses aspectos abordados e pela falta de dados específicos encontrados na extensa revista da literatura por nós realizada, procurou-se conduzir esta pesquisa, a fim de estudar os efeitos de baixas doses de radiação X, a nível odontológico, sobre o desenvolvimento do tecido de granulação.

2. REVISTA DE
LITERATURA

Desde a descoberta dos raios X e da radioatividade, ha cerca de 95 anos atrás, a capacidade destas ondas em penetrar os mais variados sistemas orgânicos de vida tem gerado grande interesse de estudiosos do mundo todo. O uso da radiação ionizante tem aumentado na área médico-odontológica, na indústria como um todo,e, até mesmo, na área militar. Em vista do difundido uso da radiação ionizante nos dias de hoje, torna-se óbvia a necessidade da total compreensão de sua ação sobre as moléculas, tecidos e órgãos dos seres vivos.

O tecido conjuntivo é o tecido de suporte do corpo humano e inclui os tendões, fascía ao redor dos músculos, paredes arteriais, ossos, ligamentos, cartilagens, cápsulas articulares e porções subepidermais da pele. Basicamente, o tecido conjuntivo propriamente dito é composto por três principais componentes: fibras, substância fundamental e células. Os componentes fibrosos constituem a maior parte e compreendem o colágeno, a elastina e a reticulina, que são proteínas insolúveis. A proliferação de células fibroblásticas e capilares, e a subsequente deposição de colágeno para a produção de uma cicatriz é o caminho natural a ser percorrido pelo organismo, quando danos tissulares são causados. STEIN et al⁴⁴, em 1957, já diziam que "se tornaria óbvio que a radiação tem efeitos definidos sobre a cicatrização (tecido de granulação) em feridas cirúrgicas, sendo de maior interesse o efeito produzido pela radiação nos tecidos em fase de reparação e que estavam se recompondo após extração dentária em animais". Os autores relata que quando a irradiação iniciou-se no mesmo dia das extrações ou 4 dias após, o processo de cicatrização foi ex-

tremamente retardado, e a qualidade do tecido conjuntivo jovem era muito pobre, havendo um diminuído número de células fibroblásticas novas. Quando a irradiação iniciou-se 8 dias após a extração dentária, somando-se o fato que a ferida não se encontrava totalmente fechada, os efeitos causados pela radiação foram menos marcantes nos tecidos neoformados.

GRILLO & POTSAID²⁰, em 1961, realizaram um estudo sobre a cicatrização de feridas expostas a doses de radiação X de 750 R. Atenção principal foi dada para o retardo na contração da ferida causado pela radiação X, e também pesquisada qual a possível origem das células fibroblásticas no tecido de reparo. Os dados apresentados mostraram efeitos posteriores qualitativos e quantitativos sobre as células fibroblásticas, efeitos estes ocorrendo em áreas irradiadas imediatamente após o procedimento cirúrgico, e nos intervalos precoces, após o ferimento, sugerindo fortemente a origem local destas células. Houve também um retardo no início do fechamento da ferida, por contração.

GRILLO¹⁹ em 1963, pesquisou a origem dos fibroblastos na cicatrização de feridas, avaliando pelo método autorradiográfico a inibição da proliferação celular pela irradiação X. O autor concluiu que a irradiação X, localmente aplicada em feridas produzidas experimentalmente, 28 horas após a injúria, resultou em cerca de 50% de redução nas proliferações subsequentes de fibroblastos e de células capilares endoteliais pela incorporação de timidina no interior do DNA. Quando a irradiação foi aplicada anteriormente ao início de qualquer infiltração celular de elementos sanguíneos, 20 minutos após o ferimento, observou-se uma marcada redu-

ção na proliferação celular. Por fim, afirma o autor que os fibroblastos de feridas, potencialmente em reparos, surgem, predominantemente, pela proliferação de células do tecido conjuntivo que já residiam no local, ao invés da hipótese de serem recrutadas de células precursoras, via sistema sangüíneo.

Já em 1966, NIMNI, LYONS e BAVETTA³¹ observaram que, quando da introdução de cápsulas radioativas contendo 1mg de Co^{60} em granulomas subcutâneos induzidos por espumas de polivinil, ocorre uma diminuição significativa da quantidade de colágeno presente. Os autores observaram que a diminuição foi devido, principalmente, à mudança no padrão da síntese, como avaliado pela queda considerável encontrada na quantidade do precursor de colágeno solúvel, presentes nos granulomas irradiados.

CHVAPIL⁹, em 1967, estudou em detalhes a fisiologia do tecido conjuntivo, chegando a várias conclusões à respeito do processo de reparo como um todo, com ênfase especial ao colágeno e os mucopolissacarídeos ácidos.

Outro trabalho de pesquisa que tratou do desenvolvimento do tecido granulomatoso sob a ação generalizada e local, direta e indireta dos raios X, foi desenvolvido por DMITRIEVA¹², no ano de 1967. Os dados colhidos atestaram uma considerável sensibilidade à radiação dos elementos vasculares e do tecido conjuntivo. O atraso no desenvolvimento do tecido granulomatoso esteve ligado, em primeiro lugar, à ação direta dos raios X nas células dos vasos e tecido conjuntivo locais. Um certo papel também foi desempenhado pelos distúrbios gerais do organismo em casos de radiolesão. E, finalmente, a formação de células do tipo poliblastos, à

partir do tecido adiposo em quantidade elevada, se comparada com a formação que ocorre no grupo controle, nos casos de radiolesão, deve, do ponto de vista do autor, ser considerada uma reação compensatória à diminuição da quantidade de poliblastos hematógenos.

SHEARER⁴¹, ainda no ano de 1967, observou o efeito de um feixe de Co^{60} sobre a cicatrização de extrações dentárias realizadas em mandíbulas de cães. A dose cumulativa de radiação foi de 6000 R (medida no ar), administrada em frações de 500 R. Sob as condições do experimento, pôde-se concluir que, em cães, a terapia radioativa de um feixe de Co^{60} poderia ser iniciada imediatamente após o procedimento cirúrgico da extração sem significativo efeito sobre o processo cicatricial.

Já em 1968, SCHULE & LUDWIG³⁹ também realizaram estudo sobre os efeitos da radiação sobre a cicatrização de feridas após a extração de dentes de cães. Os autores, durante o estudo histológico, observaram dano causado pela radiação X, sendo que as reações progrediam de duas diferentes formas: (1) atraso no processo de cicatrização e (2) formação de osteorradionecrose (radio-osteomielite).

BRYANT, SLESH e WEEKS⁷, em 1968 estudaram a síntese de colágeno e mucopolissacarídeos em cicatrização de feridas irradiadas com doses de 750 e 1500 R. Concluíram os autores que a inibição da atividade das feridas pode resultar do efeito direto da radiação sobre a atividade fibroblástica, sendo que, entretanto, os efeitos concomitantes sobre a pele abdominal não irradiada sugerem a existência de um fator sistêmico.

Em 1968, BAILEY⁵ realizou um estudo interessante a respeito dos efeitos da radiação ionizante sobre os componentes do tecido conjuntivo, na forma de revisão. Os efeitos radiobiológicos sobre os vários constituintes do corpo têm sido extensivamente investigados tanto nos níveis clínicos como em relação aos estudos radioterapêuticos. O tecido conjuntivo tem figurado entre os tecidos mais radiorresistentes que compõem o corpo. Altas doses de radiação são necessárias para produzirem efeitos visíveis, segundo o autor, como, por exemplo, o eritema e a ruborização da pele, e após doses agudas, a ulceração. Os efeitos da radiação ionizante sobre todos os componentes do tecido conjuntivo foram minuciosamente estudados pelo autor, que entre outras observações, verificou que membranas de tecido conjuntivo expostas a doses de radiação de 10 R têm sua permeabilidade à solução salina aumentada, alcançando o pico após 100 R. Doses de cerca de 1000 R são requeridas para produzirem um avermelhamento da pele; e, para altas doses de radiação a destruição celular é manifestada pela formação de bolha na epiderme.

ROGERS³⁵, em 1969, realizou um estudo sobre a dose de radiação recebida na pele, durante vários tipos de exames radiográficos diagnósticos.

ZELMAN et al⁵⁴, no ano de 1969, apresentaram um trabalho sobre os efeitos da irradiação de corpo todo sobre a cicatrização de feridas e sobre o sistema hematopoiético de ratos. Segundo os autores, muitos trabalhos têm sido desenvolvidos sobre os efeitos da irradiação local e de corpo todo no processo de cicatrização de feridas; a soma desses experimentos visa determinar o tempo

ideal para se proceder determinada intervenção cirúrgica, dentro de um período de necessária exposição à radiação do corpo todo. O autor cita alguns trabalhos como o de RADOKOVICH, et al, em 1954, que realizou estudos sobre os efeitos de 150 R, 450 R e 650 R de irradiação de corpo todo sobre o fechamento de feridas, não encontrando retardo no mesmo; FLICKINGER, et al, em 1958, irradiou ratos com 200 R e 600 R sobre o corpo todo, verificando que todas as feridas foram fechadas imediatamente após a irradiação. Estes pesquisadores notaram uma depressão mínima na formação de colágeno para 8 a 12 dias após a incisão, mas não encontraram diferença significativa para 16 dias após a incisão; e RAVENTOS, em 1954, apresentou estudo sobre a cicatrização de feridas em ratos incisados imediatamente após a exposição a 500 R de radiação de corpo todo, demonstrando um significativo retardo na cicatrização da ferida para o 6º e 11º dias somente. ZELMAN, et al concluram que pareceria apropriado que a intervenção operatória fosse realizada de 2 a 3 semanas após a irradiação (200 R ou 600 R) em ratos.

ITOIZ et al²³, em 1969, investigaram as mudanças produzidas na distribuição da fosfatase alcalina e da fosfatase ácida, durante o processo de cicatrização de feridas irradiadas com dose aproximada de 6000 rads para diferentes estágios de reparo do tecido. Os autores citam FRANDSEN (1962) e GRILLO (1963), que afirmam que a irradiação local produz um importante atraso no processo de cicatrização de feridas. Isto é resultado da forte inibição da proliferação fibroblástica e de um retardo da contração normal produzida pela deficiente orientação da migração celular. Também é conhecido que as mudanças na proliferação vascular produzem al-

terações no padrão normal do tecido de granulação. Van der BERG, et al(1965) e POWERS(1967) segundo citação dos autores, afirmaram que a relação entre o momento da irradiação e a produção da ferida havia sido estudada com especial interesse por causa das importantes implicações clínicas. Os autores encontraram uma evidenciada diminuição na fosfatase alcalina e uma menor diminuição na fosfatase ácida, sendo constatado que a radiação atrasou o processo de cicatrização como um todo.

WEEKS⁵², ainda no ano de 1969, publicou um trabalho onde irradiou a pele dorsal de ratos com dose de 1388 rads, e mediu a quantidade de degradação total de colágeno calculado pela excreção urinária. O grau de excreção encontrado não foi significativamente diferente. Observou também uma redução quantitativamente significativa na excreção da hidroxiprolina, quando a irradiação foi feita imediatamente após o ferimento. Ferimento local, irradiação local ou imediata irradiação local de uma ferida não altera o grau de excreção urinária de hidroxiprolinas livres e/ou ligadas; já em uma ferida dorsal ou irradiação da pele dorsal não altera a quantidade de excreção de hidroxiprolinas ligadas, mas a irradiação local imediata de uma ferida dorsal deprime significativamente a quantidade de hidroxiprolinas ligadas excretadas na urina.

No início da década de 70, DOTTO et al¹⁵ observaram que nos estágios iniciais da cicatrização ocorrem uma ativa proliferação angioblástica e que esta oferece um propício modelo experimental para o estudo das mudanças nos tecidos em regeneração induzidas pela radiação. O estudo quantitativo da resposta vascular em fe-

ridas irradiadas mostrou haver importantes alterações na neoformação vascular, assim como uma diminuição significativa do grau de crescimento do tecido. Os autores puderam concluir de seus resultados, que a cicatrização de feridas tanto nos animais irradiados, como nos não irradiados, requer uma certa quantidade de desenvolvimento de vasos sanguíneos.

Estudos prévios têm revelado que a radiação inibe a cicatrização de feridas, sem alterar o conteúdo total de colágeno na mesma. Baseado nesta afirmação ARCHER et al³, em 1970, determinaram os efeitos da irradiação local sobre o grau de hidroxilação prolina ¹⁴C na cicatrização de feridas. Os autores concluíram que a formação de colágeno foi evidenciada pela hidroxilação prolina, começando, imediatamente, após o ferimento primário; um progressivo aumento na hidroxilação prolina acompanha o fenômeno secundário do ferimento; uma simples dose de radiação inibe a hidroxilação prolina, sendo que o grau e duração da inibição é dose-dependente; e, por fim, a irradiação local de feridas produz efeitos distantes sobre a hidroxilação prolina.

ROSS, EVERETT e TYLER³⁶, em 1970 realizaram um estudo sobre a cicatrização de feridas e formação de colágeno. Seu principal objetivo foi o de verificar a origem dos fibroblastos nas feridas de animais parabióticos. Existia, segundo os autores, muita controvérsia em relação a origem dos fibroblastos que ocupam o ferimento; COHNHEIM(apud ROSS, 1970)descreveu a migração leucocitária através das paredes dos vasos sanguíneos em exudato inflamatório e sugeriu que essas células poderiam mais adiante virem a se transformar em fibroblastos, durante o processo de reparo. Outros

autores têm concordado com a afirmação desse autor, assim como muitos outros discordam dessa idéia, sustentando a hipótese de que as células sanguíneas não têm capacidade de se transformarem no interior do tecido conjuntivo em células formadoras de fibras. Com a aplicação de uma dose de radiação de 800 R de um feixe de Co^{60} , ROSS, EVERETT e TYLER³⁶ propuseram destruir essencialmente todos os tecidos hematopoiéticos nos animais que não receberam proteção contra a radiação. A observação que células fibroblásticas não marcadas foram encontradas na série de estudos onde a parabiose foi estabelecida, somada a observação da elevação das taxas de timidina, após irradiação das células perivasculares do tecido conjuntivo, claramente suportam a idéia de que as células fibroblásticas presentes nos tecidos em reparo não são derivadas das células sanguíneas, mas, provavelmente, devem migrar do tecido conjuntivo perivascular adjacente.

A evolução do ganho de força de tensão em feridas de pele excisada em ratos irradiados com 700 rads de radiação gama no corpo todo foi estudada por STAJIC & MILOVANOVIC⁴², em 1970. Os resultados mostraram que a força de tensão das feridas de animais irradiados tornaram-se mensuráveis dois dias posteriores ao que aconteceu nos animais do grupo controle, que também receberam o ferimento, e a força de tensão das feridas excisadas não alcançou o nível da pele normal, após o período de um ano. É possível que o atraso no aumento da força de tensão, que foi notado nestas condições experimentais e que adiou o início da collagenase em experimentos anteriores possa ser atribuído ao atraso, no início da fibroplasia, sob a influência da radiação ionizante.

TRAEHNES et al⁴⁵, em 1971, após irradiar granulomas "in vivo" e "in vitro", com amplitude local e total, pôde verificar as mudanças radioinduzidas da extensão da incorporação de glicina-2-¹⁴C em granuloma colágeno. Tanto a exposição total dos granulomas como a local resultaram em uma diminuição da atividade relativa específica do ¹⁴C, durante os períodos precoces à irradiação, seguida por um retorno aos níveis normais; houve um segundo declínio na atividade específica relativa, 24 horas após a exposição do granuloma-colágeno dos animais irradiados de corpo todo. A exposição à radiação X local, "in vitro", das fatias de granuloma não tinha efeito sobre a incorporação do ¹⁴C, trinta minutos após a exposição aos raios X. Estas observações sugeriram aos autores que a depressão precoce na incorporação do ¹⁴C é relativa às mudanças estruturais da superfície da célula, enquanto o declínio na incorporação do ¹⁴C, 24 horas após a irradiação X no corpo todo, é creditada a um efeito sistêmico geral da radiação X. Parece incomum que os efeitos "in vivo" sejam efeitos primários da radiação X, que afeta a biossíntese do colágeno diretamente.

A cicatrização de feridas também foi estudada sob o efeito de outras ondas eletromagnéticas como no estudo de MESTER et al²⁸, em 1971, que utilizando uma baixa energia de radiação laser, irradiou ferimentos. Os autores puderam concluir que baixas doses de radiação laser estimulam a regeneração, não somente das feridas induzidas mecanicamente, mas também de queimaduras. Observaram ainda, que a cicatrização de feridas estimuladas pela radiação laser envolve um aumento do grau de crescimento epite-

lial, que podera eventualmente ser o ponto inicial do crescimento neoplásico.

STAJIC & MILOVANOVIC⁴³, agora no ano de 1971, estudaram as mudanças histológicas ocorridas em ferimentos da pele de ratos, expostos a 700 rads de radiação gama aplicada ao corpo todo. Os resultados mostraram, que para a dosagem utilizada, houve um atraso significativo de todo o processo de cicatrização, ou seja, inflamação local, epitelização, fibroplasia, angiogênese e colagenase. Porém, quando do início do processo de reparo, ambos os grupos progrediram quase da mesma maneira (irradiado e controle), mas o tempo perdido no início não poderia ser compensado até o final de 10 dias.

Ainda no ano de 1971, VIZIOLI⁴⁹ estudou a organização macromolecular do tecido de granulação, induzido pela implantação de esponja de PVC em ratos, através do dicroísmo. Para isto o autor corou os cortes histológicos obtidos com azul de toluidina pH=4 examinando-os sob luz polarizada. Os resultados encontrados mostraram que, em geral, o tecido de granulação possuía dois diferentes aspectos morfológicos, com o mesmo padrão de desenvolvimento. O dicroísmo revelou que a associação orientada entre os mucopolissacarídeos ácidos e as macromoléculas de colágeno iniciava-se ao redor do sétimo dia pós-ferimento e que a organização final do tecido estabeleceu-se ao redor de duas semanas após a implantação da esponja.

A combinação da injúria à radiação e ao trauma cirúrgico, abordando o efeito de substâncias antimicrobianas sobre o padrão de cicatrização de feridas em ratos irradiados com radiação X,

foi estudada por DONATI¹³, em 1971, verificando que a administração de tetraciclina e estreptomicina diminui a mortalidade, quando da combinação das injúrias cirúrgica e radioativa. A administração de cloranfenicol, estreptomicina ou a tetraciclina não interferiram no padrão normal de cicatrização de feridas nos animais não-irradiados, e nem a administração desses antimicrobianos restaurou o padrão de cicatrização de feridas nos animais irradiados, sugerindo que a infecção pode não conduzir a uma regra primária de atraso na contração de feridas, resultando da injúria à radiação.

SCHULE⁴⁰, em 1971, realizou estudo clínico e experimental, avaliando os efeitos dos raios X na cicatrização de feridas alveolares após extrações dentais em cães. O autor expôs uma metade dos focinhos dos cães a uma dosagem de radiação de 4000 ou 6000 R. Os resultados histológicos mostraram um retardo na organização do coágulo, e, também a cobertura epitelial mostrou certo atraso. Com base nestes achados derivam os seguintes princípios para o tratamento preventivo, quando das extrações dentais nos tecidos danificados pelos raios X: 1)"todas as extrações necessárias devem ter lugar antes do início do tratamento pelos raios X". 2)"a extração dental no tecido irradiado deve ter lugar sob proteção antibacteriana ótima".

DONATI et al¹⁴, em 1972, estudaram a exposição à radiação ionizante, em doses meio-letais, de feridas em plena cicatrização. Os autores afirmaram que, nessa faixa de dosagem empregada, ocorre um retardo no padrão de cicatrização das feridas irradiadas. Os conteúdos de zinco, cobre e ferro foram determinados. Nos

animais irradiados, onde a cicatrização das feridas foi atrasada por 4 dias, a curva de ferro mostrou atraso. Nas feridas irradiadas, que demonstraram retardo na sua cicatrização, o conteúdo de zinco foi, no início, extremamente alto e caiu para um nível útil ao 30.º dia, permanecendo até o 60.º dia. Os resultados encontrados sugeriram que o tempo da amostragem, seguindo o ferimento, é muito importante para determinar a relação do conteúdo de zinco no tecido de granulação e o grau de reparo da ferida. Embora não houvesse tentativa para se achar o zinco exógeno nos animais do experimento, os autores notaram que o conteúdo de zinco era diminuído no tecido de granulação embebido dos ratos irradiados, que possuíam retardo na cicatrização de feridas.

Em 1974, JOVANOVIC²⁴, dando ênfase aos fatores não celulares, sobre a influência da radiação nos vasos e circulação sangüíneos, chegou às seguintes conclusões: os mucopolissacarídeos ácidos são depolimerizados pela radiação ionizante, sendo este efeito instantâneo e podendo ser medido igualmente durante a exposição. Esse efeito também pode aparecer com doses médias tão baixas quanto 1 a 2 R; e, a depolimerização possui duração variável. Reparo instantâneo tanto quanto aumento da substância fundamental, persistindo durante o 170.º dia pós-irradiação, foram reportados por DETRICK (1967) (apud JOVANOVIC, 1974). Como última conclusão, o autor observou que as consequências funcionais de cada depolimerização são, principalmente, as mudanças na permeabilidade para água e alguns solutos.

REINHOLD³⁴, ainda em 1974, relatou as investigações sobre a estrutura microvascular e a microcirculação, de autores co-

mo TAKAHASHI, em 1930, que investigou a radiosensitividade do crescimento capilar, após ferimento, notando que a divisão mitótica do endotélio, após o ferimento, iniciou-se completamente em período precoce e que as mudanças no núcleo já poderiam ser detectadas uma hora após o procedimento cirúrgico. O autor concluiu que capilares jovens e fibroblastos foram muito radiosensitivos e que a extensão da inibição do crescimento depende da dose de radiação administrada. Após altas doses de radiação, a regeneração do sistema vascular veio das partes vizinhas. O autor poderia contestar a afirmação, de que pequenas doses de radiação foram estimulantes, uma idéia que parece ser sustentada por alguns clínicos daquele tempo.

Utilizando-se de altas doses de radiação X(4000 R), (4000-20000), van den BRENK & STONE⁴⁶, em 1974, estudaram os efeitos dessas dosagens sobre o crescimento e função do tecido de granulação. A irradiação atrasou o início da contractibilidade e seu desenvolvimento por redução do crescimento do tecido de granulação; entretanto, não afetou a afinidade ou atividade intrínseca dos receptores agonistas, que causam a contração desse tecido, mas tendeu para aumentar a força de contração.

Van den BRENK et al⁴⁷, em 1974, descreveu os efeitos produzidos por doses de radiação X simples e fracionadas, sobre a contração de feridas circulares, produzidas sobre a pele de ratos, com referência particular aos efeitos produzidos pela irradiação pré e pós-operatórios. A irradiação local pré-operatória da pele intacta, imediatamente antes do ferimento, causou reduções dose-dependentes do grau de contração da ferida, principalmente, de-

vido ao atraso e inibição do crescimento do tecido de granulação. Já, quando da aplicação de dose fracionada, houve evidência de reconstrução do dano subletal. O efeito da irradiação pré-operatória foi diminuído por um aumento no tempo entre a irradiação e o ato cirúrgico do ferimento. A proteção parcial da margem ou base do ferimento recém preparado, durante a irradiação mostrou que a concentração do esfíncter do tecido de granulação produziu, na periferia da ferida aberta, principalmente, o efeito da contração. Quando a irradiação foi administrada pós-operatoriamente (após o desenvolvimento do tecido de granulação) o grau de contração da ferida não foi diminuído.

VIZIOLI⁵⁰, em 1975, realizou um trabalho de tese com a finalidade de pesquisar a presença e o possível papel do grupo enzimático das fosfomonoesterases nos tecidos de granulação de ratos, induzidos pela implantação de esponjas de policlorovinil (PVC) no tecido subcutâneo de ratos. Os resultados mostraram que a síntese de colágeno e de mucopolissacarídeos ácidos no tecido de granulação iniciou-se logo após os primeiros dias de desenvolvimento e atingiu o ponto máximo entre 15 e 20 dias, decaindo visivelmente após esse período de tempo.

DE LOECKER, et al¹¹, em 1976, avaliou o metabolismo do colágeno na pele de ratos e sua resposta à irradiação X, durante três consecutivos ciclos de pelos. A biossíntese do colágeno e sua modificação, avaliadas pela hidroxilação da prolina (U-14C), procedem como uma função do periódico fenômeno de crescimento dos pelos. Um simples tratamento com radiação X com doses em torno de 750-3000 R para a pele não afeta a composição aminoácida do colá-

geno, mas reduz a hidroxilação da prolina em sua capacidade fibroblástica. O dano inicial para o tecido, que resulta em uma reduzida concentração de colágeno da pele, particularmente reparável após vários ciclos de pelos, é, no mínimo parcialmente, responsável pelo atraso na cicatrização após a irradiação.

O estudo do tecido de granulação induzido por esponja de PVC foi desenvolvido por **VIZIOLI & ALMEIDA⁵¹**, em 1978. Foram realizadas observações histológicas e histofométricas com ênfase ao comportamento das glicosaminoglicanas. A fisiopatologia desse tecido de granulação, exposto à ação da droga Carnosine, mostrou que a orientação macromolecular do tecido e, conseqüentemente, a sua maturação acontece após 3 semanas de desenvolvimento. A atividade da síntese de colágeno e glicosaminoglicanas no tecido também é alcançada por volta da terceira semana.

ARLASHCHENKO⁴, em 1981, estudou o significado da dose de radiação nas reações da barreira histoquímico-vascular. Há inúmeras provas da diminuição da efetividade biológica da exposição prolongada à radiação ionizante, em comparação com uma exposição mais intensa, no tocante à necrose provocada e às reações do sistema de hemoplasia dos animais. Os efeitos biológicos apontados dependem da reação do tecido sangüíneo, o qual apresenta um alto nível de regeneração biológica, e, é justamente isto que determina a presença neles de processos restauradores, durante todo o período da radiação. Ao mesmo tempo, vários estudos sobre as reações de tecidos com baixo nível de regeneração fisiológica (sistema nervoso, músculos, etc.), quando expostos à radiação, comprovam a tese da independência do grau de tais radiações ionizantes

da dose de radiação. Deste modo, o grau de reação da barreira histico-vascular e dos sistemas de tecidos com baixo nível de regeneração fisiológica não dependem da intensidade da dose, quando há a correspondente variação do tempo de exposição e manutenção de determinada dose. O valor mínimo(pico) desta dose para a reação de perturbação da função protetora da barreira histico-vascular especializada encontra-se no intervalo $0,004 > x > 0,0001$ Gr/seg.

As glicosaminoglicanas, que são as substâncias cimentantes das fibras colágenas, foram estudadas por DROZDZ et al¹⁶, em 1981. Um aumento na quantidade total dos componentes estudados em frações de GAGs em vários tecidos(pele, fígado,pulmões e parede aórtica), utilizando dose de radiação de 500 R, foi verificado. A irradiação produziu vários distúrbios no metabolismo das GAGs, mas o mecanismo responsável por estas mudanças ainda não é certo, segundo os autores.

Em declaração do " Council on Dental Materials, Instruments, and Equipament"¹⁰ de 1981, publicada em 1982, são relatados os efeitos biológicos da radiação produzida quando das tomadas radiográficas odontológicas. As conclusões da reunião daquele conselho apontaram que há grande evidência dos efeitos adversos da radiação em doses suficientes; já para as doses empregadas na clínica odontológica, não há provas evidentes de semelhantes efeitos. A radiologia dental contribui um pouco com a carga total de radiação recebida pelos seres humanos, mas essa conclusão não é, necessariamente, significativa.

DORZDZ, KUCHARZ e MANCZAR¹⁷, 1982, mediram o conteúdo de colágeno na pele, fígado, pulmões e músculo cardíaco de ratos, após estes serem irradiados com uma simples dose de 500 R, encontrando uma diminuição no conteúdo de colágeno total na pele, produzido por uma diminuição de colágeno sal-solúvel neutro e ácido solúvel.

HOPEWELL & YONG²² em 1982, estudaram os efeitos do tamanho do campo sobre a reação da pele de porco exposta a simples doses de raios X. A importância do tamanho da área de tratamento para a resposta da pele à irradiação, para áreas de $16\text{cm}^2(4 \times 4)$ e $64\text{cm}^2(16 \times 4)$ foram comparadas após simples doses de raios X. No período inicial, de 3 a 9 semanas após a irradiação, a severidade da reação de eritema, a qual pode ser associada com a morte de células epidérmicas, não foi influenciada pela área da pele irradiada. Já para respostas tardias, os autores observaram na derme (10 a 16 semanas) um resultado similar.

RAEV, CHIRKOV e PARKHOMENKO³³, em 1983, mostraram que, após a administração de baixas doses de radiação, houve uma estimulação da adesão inicial ao substrato de fibroblastos de hamsters chineses em cultura. Ao contrário das observações feitas pelos autores já citados, estes consideraram baixas doses de radiação, ao nível de 0,15 Gy, e não acima de 1 Gy.

Em 1984, durante um simpósio de cicatrização de feridas, MOORE²⁹ fez alguns relatos sobre os efeitos da radiação sobre o tecido conjuntivo, sobre o tecido vascular, sobre a cicatrização de feridas, sobre o problema da irradiação pré ou pós operatória, e sobre a recuperação cirúrgica de pacientes submetidos a comple-

ta exposição a radiação. MOORE observou que durante a cicatrização de feridas expostas à radiação, em uma fase inicial do reparo, onde o mais evidente achado é o aumento da permeabilidade capilar com a formação de um coágulo de fibrina, a radiação causa poucas mudanças; senão, uma redução no número de células inflamatórias. Entretanto, passados alguns dias após o ferimento e com a formação do tecido de granulação, pode-se ver uma proliferação capilar, tanto quanto uma diminuição fibroblástica, quando da observação da ferida irradiada. A formação do colágeno também é afetada, sendo retardada também a aparência de maturidade. Com a aplicação de pequenas ou moderadas doses de radiação o atraso da cicatrização da ferida, eventualmente, torna-a morfológicamente normal para períodos posteriores. O efeito é dose-dependente, com o progressivo aumento das doses vindo a causar maior redução de capilares e fibroblastos, e um conseqüente maior atraso na cicatrização. Simples doses de radiação, menores que 300 rads, não causam atraso na cicatrização; já, com doses de 1000 rads, começam a ser detectadas mudanças morfológicas e bioquímicas na ferida, embora essas mudanças possam ser mínimas.

No ano de 1985, BARTON, et al⁶ estudou uma técnica não invasiva para a detecção de baixas doses de radiação X para a pele, acreditando ser importante para a proteção contra a radiação. Foram estudados os efeitos de doses de raios X abaixo de 2 Gy (sub-ritema) sobre a pele humana. Os resultados indicaram que doses de radiação entre 0,5 e 1,0 Gy foram suficientes para deprimir, significativamente, a produção de células epidérmicas na camada basal. Para os 3 estágios do processo de queratinização, as altera-

ções funcionais tinham ocorrido dentro de 3 dias após exposição a uma dose de raios X de 1,0 Gy. Por esta razão pareceu comum que as várias mudanças foram parcialmente independentes(mínimo) de cada outra, e que o estrato córneo pode servir como um dosímetro biológico para a detecção de exposição a baixas doses de radiação ionizante.

Ainda no ano de 1985, **ANDRADE**² avaliou experimentalmente em ratos, os efeitos antiinflamatórios da betametasona, quando empregada em posologias e preparações distintas. Para isso, o autor induziu um processo inflamatório em pele de ratos, sob condições normais, e assim, observar os aspectos histológicos do tecido de granulação, tanto em sua etapa inicial quanto em sua fase de reparação.

KAHNBERG & THILANDER²⁵, 1987, realizaram um estudo sobre a cicatrização de feridas excisionais-experimentais no palato de ratos, feridas estas que sofreram exposição à radiação na forma de uma simples dose de 16 Gy para um grupo experimental e 20 Gy para outro. A radiação foi administrada nos animais 3 semanas antes da excisão experimental. O período de observação da cicatrização das feridas foi de 21 dias. A apuração dos resultados mostrou que a cicatrização das feridas foi fortemente afetada no grupo de animais que recebeu 20 Gy, sendo notada uma necrose óssea e reação inflamatória mais ou menos extensa, com uma superfície extensa da ferida ficando aberta após o período de estudo de 3 semanas; já no grupo de animais, que recebeu uma simples dose de radiação de 16 Gy, a cicatrização foi um pouco mais lenta, que no grupo de animais controle, mas, não tão complicada, como no

grupo que recebeu dose de radiação de 20 Gy.

Ainda no ano de 1987, o autor GUIDUGLI NETO²¹ realizou um estudo sobre o tecido de granulação, abordando principalmente os efeitos da radiação X sobre os brotos e alças capilares superficiais desse tecido. O estudo teve base especificamente quantitativa para o volume vascular. O efeito da irradiação direta sobre o tecido de granulação é variável. Pequenas doses podem estar associadas com uma aceleração do processo, enquanto que doses maiores podem levar a um atraso no processo de cicatrização. O autor, após produzir feridas no dorso de 20 ratos, com profundidade abaixo do subcutâneo, irradiou-as com dose de radiação de 2000 rads, liberadas 6 dias após a injúria cirúrgica. Com a apuração dos dados experimentais, o autor verificou uma diminuição na vascularização até o 7^o dia, vindo a aumentar, minimamente, até o 15^o dia, e diminuiu, subsequentemente, até o 30^o dia. O autor não observou aumento do crescimento vascular da porção superficial do tecido de granulação com a dosagem de radiação empregada, como foi previamente relatado por outros autores que estudaram o volume sanguíneo total do tecido de granulação. Por fim, pôde concluir que o fenômeno de "hipervascularização", se existe, não é originado nos brotos e alças superficiais do tecido de granulação, mas poderia ser relatado como sendo do crescimento de vasos sanguíneos mais profundos.

ABDALLA¹, em 1988, realizou um estudo histológico sobre a gênese e evolução do tecido de granulação sob os efeitos de baixas doses de radiação X. Nesse estudo, o autor abordou apenas os aspectos quantitativos em relação a esses efeitos causados pelos

raios X sobre o desenvolvimento do tecido de granulação. O autor pôde obter como resultados que os baixos níveis de radiação utilizados no experimento produziram efeitos cumulativos, ou seja, retardo no desenvolvimento do tecido de granulação, em ambos os grupos tratados, comparados aos animais do grupo controle. As doses administradas de maneira alternada(dia sim, dia não) produziram um maior efeito cumulativo em relação ao grupo tratado com dose única.

Os efeitos da radiação sobre a cicatrização de feridas na pele são de muito interesse na prática clínica médico-odontológica, onde observamos, comumente, a combinação da radiação e tratamentos cirúrgicos. A resposta a uma determinada dose de radiação pode vir a inibir a cicatrização; e, os efeitos do tempo entre a radiação e o procedimento cirúrgico tornam-se, assim, de suma importância. GORODETSKY, Mc BRIDE e RODNEY WITHERS¹⁸, em 1988, testaram os efeitos da radiação sobre a cicatrização de feridas na pele do dorso de ratos e assim mediram a resistência dessas feridas. Os animais foram expostos a doses de radiação de 21 Gy ou 26 Gy, sendo que apenas a região inferior do animal, onde se encontrava o ferimento, é que sofreu a exposição à radiação. Uma simples dose de 18 Gy, anterior ao ferimento, reduziu a resistência das feridas em cerca de um terço, a metade em relação a uma ferida não irradiada, dentro do período de 3 meses. O efeito da radiação sobre a resistência da ferida não se alterou quando o intervalo entre o ferimento e a exposição foi aumentado para 2 meses, mas diminuiu quando esse intervalo foi estendido para 3 meses. Quando a ferida foi irradiada dentro do período de 5 dias

após ao procedimento cirúrgico, os efeitos sobre a cicatrização foram os mesmos do que no procedimento da pré-irradiação; quando a irradiação foi atrasada por 12 dias após o ferimento, a segunda fase da cicatrização foi somente adiada e a resistência da ferida, basicamente, aproximou-se do valor apurado para as feridas não-irradiadas. A persistência do número mínimo de 3 meses, do efeito da radiação sobre a cicatrização de feridas sugere que o tecido envolvido no processo de cicatrização possua, normalmente, uma lenta proliferação.

NIKOLAEVA, et al³⁰, no ano de 1988, apresentou estudo sobre um dos principais componentes do tecido conjuntivo, tecido este que constitui 50% da massa corporal do organismo humano e forma a sua carcaça de apoio, ou seja, as estruturas de colágeno sob influência da radiação ionizante no tendão de Achilles humano. Observando-se os dados desta pesquisa, em que se empregaram testes de solubilidade, indicadores físico-químicos e a ultra estrutura do tecido, foi possível concluir que, quando da aplicação de pequenas doses de radiação (biológicas) no colágeno do tendão de Achilles do homem, não se observaram efeitos da radiação para doses de até 5 kGy. Após a aplicação de doses maiores (até 24 kGy), observaram-se mudanças características. Os dados atestam a estabilidade relativamente alta, do complexo de colágeno do tendão de Achilles em relação à ação da radiação ionizante pelos indicadores estudados, das suas estruturas e propriedades.

3. PROPOSICAO

Este trabalho de pesquisa, se propõe a:

A - Avaliar os aspectos histológico e histoquímico, da gênese e evolução do tecido de granulação induzido experimentalmente, sob a ação de baixas doses de radiação X.

A - 1 - Aspectos qualitativos.

A - 2 - Aspectos quantitativos.

B - Comparar os possíveis efeitos produzidos pela radiação X aplicada em dose única e em dose dividida, com o tecido de granulação não tratado.

4. MATERIAL
E
MÉTODOS

4.1-Animais utilizados

Foram utilizados para este trabalho de pesquisa 73 ratos (*Rattus norvegicus*, *Albinus*, *Wistar*), adultos jovens, com a idade de 120 dias, pesando aproximadamente 200 gramas, oriundos do Biotério Central da UNICAMP. Esses animais permaneceram durante todo o período da pesquisa em gaiolas adequadas, alimentados com ração balanceada padrão e água "ad libitum", diariamente.

4.2-Material utilizado

Para a tricotomia e indução do tecido de granulação na região dorsal mediana dos animais, utilizou-se o seguinte material:

- campânula;
- mesa cirúrgica para ratos;
- tesoura de ponta fina;
- pinças diversas("dente de rato", reta e angulada);
- cabo de bisturi;
- lâminas para bisturi nº.15("steril"), Martin;
- bomba de ar para reanimação;
- etanol absoluto;

- furador de dique de borracha;
- luvas;
- máscaras;
- algodão hidrófilo e gaze esterilizada;
- solução antisséptica(mertiolate incolor);
- éter etílico P.A.;
- recipientes de vidro para acomodação de peças cirúrgicas.

4.3-Tricotomia e Procedimento cirúrgico

Após a anestesia do animal com éter, depilou-se a região dorsal mediana direita, e, a seguir, praticou-se uma incisão de aproximadamente 1,5 cm paralela ao longo eixo da coluna vertebral; nova incisão foi realizada paralelamente à primeira, a uma distância de aproximadamente 0,6 cm. Após este procedimento, as duas incisões iniciais foram unidas em suas extremidades por outras duas incisões. Concluídas as quatro incisões, que, em profundidade, atingiram aproximadamente 2 mm, o tecido foi retirado com o auxílio de pinças e tesoura, proporcionando uma ferida, de aproximadamente um centímetro quadrado. Na base desta ferida podia ser visto tecido muscular e nas bordas da mesma, derme e epiderme. Este procedimento foi realizado em todos os animais.

4.4-Distribuição dos grupos experimentais

Os animais utilizados na experimentação foram identificados por meio de picotes em suas orelhas(na orelha direita e/ou esquerda); numerados de 1(um) a 63(sessenta e três); escolhidos de maneira aleatória. Foram deixados 10(dez) animais para eventual acidente e, conseqüente perda de algum animal. Os 63(sessenta e três)animais foram então divididos em 3(três) grupos, cada um contendo 21(vinte e um) animais.O tempo 0(zero) do experimento foi considerado a partir da abertura da ferida.

A formação dos grupos e tratamentos foi a seguinte:

GRUPO CONTROLE(C): Não foram irradiados.

GRUPO DOSE UNICA(D.U.): Os animais deste grupo experimental, após sofrerem o procedimento cirúrgico, foram tratados da seguinte maneira:

- uma exposição de 4(quatro) segundos;
- 4(quatro) exposições de 3(três) segundos;.
- uma exposição de 2(dois) segundos.

O total de exposição foi de 18(dezoito) segundos, totalizando uma dose de radiação X de aproximadamente 7 R.

GRUPO DOSE DIVIDIDA(D.D.): Os animais deste grupo experimental, após sofrerem o procedimento cirúrgico, foram tratados da seguinte maneira:

-2(duas) exposições de 3(três) segundos, num total de 6(seis) segundos , no tempo 0(zero) do experimento.

-2(duas) exposições de 3(três) segundos, 24(vinte e quatro) horas após o primeiro tratamento, ou seja, no tempo 1(um) do experimento, também num total de 6(seis) segundos.

-2(duas) exposições de 3(três) segundos, 24(vinte e quatro) horas após o segundo tratamento, ou seja, no tempo 2(dois) do experimento.

O total de exposição recebida pelos animais deste grupo experimental foi de 18(dezoito) segundos, totalizando uma dose de radiação X de, aproximadamente, 7 R .

4.5-Equipamento de raios X

Para o tratamento dos animais dos grupos D.U. e D.D. foi utilizado um aparelho de raios X da marca "General Eletric", mo-

delo G.E. 1000, operando com os seguintes fatores: 65 kVp e 10 mA, com distância foco-lesão de 20 cm. No cabeçote do aparelho foi adaptado um colimador, no lugar do cilindro localizador, idealizado pela Disciplina de Radiologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba - UNICAMP. O colimador proporcionou uma distância foco-lesão de 20 cm, com um foco real de 20 mm de diâmetro para essa distância.

4.6-Dose de radiação

4.6.1-Dosimetria

A dosimetria utilizada foi a termoluminescente, com cristais de Fluoreto de Lítio 700 (LiF-700), que foram colocados em íntimo contato com a ferida (lesão) irradiada. Os cristais termoluminescentes de LiF-700 foram preparados da seguinte maneira:

- limpeza dos dosímetros: de acordo com a preconizada para esse tipo de dosímetros, para a eliminação de toda a energia nele acumulada pelo método convencional.
- embalagem dos dosímetros: os dosímetros, após a rigorosa limpeza, foram embalados, dois a dois, em plás-

tico transparente, estando assim protegidos contra qualquer tipo de sujeira e prontos para serem colocados sobre a ferida.

Cada lote, contendo dois cristais fluorescentes de LiF-700, foi colocado em íntimo contato com a ferida(lesão) de cada animal dos grupos tratados (D.U. e D.D.).

Após a sensibilização(irradiação), os dosímetros foram retirados dos invólucros e colocados sobre uma fôrma de alumínio com lotes numerados. Assim, os dosímetros foram levados à estufa onde permaneceram por 15(quinze) minutos, após o que, foram resfriados, e, então, tomadas as leituras dos mesmos.

A leitura da energia acumulada nos cristais de LiF-700 foi realizada pelo sistema de leitura de dosímetros termoluminescentes HARSHAW-2000A e 2000B. Após a leitura dos dosímetros, calculou-se a média de exposição, que foi de aproximadamente 7 R ou 0,07 Gy, dado em função da curva de calibração do aparelho de raios X, realizada com o auxílio do Centro de Engenharia Biomédica da UNICAMP.

4.7-Sacrifício dos animais

Os animais foram sacrificados nos seguintes tempos: 2º. dia, 4º. dia, 7º. dia, 11º. dia, 14º. dia, 21º. dia e 28º. dia a partir do tempo 0(zero).

Para cada tempo, foram sacrificados 03(três) animais de cada grupo experimental; perfazendo o total de 09(nove) animais.

A seguir, promoveu-se a remoção das peças contendo o tecido de granulação e tecido sadio circundante, na mesma profundidade quando da produção da ferida. Após serem removidas, as peças foram lavadas em solução fisiológica e colocadas em solução de formol a 10%, permanecendo ali por um período de 48 horas. Terminado esse período, as peças sofreram o seguinte tratamento:

- lavagem, em água corrente, por 5(cinco) minutos;
- desidratação, em solução de álcool 70%, por 12 horas;
- desidratação, em solução de álcool absoluto, por uma hora, num total de 3(três) trocas;
- diafanização, em solução de xilol, por uma hora, num total de duas trocas;
- 3(três) banhos de parafina, com uma hora cada;
- corte das peças, no micrótomo, com espessura de 5(cinco) micra;
- estufa, a 65°; para secagem;
- coloração pela Hematoxilina-Eosina, impregnação pela prata e reação histoquímica pelo azul de Toluídina ph=4.

4.8-Métodos de exame dos tecidos de granulação

De posse das peças, foram executados cortes histológicos e desses, preparadas as seguintes lâminas para observação:

a)63(sessenta e três) lâminas foram coradas pela técnica que emprega a Hematoxilina--Eosina.

b)63(sessenta e três) lâminas foram submetidas à técnica histofotométrica, para estudos da síntese de mucoplissacarídeos ácidos(glicosaminoglicanas). Utilizando-se dos tecidos já fixados e incluídos, de acordo com a descrição do item anterior, as peças histológicas foram cortadas na espessura de 07 micra. Para a evidênciação histoquímica das glicosaminoglicanas ácidos, foi empregada a técnica metacromática do azul de toluidina, ph=4, segundo indicação de LISON²⁶(1960). Uma vez prontas, as lâminas foram montadas em meio sintético(Balsamo do Canada, CAE-DAX, E. MERCK. DARMSTAD) e levadas ao histofotômetro(Microscope-Photometer Zeiss 01), utilizando-se a objetiva de 40 aumentos e luz monocromática na faixa de 540 milimicrons, como indicado por PEARSE³², em 1968. Todos os pontos do tecido de granulação foram colocados sob medida, realizando-se um total de 30 medidas para cada lâmina examinada; 03 lâminas para cada grupo experimental, para cada dia de evolução do tecido de granulação estudado, de diferentes animais.

c)63(sessenta e três) lâminas foram submetidas à técnica de impregnação pela *Prata*, segundo Gomori (Pearse³², 1968). Estas lâminas foram examinadas pelo método de microscopia de polarização, utilizando-se um microscópio CARL ZEISS 01, sem o analisador, apenas com o uso de filtro polarizador. O dicroísmo linear foi analisado da seguinte maneira:quando as fibras colágenas se encontravam em posição paralela ao plano de luz polarizada, a cor do tecido observado era negra ; quando as fibras colágenas se encontravam em posição perpendicular ao plano de luz polarizada, a cor do tecido observado era vermelha ferrugem.

5. RESULTADOS

DESCRIÇÃO MORFOLOGICA: COLORAÇÃO POR HEMATOXILINA-EOSINA

2o. dia de evolução do tecido de granulação

GRUPO CONTROLE: A área da ferida apresentou-se bastante larga em superfície e recoberta, em toda a sua extensão, por um material necrótico. Abaixo dessa camada, pôde-se observar um infiltrado de células inflamatórias na sua maioria polimorfonucleares neutrófilos, que ocupava toda a extensão da ferida. Logo abaixo destas camadas superficiais, encontrou-se um tecido com aparência edemaciada, contendo esparsas células inflamatórias (neutrófilos, linfócitos e macrófagos). Na área abrangente da ferida, ficou evidente a ausência de fibroblastos, mas nas áreas limitrofes laterais e na profundidade do tecido pôde-se observar a presença de células fibroblásticas e vasos sangüíneos em atividade (Figura 1).

GRUPO DOSE UNICA: A extensão da área da ferida foi semelhante a encontrada no tecido de granulação dos animais do grupo Controle. Cobrindo toda a superfície da ferida, pôde-se ver uma camada de material necrótico e logo abaixo desta, uma camada de células inflamatórias na sua maioria neutrófilos. Mais internamente, ocupando quase toda a área da ferida, observou-se um tecido edemaciado, contendo esparsas células inflamatórias (neutrófilos, linfócitos e macrófagos), não contendo fibroblastos. Apenas nas regiões limitrofes laterais, foi possível se encontrarem células fibroblásticas e vasos sangüíneos em atividade (Figura 2).

GRUPO DOSE DIVIDIDA: A extensão da área da ferida apresentou-se semelhante à encontrada nos demais grupos. A camada superficial necrótica, que nos outros grupos cobria toda a extensão da ferida, neste grupo possuiu espessura bem menor, sendo quase inexistente em alguns pontos. Logo abaixo desta ínfima camada de células necróticas, observou-se uma camada de células inflamatórias, na sua maioria, polimorfonucleares neutrófilos. Abaixo destas camadas superficiais, pôde-se identificar um tecido edemaciado contendo esparsas células inflamatórias(neutrófilos, linfócitos e macrófagos). Células fibroblásticas e vasos sanguíneos eram vistos apenas nas regiões limitrofes laterais.Foi encontrada uma discreta hemorragia, abaixo das camadas superficiais(Figura 3).

A observação microscópica mostrou quase não haver diferença entre os três grupos experimentais para este período do experimento, exceto, em relação ao grupo Dose Dividida, que não possuía a camada superficial necrótica no mesmo estágio que os outros dois grupos experimentais.Neste período de observação, ainda não houve a formação de tecido de granulação.

Figura 1-Controle 2 dias. Coloração H.E. (aun.6,3 x 1,25 x 10).

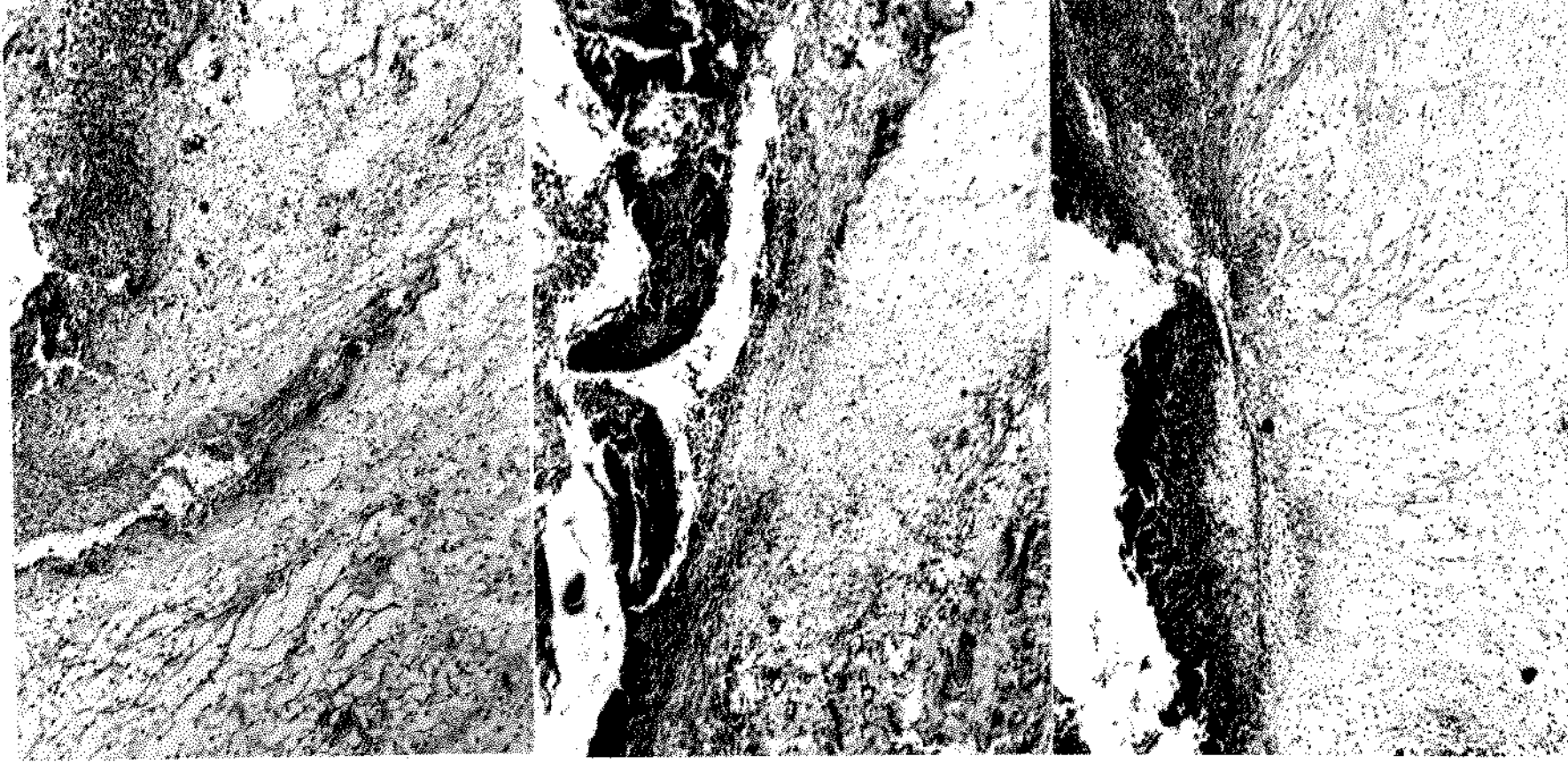
Observa-se a extensão total da área da ferida coberta por um material necrótico. Uma camada subjacente é formada por um infiltrado de células inflamatórias, na sua maioria polimorfonucleares neutrófilos. Abaixo dessas camadas pode ser visto um tecido com aparência edemaciada, contendo esparsas células inflamatórias (neutrófilos, linfócitos e macrófagos).

Figura 2-Dose Única 2 dias. Coloração H.E. (aun.6,3 x 1,25 x 10).

Observa-se a extensão total da área da ferida coberta por um material necrótico. Uma camada subjacente é formada por um infiltrado de células inflamatórias, na sua maioria polimorfonucleares neutrófilos. Abaixo dessas camadas pode ser visto um tecido com aparência edemaciada, contendo esparsas células inflamatórias (neutrófilos, linfócitos e macrófagos).

Figura 3-Dose Dividida 2 dias. Coloração H.E. (aun.6,3 x 1,25 x 10).

Observa-se a extensão total da área da ferida coberta por um material necrótico, de espessura menor do que a encontrada nos outros grupos. Uma camada subjacente é formada por um infiltrado de células inflamatórias, na sua maioria polimorfonucleares neutrófilos. Abaixo dessas camadas pode ser visto um tecido com aparência edemaciada, contendo esparsas células inflamatórias (neutrófilos, linfócitos e macrófagos).



UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

4o. dia de evolução do tecido de granulação

GRUPO CONTROLE: A área da ferida apresentou-se contraída em relação ao período anterior(2º. dia). A camada superficial necrótica(crosta) e a camada de células inflamatórias, na sua maioria neutrófilos, apresentaram-se menos espessas e o número de células diminuído. A observação mais notável, neste período do experimento(4º. dia), foi que na área anteriormente ocupada por um tecido edemaciado com algumas células inflamatórias foi substituído por um tecido de granulação em fase incipiente, constando de proliferação fibroblástica e de células endoteliais(angióblastos), com a consequente neoformação de vasos sanguíneos em grande quantidade. As regiões limítrofes laterais podiam ser vistas com a presença de células fibroblásticas e vasos sanguíneos em atividade, como observado no período anterior.(2º. dia).

GRUPO DOSE ÚNICA: A extensão da área da ferida também apresentava-se contraída em relação ao período anterior(2º. dia), sendo semelhante à contração do grupo controle para este período(4º. dia). Ainda pôde-se observar uma camada superficial necrótica, espessa, sobrepondo a camada de células inflamatórias. na sua maioria polimorfonucleares neutrófilos. Ocupando quase toda a área da ferida, pôde-se ver um tecido de granulação incipiente, substituindo o tecido edemaciado com algumas células inflamatórias, que era visto no período anterior a este(2º. dia). Existia proliferação de células fibroblásticas e endoteliais(angióblas-

tos)___ foi grande o número de vasos sanguíneos neoformados, ocupando esse tecido de granulação incipiente que, diferentemente do que ocorreu nos animais do grupo Controle(4^o. dia), não ocupava a totalidade da área da ferida.

GRUPO DOSE DIVIDIDA: A extensão da área da ferida apresentou-se semelhante ao encontrado nos outros dois grupos experimentais (4^o. dia). A crosta superficial ainda permanecia espessa. Abaixo desta crosta, observou-se a presença de uma camada de células inflamatórias, na sua maioria polimorfonucleares neutrófilos, em quantidade um pouco menor do que a encontrada no período anterior (2^o. dia) para este mesmo grupo experimental. Já era notada a presença de um tecido de granulação incipiente ocupando parte da área da ferida, com evidente proliferação de células fibroblásticas e endoteliais (angioblastos), com a consequente neoformação de vasos sanguíneos em grande número. Como o tecido de granulação incipiente ainda não ocupava toda a área da ferida, ainda havia a presença, em algumas áreas, do tecido edemaciado contendo algumas células inflamatórias (neutrófilos, linfócitos e macrófagos) .

Neste período do experimento, notou - se em todos os grupos experimentais a presença do tecido de granulação, que esteve presente, em menor quantidade, no grupo Dose Dividida, e em maior quantidade, no grupo Controle, ficando o grupo Dose Unica com uma quantidade intermediária entre os

outros dois grupos experimentais. No sentido geral desta análise, o grupo de animais Dose Única esteve atrasado em relação ao grupo Controle, no que concerne à evolução do tecido de granulação, e um pouco mais adiantado, no mesmo âmbito, em relação ao grupo de animais Dose Dividida, que mostrou o maior atraso entre os três grupos experimentais.

7o. dia de evolução do tecido de granulação

GRUPO CONTROLE: A extensão da área da ferida tornou-se mais contraída em relação aos animais do grupo controle (4^o. dia). Pode-se notar ainda, a existência da crosta superficial recobrindo a extensão total da área da ferida. Neste período de evolução, o tecido de granulação já ocupava toda a área da ferida, apresentando um padrão ordenado. Isso porque os feixes de fibras colágenas eram abundantes, apesar de possuírem pequena espessura. Ainda existia grande número de vasos sanguíneos neoformados por toda a extensão do tecido de granulação. Também observou-se neste período do experimento, a evaginação do epitélio que recobria tecido conjuntivo sadio das bordas laterais à ferida, em forma de um fino prolongamento epitelial, que se dirigia à área central da mesma (Figura 4).

GRUPO DOSE UNICA: A extensão da área da ferida neste período estava semelhante a encontrada no grupo de animais Controle (7^o dia). A crosta superficial e a camada de células inflamatórias ainda persistiam. O tecido de granulação já ocupava toda a área da ferida, mas apresentava-se ainda imaturo, como pôde ser visto pela quantidade de fibras colágenas que não era tão abundante como a encontrada nos tecidos de granulação dos animais do grupo Controle. Além da quantidade diminuta, esses feixes de fibras colágenas possuíam pequena espessura. O epitélio, que recobria tecido conjuntivo sadio nas bordas da ferida começou a se evaginar em direção ao centro da ferida, como um delgado prolongamento epitelial. (Figura 5).

GRUPO DOSE DIVIDIDA: A extensão da área da ferida foi semelhante àquela encontrada nos outros grupos experimentais. A crosta superficial e a camada de células inflamatórias, que nos outros dois grupos não se apresentavam tão espessas, neste grupo ainda apresentou espessura semelhante àquela encontrada no período anterior. O tecido de granulação, que já ocupava toda a área da ferida, mostrou-se menos evoluído, principalmente em relação ao grupo Controle, que pode ser notado, devido, principalmente, à pequena quantidade de fibras colágenas presentes e à pouca espessura das mesmas. Ainda não existia tecido epitelial sobre a área da ferida. (Figura 6)

Foi observado para este 7º. dia de evolução do tecido de granulação, que o grupo Dose Dividida apresentou atraso significativo em relação ao grupo Controle e um pequeno atraso em relação ao grupo Dose Unica. Também observou-se um pequeno atraso na evolução do tecido de granulação do grupo Dose Unica em relação ao grupo Controle. Esse atraso observado foi tanto em relação ao tecido epitelial quanto em relação a quantidade de fibras colágenas presentes.

Figura 4-Controle 7 dias.Coloração H.E.(aum.6,3 x 1,25 x 10).

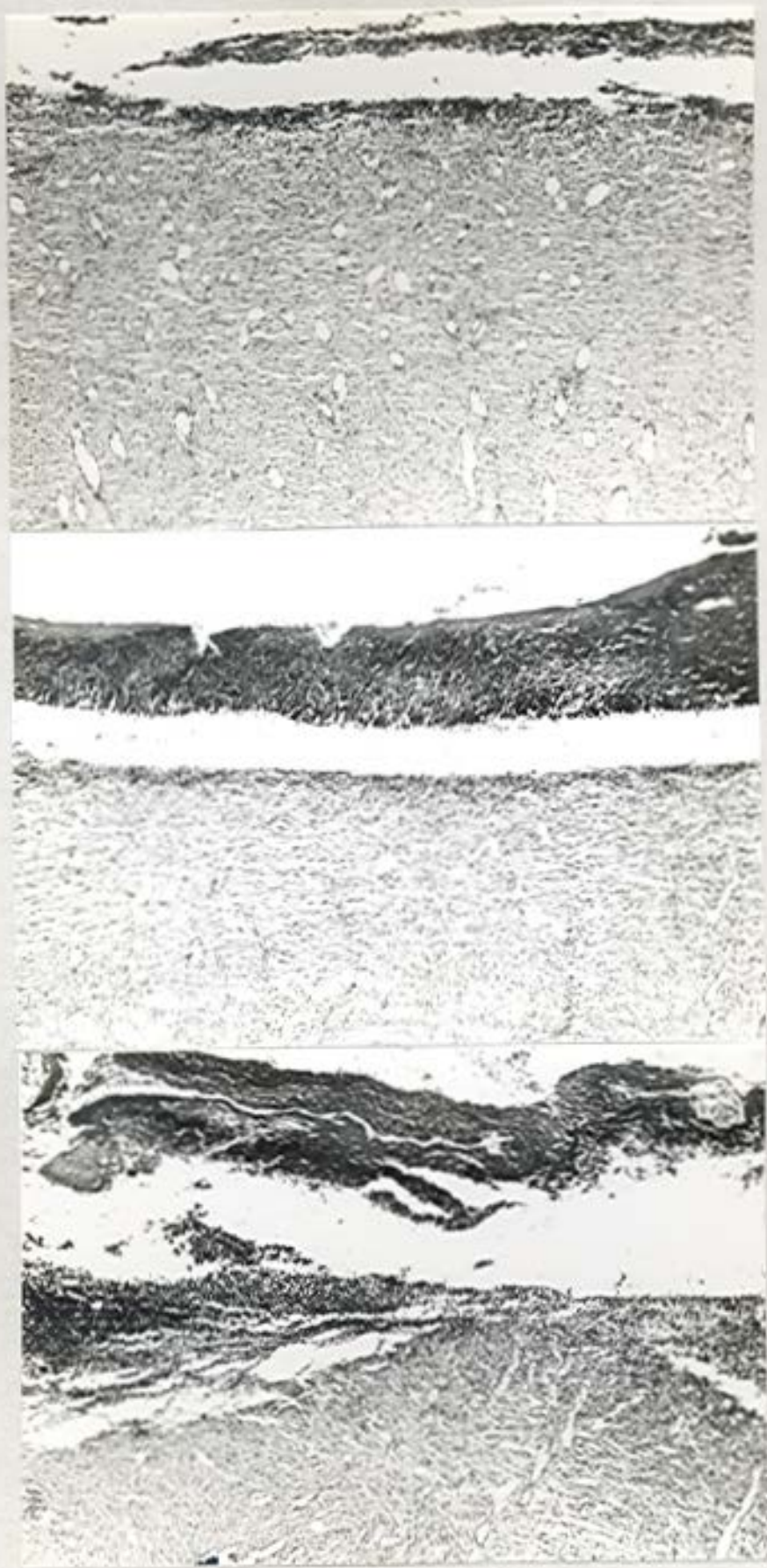
Observa-se ainda, a presença da crosta cobrindo toda a extensão da área da ferida juntamente com a camada de células inflamatórias. Já pode ser visto um tecido de granulação ocupando toda a área da ferida, apresentando um padrão ordenado. O número de vasos sanguíneos neoformados ainda é grande, ocupando toda a extensão do tecido.

Figura 5-Dose Única 7 dias.Coloração H.E.(aum.6,3 x 1,25 x 10).

Observa-se ainda, a presença da crosta cobrindo toda a extensão da área da ferida juntamente com a camada de células inflamatórias. O tecido de granulação já pode ser visto ocupando toda a área da ferida, mas apresenta-se ainda inaturo, como pode ser visto pelo reduzido número e espessura de fibras colágenas em relação ao grupo Controle.

Figura 6-Dose Dividida 7 dias.Coloração H.E.(aum.6,3 x 1,25 x 10).

Observa-se ainda, a presença da crosta cobrindo toda a extensão da área da ferida juntamente com a camada de células inflamatórias, mas a espessura dessas camadas é maior do que a espessura dos outros dois grupos. O tecido de granulação que já ocupa toda a extensão da área da ferida, ainda mostra-se envolvido em relação aos outros grupos, principalmente em relação à quantidade-espessura de fibras colágenas



11o. dia de evolução do tecido de granulação

GRUPO CONTROLE: Neste período, a extensão da área da ferida apresentou-se consideravelmente reduzida, em relação ao Grupo Controle do período anterior (7º dia). Pôde-se observar que a crosta superficial e a camada de células inflamatórias já não existiam mais, sendo que o tecido epitelial, que emigrou das bordas da ferida, cobria toda a sua extensão. Esse tecido epitelial apresentou-se mais espesso do que o tecido epitelial que recobria tecido conjuntivo sadio das regiões laterais da ferida, e também já produzia queratina (função normal do epitélio). O tecido de granulação, que já ocupava toda a área da ferida apresentava-se bastante fibroso, havendo a consequente diminuição do número de células fibroblásticas. Os vasos sanguíneos neoformados, que eram abundantes no período anterior, neste período apresentavam-se em pequeno número, sendo superados pelos vasos sanguíneos em atividade.

GRUPO DOSE ÚNICA: A extensão da área da ferida foi muito semelhante à encontrada nos animais do grupo Controle (11º dia). As camadas superficiais, necrótica e de células inflamatórias já não existiam mais, sendo que o tecido epitelial recobriu toda a área da ferida, apresentando-se mais espesso do que o epitélio, que recobriu tecido conjuntivo sadio, sendo que também houve produção de queratina.

O tecido de granulação, que ocupava toda a área da ferida, mostrou-se bem fibrosado, com pequeno número de células fibroblásticas. Os vasos sanguíneos neoformados apareciam em pequeno número, sendo superados pelos vasos sanguíneos em atividade.

GRUPO DOSE DIVIDIDA: A contração da área da ferida foi semelhante à encontrada nos outros dois grupos experimentais(11^o. dia). Ainda persistiam restos necróticos localizados sobre o epitélio, sendo que este já recobria toda a extensão da área da ferida. Como nos outros grupos, o epitélio apresentou-se mais espesso do que aquele que recobria tecido conjuntivo sadio, e também já produzia queratina(mostrando função normal do epitélio), mas em quantidade inferior a queratina produzida pelos demais grupos experimentais.

Foi observado que a camada de células inflamatórias, embora em pequena quantidade, ainda existia sobre o tecido epitelial, formada principalmente por células redondas(não neutrófilos).

O tecido de granulação apresentou-se bem fibrosado, havendo pequena quantidade de células fibroblásticas, e também de vasos sanguíneos neoformados.

No 11^o. dia de evolução do tecido de granulação, pôde-se notar que o tecido do grupo Dose Unica foi muito semelhante ao do grupo Controle, em todos os aspectos. Já o grupo de animais Dose Dividida mostrou-se ainda com algum atraso, no que tange à inflamação da ferida, mostrando-se semelhante aos demais grupos de animais, em relação à gênese e evolução do tecido de granulação.

14o. dia de evolução do tecido de granulação

GRUPO CONTROLE: A área da ferida apresentou-se ainda mais contraída em relação aos animais do grupo Controle(11^o. dia). O tecido de granulação também apresentou-se mais fibroso em relação ao período anterior (11^o. dia), e, já iniciou-se a invasão dos anexos da pele. No entanto, os feixes de fibras colágenas do tecido de granulação ainda apresentavam-se com menor espessura em relação aos feixes de fibras colágenas do tecido conjuntivo sadio lateral. O epitélio, que recobria toda a extensão da área da ferida, diminuiu a sua espessura em relação ao período anterior(11^o. dia), mas, ainda apresentou-se mais espesso do que o epitélio normal; a produção de queratina ainda era evidente(Figura 7).

GRUPO DOSE UNICA: A área da ferida apresentou-se ainda mais contraída em relação ao período anterior (11^o. dia). O tecido de granulação, também em relação ao período anterior, esteve bem mais fibrosado, e, já havia a invasão dos anexos da pele. Os feixes de fibras colágenas ainda permaneciam com espessura menor, em relação ao tecido conjuntivo sadio lateral à ferida. O epitélio apresentou-se com espessura mais reduzida, mas, ainda maior do que o epitélio normal ; a produção de queratina continuou(Figura 8).

GRUPO DOSE DIVIDIDA: A ferida apresentou contração ainda maior em relação ao 11º dia, para o mesmo grupo experimental. O tecido de granulação também foi mais fibroso, e, já começava a ser invadido pelos anexos da pele; os feixes de fibras colágenas apresentaram-se menos espessos do que os feixes do tecido conjuntivo lateral sadio.

O tecido epitelial, que recobriu a ferida, já não foi tão espesso quanto nos períodos anteriores a este, mas, ainda apresentou-se com espessura maior do que nos outros dois grupos experimentais, e, por conseguinte, mais espesso do que o tecido epitelial que recobriu o tecido conjuntivo sadio lateral (Figura 9).

Em resumo, o grupo de animais Dose Única apresentou-se muito semelhante ao grupo de animais Controle em todos os aspectos da gênese e evolução do tecido de granulação. Já o grupo de animais Dose Dividida continuou a mostrar atraso em relação aos outros dois grupos experimentais, atraso este, não tão grande quanto o visto nos períodos anteriores.

cido mostra-se afetado em relação aos outros dois grupos.
 período anterior, o contraste da ferida é evidente. Este te-
 lenço da ferida apresenta espessura reduzida em relação ao
 cido conjuntivo normal. O epitélio que já recobre toda a ex-
 tensão ainda apresenta espessura reduzida em relação ao te-
 lenço de tecido conjuntivo normal, porém os feixes de fibras colá-
 geônicas ainda apresentam espessura reduzida em relação ao

Figura 3 - Dose única 14 dias. Coloração H.E. (ampl. 6,3 x 1,25 x 10).

evidente.
 ao período anterior de observação. A extensão da ferida é
 extensão da ferida apresenta espessura reduzida em relação
 tecido conjuntivo normal. O epitélio que já recobre toda a
 extensão ainda apresenta espessura reduzida em relação ao
 tecido conjuntivo normal, porém os feixes de fibras
 O tecido de granulação apresenta-se mais fibroso e já ocor-

Figura 4 - Dose única 14 dias. Coloração H.E. (ampl. 6,3 x 1,25 x 10).

evidente.
 ao período anterior de observação. A extensão da ferida é
 extensão da ferida apresenta espessura reduzida em relação
 tecido conjuntivo normal. O epitélio que já recobre toda a
 extensão ainda apresenta espessura reduzida em relação ao
 tecido conjuntivo normal, porém os feixes de fibras
 O tecido de granulação apresenta-se mais fibroso e já ocor-

Figura 5 - Controle 14 dias. Coloração H.E. (ampl. 6,3 x 1,25 x 10).



21o. dia de evolução do tecido de granulação

GRUPO CONTROLE: A contração da área da ferida foi ainda maior em relação ao período anterior (14^o. dia) , para este grupo de animais. A espessura do tecido epitelial já era muito semelhante a do tecido epitelial que revestia o tecido conjuntivo sadio lateral e mostrava continuidade na produção de queratina. Os feixes de fibras colágenas do tecido de granulação apresentaram-se mais espessos do que no período anterior, embora ainda suas espessuras fossem menores do que os feixes encontrados no tecido conjuntivo normal lateral. A invasão dos anexos da pele foi bem maior neste período, mostrando, assim, o grau de evolução desse tecido(Figura 10).

GRUPO DOSE UNICA: A extensão da área da ferida foi semelhante a encontrada no grupo de animais Controle (21^o. dia). Também há semelhança em relação a espessura dos feixes de fibras colágenas, que se apresentaram mais espessos do que no período anterior, mas ainda menos espessos do que os feixes de fibras colágenas encontrados no tecido conjuntivo sadio lateral. O tecido epitelial, que recobria toda a extensão da área da ferida, ainda apresentou-se mais espesso , mas com a sua espessura diminuída em relação ao mesmo, no período anterior (Figura 11).

GRUPO DOSE DIVIDIDA: Houve uma maior contração da área da ferida em relação ao período anterior (14^o. dia). A diferença da espessura do epitélio, que recobria a área da ferida, em relação ao epitélio, que recobria tecido conjuntivo sadio lateral, foi mínima. A espessura dos feixes de fibras colágenas ainda foi menor, em relação aos animais do grupo Controle (21^o. dia), embora fossem mais espessos em relação ao período anterior (14^o. dia) para este mesmo grupo de animais. A invasão dos anexos da pele foi maior em relação ao período anterior (14^o. dia), para este mesmo grupo (Figura 12).

Neste período do experimento, existiu pouca diferença morfológica entre os três grupos experimentais estudados, sendo que o grupo de animais Dose Dividida, em uma análise mais rigorosa da gênese e evolução do tecido de granulação, ainda apresentou um pequeno atraso, principalmente, no que concerne à espessura das fibras colágenas, que ainda apresentou-se menor em relação aos outros grupos experimentais.

anterior a este.

anexos da pele é maior do que o verificado no período mais elevados do que no período anterior. A invasão das ventas espessura menor do que os feixes do grupo Controle, xmas do normal. Os feixes de fibras colágenas ainda apare- ao período anterior. A espessura do epitélio já está pró - A contração da área da ferida foi ainda maior em relação

Figura 12-Doce dias 21 dias, Coloração H.E. (am. 6,3 x 1,25 x 10).

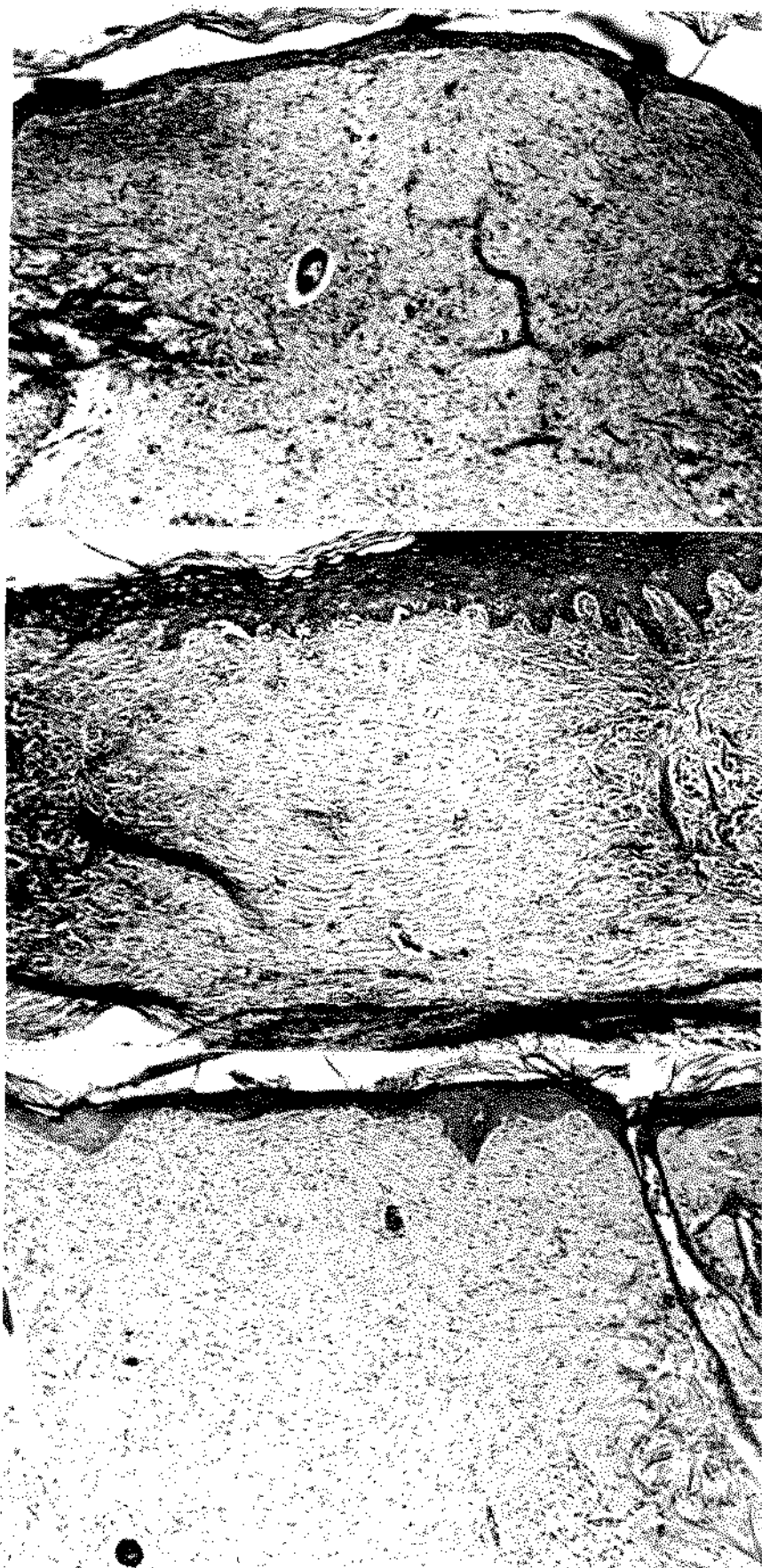
com o grupo Controle.

anexos da pele. Há muita semelhança de fibras colágenas é maior mas ainda não é normal. Também a produção de queratina prossegue. A espessura dos feixes espessura muito semelhante a do tecido conjuntivo normal e ao período anterior. O tecido epitelial já se apresenta com A contração da área da ferida foi ainda maior em relação

Figura 11-Doce dias 21 dias, Coloração H.E. (am. 6,3 x 1,25 x 10).

anexos da pele, de fibras colágenas é maior mas ainda não é normal. Também a produção de queratina prossegue. A espessura dos feixes espessura muito semelhante a do tecido conjuntivo normal e ao período anterior. O tecido epitelial já se apresenta com A contração da área da ferida foi ainda maior em relação

Figura 10-Controle 21 dias, Coloração H.E. (am. 6,3 x 1,25 x 10).



28o. dia de evolução do tecido de granulação

GRUPO CONTROLE: A extensão da área da ferida encontrou-se muito pequena, havendo a quase total contração da mesma. O tecido de granulação da área da ferida apresentou-se quase que totalmente maduro, inclusive em relação ao calibre dos feixes de fibras colágenas, que atingiram o mesmo calibre dos feixes de fibras colágenas do tecido conjuntivo lateral sadio. Este tecido, só não apresentou-se totalmente maduro, devido aos anexos da pele não ocuparem toda a extensão do mesmo (Figura 13).

GRUPO DOSE ÚNICA: A extensão da área da ferida foi muito pequena, semelhante ao grupo de animais Controle, havendo a quase total regeneração da mesma. O calibre dos feixes de fibras colágenas do tecido de granulação já atingiu, para este período, o mesmo calibre dos feixes de fibras colágenas do tecido conjuntivo lateral sadio. Em geral, apresentou-se quase que totalmente maduro, faltando apenas o preenchimento por completo do tecido pelos anexos da pele, que já eram abundantes neste período do experimento. Este tecido foi muito semelhante ao tecido estudado nos animais do Grupo Controle, em todos os aspectos, para este período de evolução do tecido de granulação (Figura 14).

GRUPO DOSE DIVIDIDA: A extensão da área da ferida também foi muito pequena para este grupo de animais, sendo que um dos animais apresentou a ferida completamente fechada. Apesar disto, o calibre dos feixes de fibras colágenas ainda permaneceram com espessura menor, em relação ao calibre dos feixes de fibras colágenas do tecido conjuntivo lateral sadio, mostrando assim, não estar no mesmo grau de evolução do tecido de granulação dos outros dois grupos experimentais. Os anexos da pele também ocuparam a quase totalidade do tecido, mostrando aspectos de tecido maduro (Figura 15).

Neste período de evolução do tecido de granulação, os grupos de animais Controle e Dose Unica praticamente atingiram o mesmo nível de evolução morfológica. O grupo de animais Dose Dividida apresentou um ligeiro atraso em relação aos outros dois grupos, principalmente em relação ao calibre dos feixes de fibras colágenas, sendo esta diferença mínima.

Figura 13-Controle 28 dias. Coloração H.E. (aun. 6,3 x 1,25 x 10).

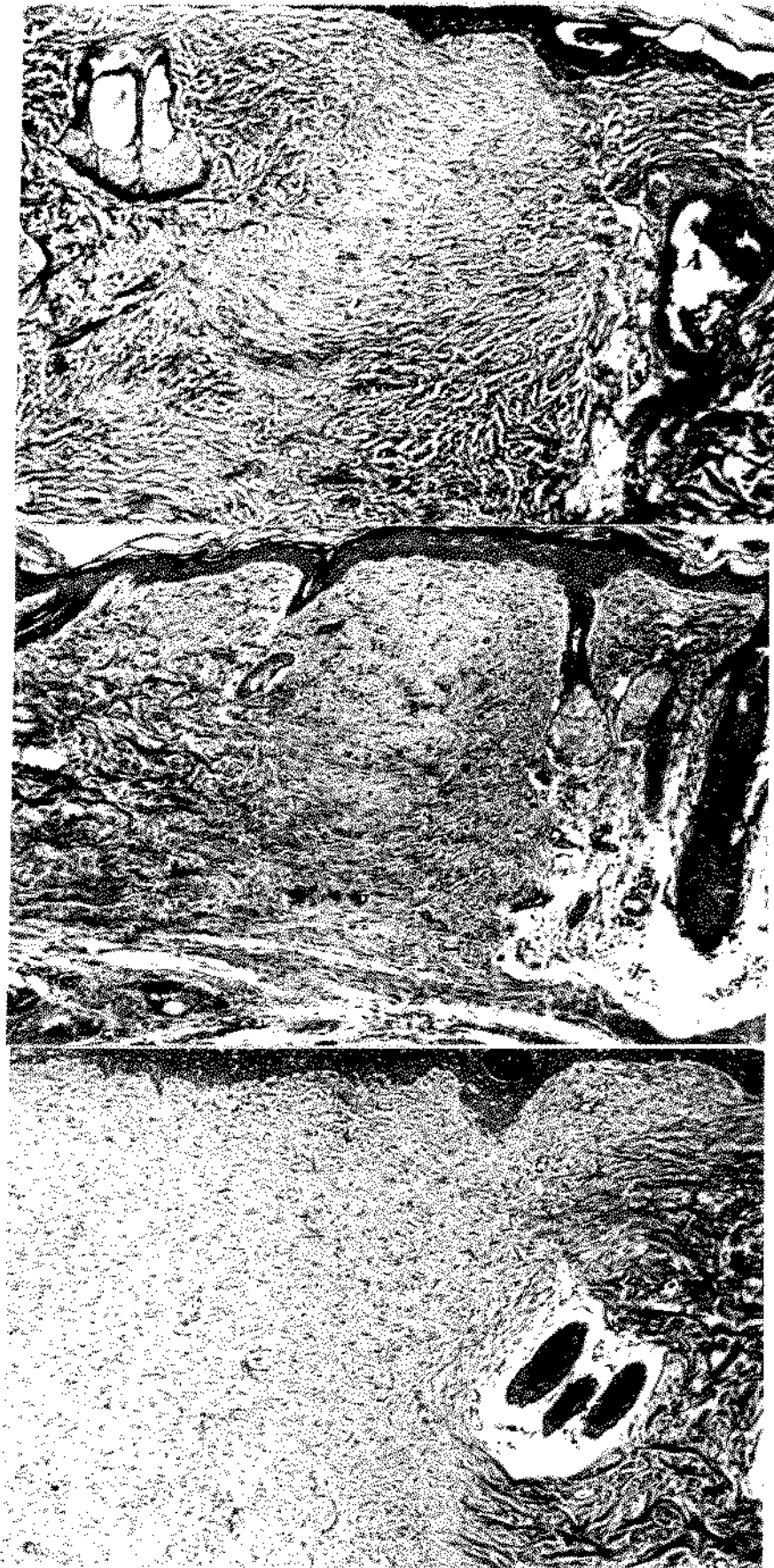
A contração da ferida já é quase total. O tecido de granulação está quase totalmente maduro, principalmente em relação ao calibre dos feixes de fibras colágenas. A maturidade do tecido só não é total devido aos anexos da pele não ocuparem toda a extensão da ferida.

Figura 14-Controle 28 dias. Coloração H.E. (aun. 6,3 x 1,25 x 10).

A contração da ferida já é quase total. O tecido de granulação está quase totalmente maduro, principalmente em relação ao calibre dos feixes de fibras colágenas. A maturidade do tecido só não é total devido aos anexos da pele não ocuparem toda a extensão da ferida. Este tecido apresenta-se muito semelhante ao tecido de granulação Controle.

Figura 15-Dose Dividida 15 dias. Coloração H.E. (aun. 6,3 x 1,25 x 10).

A contração da área da ferida também já é quase total. Apesar disso os feixes de fibras colágenas ainda apresentam calibre diminuído em relação aos feixes de fibras colágenas dos animais Controle. Os anexos da pele ainda não ocupam a totalidade da área da ferida.



IMPREGNAÇÃO PELA PRATA

O exame microscópico das lâminas dos tecidos de granulação dos três grupos experimentais, sob luz polarizada, mostrou que todos eles exibiram dicroísmo linear nas fibras de colágeno, a partir do período de 7 (sete) dias de evolução dos tecidos de granulação, quando os mesmos começaram a exibir certa organização macromolecular entre as fibras de colágeno e as glicosaminoglicanas de agregação. O dicroísmo se tornou mais evidente nos tecidos de granulação mais antigos, nos três grupos experimentais.

REAÇÃO HISTOQUÍMICA PELO AZUL DE TOLUIDINA PH=4

Técnica histofotométrica para estudos das glicosaminoglicanas.

Tratamento estatístico dos dados

Com base nos dados obtidos pela leitura das lâminas, utilizando-se a técnica histofotométrica para estudos das glicosaminoglicanas, foram calculadas as médias por grupos e dias de evolução do tecido de granulação, conforme mostra a Tabela I.

TABELA I = Médias dos dados originais das leituras histofotométricas por grupos e dias de sacrifícios dos animais experimentais.

* dias de * sacrifício *	! grupos !	C	DU	DD
2 dias	!	0,016	0,012	0,015
	!	0,015	0,014	0,017
	!	0,018	0,011	0,009
médias	!	0,016	0,012	0,014
4 dias	!	0,034	0,015	0,023
	!	0,037	0,030	0,032
	!	0,016	0,040	0,041
médias	!	0,029	0,028	0,032
7 dias	!	0,053	0,075	0,053
	!	0,064	0,061	0,051
	!	0,049	0,052	0,043
médias	!	0,055	0,063	0,049
11 dias	!	0,042	0,054	0,056
	!	0,055	0,040	0,034
	!	0,051	0,012	0,026
médias	!	0,049	0,035	0,039
14 dias	!	0,038	0,027	0,035
	!	0,030	0,037	0,025
	!	0,017	0,038	0,020
médias	!	0,028	0,034	0,027
21 dias	!	0,028	0,038	0,033
	!	0,032	0,028	0,019
	!	0,021	0,042	0,049
médias	!	0,027	0,036	0,034
28 dias	!	0,033	0,041	0,019
	!	0,020	0,026	0,023
	!	0,020	0,020	0,025
médias	!	0,024	0,029	0,022

Na Tabela II, são apresentadas as médias dos dados originais, agrupadas de maneira propícia à execução do tratamento estatístico, realizado por computador.

TABELA II-Médias dos dados originais das leituras histofotométricas dos glicosaminoglicans, agrupados de maneira propícia para o tratamento estatístico.

0,016	0,015	0,018	0,012	0,014	0,011	0,015	0,017
0,009	0,034	0,037	0,016	0,015	0,030	0,040	0,023
0,032	0,041	0,053	0,064	0,049	0,075	0,061	0,052
0,053	0,051	0,043	0,042	0,055	0,051	0,054	0,040
0,012	0,056	0,034	0,026	0,038	0,030	0,017	0,027
0,037	0,038	0,035	0,025	0,020	0,028	0,032	0,021
0,038	0,028	0,042	0,033	0,019	0,049	0,033	0,020
0,020	0,041	0,026	0,020	0,019	0,023	0,025	

Na sequência, os dados da Tabela II foram submetidos a estudos preliminares para a análise dos parâmetros amostrais, distribuição de frequências, teste de aderência à curva normal, percentuais acumulados de frequências, histograma, e percentuais acumulados de frequências (curva aritmético-normal) como mostram, respectivamente, os Quadros AI, AII, AIII ; e as Figuras A-1, A-2, e A-3 (Apêndice).

A seguir, procedeu-se à análise de variância utilizando-se também os dados da Tabela II, conforme mostra o Quadro I. Através desta análise, pôde-se chegar ao valor de "F" igual a 15,60 para blocos (dias), que é significativa ao nível de 1% de probabilidade, o que significa que há pelo menos duas médias diferentes

entre si ; e ao valor de "F" igual a 0,53 para tratamentos, sendo este valor não significante.

QUADRO I-Análise de variância das médias dos dados originais contidos na Tabela II.

Fonte variação	Soma Quadr.	G.L.	Quadr.Médios	(F)	Prob.(H0).
Entre linhas	0.0092	6	0,0015	15.6	0.0000% .
Entre colunas	0.0001	2	0.0001	0.53	39.977% .
Interação L x C	0.0008	12	0.0001	0.71	26.816% .
Resíduo	0.0041	42	0.0001		
Variação total	0.0142	62			

Para determinar-se quais as médias significantemente diferentes entre si, submeteram-se as mesmas ao teste de "Tukey", como pode ser visto no quadro II.

QUADRO II - Médias calculadas para o teste de Tukey, segundo dados da Tabela II.

:	:		
:	Fator de variaco:grupos	:	
:	:	:	
:	Controle	: 3.280952E-02	:
:	Dose nica	: 3.395238E-02	:
:	Dose dividida	: 3.085715E-02	:
:	:	:	:
:	Fator de variao:Tempos	:	:
:	:	:	:
:	02 dias	: 1.411111E-02	:
:	04 dias	: 2.977776E-02	:
:	07 dias	: 5.566667E-02	:
:	11 dias	: 4.111111E-02	:
:	14 dias	: 2.966667E-02	:
:	21 dias	: 3.222222E-02	:
:	28 dias	: 2.522222E-02	:
:	:	:	:
:	Interao:Tempos x grupos	:	:
:	:	:	:
:	02 dias x Controle	: 1.633333E-02	:
:	02 dias x Dose nica	: 1.233333E-02	:
:	02 dias x Dose dividida	: 1.366667E-02	:
:	04 dias x Controle	: .029	:
:	04 dias x Dose nica	: 2.833333E-02	:
:	04 dias x Dose dividida	: .032	:
:	07 dias x Controle	: 5.533333E-02	:
:	07 dias x Dose nica	: 6.266667E-02	:
:	07 dias x Dose dividida	: .049	:
:	11 dias x Controle	: 4.933334E-02	:
:	11 dias x Dose nica	: 3.533333E-02	:
:	11 dias x Dose dividida	: 3.866667E-02	:
:	14 dias x Controle	: 2.833333E-02	:
:	14 dias x Dose única	: .034	:
:	14 dias x Dose dividida	: 2.666667E-02	:
:	21 dias x Controle	: .027	:
:	21 dias x Dose única	: .036	:
:	21 dias x Dose dividida	: 3.366667E-02	:
:	28 dias x Controle	: 2.433333E-02	:
:	28 dias x Dose única	: .029	:
:	28 dias x Dose dividida	: 2.233333E-02	:
:	:	:	:

Dando sequência à análise, foi calculada a diferença mínima significativa(d.m.s.), entre as médias encontradas no teste de Tukey, chegando-se então ao valor de 0,0164. Com a diferença mínima significativa em mãos, pudemos obter os seguintes resultados:

-a média encontrada para o 7^o. dia de evolução do tecido de granulação foi igual à média encontrada para o 11^o. dia e diferente das demais médias.

-a média encontrada para o 11^o. dia de evolução do tecido de granulação foi igual às médias encontradas para os 4^o., 14^o., 21^o. e 28^o. dias , sendo apenas diferente da média encontrada para o 2^o. dia.

-a média encontrada para o 21^o. dia de evolução do tecido de granulação foi igual às médias encontradas para os 4^o., 14^o. e 28^o. dias , apenas diferindo da média encontrada para o 2^o. dia.

-já as médias encontradas para os 2^o., 4^o. e 28^o. dias de evolução do tecido de granulação foram iguais entre si.

Para melhor se observar estas diferenças, foi feito o gráfico em barras, contido na Figura 16, devendo-se levar em consideração a d.m.s. de 0.0164.

Medias do Teste de Tukey

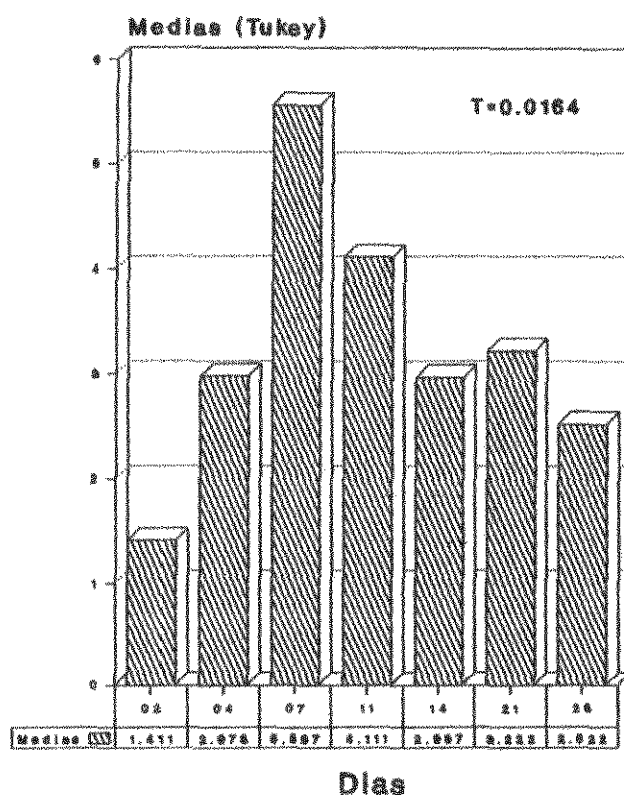


FIGURA 16-Médias calculadas pelo teste de Tukey para os respectivos dias de sacrifício dos animais experimentais, observando-se a d.m.s. de 0.0164.

Também com a utilização das médias dos dados originais, encontradas na Tabela II, foi possível obter-se a equação da curva mais propícia para se evidenciarem os resultados encontrados. A observação do valor de "r" (coeficiente de correlação) obtido para cada grupo experimental resultou nos Quadros A-IV, A-V e A-VI,

que evidenciaram ser a regressão de ordem (4), a melhor curva para a apresentação dos resultados de maneira gráfica, como mostram as Figuras A-4, A-5, e A-6(Apêndice). A Figura 17 apresenta os mesmos resultados, mas com uma visão em conjunto das médias encontradas das leituras histofotométricas para as repetições de cada grupo experimental, nos diferentes dias de sacrifício.

Medias das Leituras de GAGs

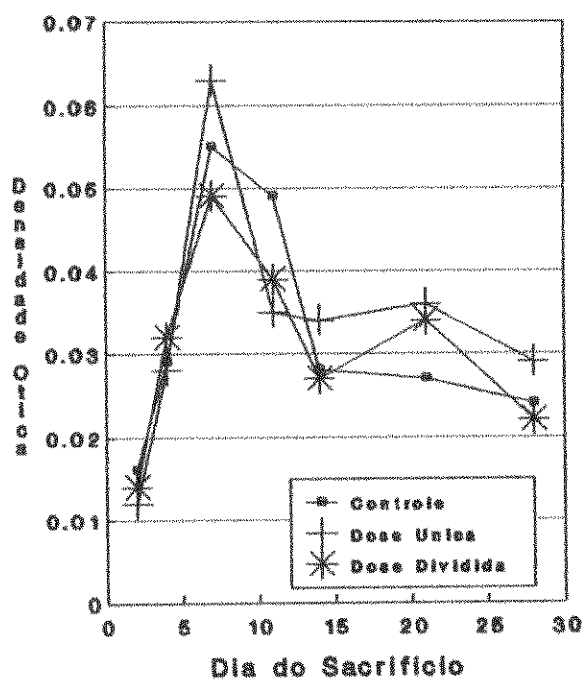


FIGURA 17-Médias dos dados originais, por dias de sacrifício, dos três grupos de animais experimentais.

6. DISCUSSAO

Uma serie de fatores estão envolvidos no processo de reparação de um organismo , onde podemos citar a espécie animal , a idade, a nutrição , o tipo de tecido a reparar, a presença ou não de determinado estímulo injuriante e outros. De acordo com o enfoque de VANE & FERREIRA⁴⁸(1979), a reação de defesa a determinado agente agressor inicia-se com a resposta vascular. Durante essa fase exsudativa-vascular, o aumento da permeabilidade das paredes dos vasos sangüíneos , a vaso-dilatação, a exsudação de fluidos e a leucodiapedese trazem elementos plasmáticos que podem facilitar a atividade das células fagocitárias , e também contribuem para diluir ou neutralizar as substâncias tóxicas ou líticas, que advêm do estímulo injuriante, podendo também serem liberadas por esse estímulo. Quando a defesa celular estimula o processo, ocorre a remoção do agente agressor e dos restos celulares. Caso não ocorra a perda tecidual, haverá restauração total. Mas, caso ocorra uma perda considerável de estrutura tecidual, esta vêm a ser substituída por um tecido cicatricial, que geralmente impede o desenvolvimento funcional.

O ato cirúrgico realizado neste trabalho e suas consequências estão totalmente de acordo com as afirmativas feitas por VANE & FERREIRA⁴⁸ (1979), que experimentalmente, produziu um blastema de reparo ou tecido de granulação, que veio a oferecer um modelo experimental propício ao estudo da sensibilidade desse tecido e seus elementos, à exposição a radiação X, conforme já havia relatado DOTTO, et al¹⁵ (1970).

6.1-Coloração por H.E.

A coloração dos tecidos pela Hematoxilina-Eosina proporcionou um minucioso exame a nível histológico. Essa observação microscópica da fase exsudativa-vascular evidenciou mudanças para períodos tão precoces quanto dois dias pós - cirúrgico.

Nas primeiras horas e dias, em todos os grupos experimentais, iniciaram-se os processos de necrose e inflamação ao redor da ferida, suportados pelo suprimento sangüíneo das bordas e base do ferimento. A irradiação administrada nas primeiras 48 horas pós-ferimento, provavelmente, afetou o sistema vascular, parecendo assim haver um fator quantitativo e não qualitativo em relação à dosagem de radiação administrada. Isto está de acordo com os achados de autores como ARLASHCHENKO⁴ (1981) e REINHOLD³⁴(1974), apesar destes autores terem utilizado doses acima de 700 R.

Já, JOVANOVIĆ²⁴(1974) mostrou que a divisão da dose de radiação em duas frações iguais, separadas por um intervalo de tempo de 24 horas, resultou em uma menor incidência e reações menos severas nos capilares durante o período total pós-irradiação, o que foi contrário aos nossos achados. Porém, o autor utilizou-se de uma dose de radiação de 410 R, sendo quase 60 vezes acima da dose utilizada neste trabalho. Além disso, esse efeito pode ter variado também em relação à fase de irradiação do processo.

A alteração citada acima, que ocorreu em um período tão precoce, foi explicada por MOORE²⁹ (1984) , afirmando que quando a irradiação é aplicada sobre o ferimento, o retardo mais severo no processo de cicatrização ocorre quando a dose foi administrada alguns dias pós o ferimento. Cessado esse período de extrema sensibilidade, ocorre um progressivo desenvolvimento da resistência do tecido aos raios X. Ainda segundo esse autor, o período de extrema sensibilidade corresponde ao tempo da mais rápida proliferação dos componentes do tecido vaso -conjuntivo, correspondentes às primeiras 48 horas. Segundo vários autores como GRILLO & POTSAID²⁰(1961), GRILLO¹⁹(1963), DMITRIEVA¹²(1967), BAILEY⁵ (1968) e VAN DEN BRENK & STONE^{46,47} (1974), esses são componentes extremamente radiosensitivos, principalmente nesse período de 48 horas pós-ferimento.

Os nossos achados estão em contrariedade às afirmações de GUIDUGLI NETO²¹ de que pequenas doses de radiação seriam estimulantes ao processo de reparo, mas por outro lado, estão também em concordância com seus achados sobre alterações vasculares não significantes; há uma diferença fundamental entre as duas pesquisas, que foi o período de irradiação, que no caso de GUIDUGLI NETO²¹ foi após seis dias do procedimento cirúrgico.

Neste trabalho de pesquisa, a exposição do ferimento aos raios X, imediatamente após a produção do mesmo, presumivelmente anterior ao início da proliferação celular no grupo de animais Dose Única, causou um pequeno efeito sobre a cicatrização da ferida. Quando a radiação X foi administrada posteriormente ao ferimento (D.D.) , houve um evidente atraso de toda

a fase exsudativa-vascular do processo de cicatrização, período esse de ativa proliferação celular. Uma possível hipótese seria que a inibição da atividade das feridas constatadas nos animais do grupo D.D., poderia ser atribuída a um efeito direto dos raios X sobre os fibroblastos, assim como relatado por BRYANT, SLESH e WEEKS⁷. O tamanho desse efeito pareceu ser proporcional à dose de radiação X, vindo ao encontro dos resultados de MOORE²⁹(1984), apesar do autor ter utilizado uma dose de radiação de 300 rads.

A relativa sequência entre o ferimento e a irradiação é decisiva na produção do dano. No caso do grupo de animais D.D., o atraso do processo de cicatrização foi evidente desde períodos tão precoces quanto dois dias pós-ferimento até, praticamente, o período final de observação, quando a diferença entre os grupos era mínima, mas ainda existente, principalmente para o grupo D.D.. O tecido de granulação iniciou o seu crescimento a partir do 30.^o - 40.^o dia pós - ferimento, fato este que está totalmente de acordo com VIZIOLI & ALMEIDA⁵¹(1978); ANDRADE²(1980) e ABDALLA¹(1988). Nesse período, também foi evidente o atraso da gênese do tecido de granulação dos animais do grupo D. D., principalmente em relação ao grupo de animais Controle, voltando-se a frizar que esse atraso deve ser relativo à irradiação da fase ativa de proliferação celular. O colágeno presente também mostrou-se diminuído. NIMNI, LYONS e BAVETTA³¹ atribuíram essa diminuição a mudança no padrão da síntese, que não pudemos observar.

Já o pequeno atraso da gênese do tecido de granulação dos

animais Dose Unica, provavelmente, pode ser explicado devido aos efeitos da irradiação sobre os componentes radiosensitivos (vasos sanguíneos e fibroblastos) das bordas e base da ferida. Foram expostas à radiação X as células e tecido vaso - conjuntivo, de onde ocorreram as prováveis migrações de células fibroblásticas e elementos sanguíneos para o interior da ferida. Esse fato foi observado durante o exame microscópico dos tecidos, nos primeiros dias de estudo, onde células fibroblásticas podiam ser vistas, com evidência, nas bordas da ferida, assim como vasos sanguíneos em atividade, vindo de acordo com ROSS, EVERETT e TYLER³⁶, que afirma ser provável que as células fibroblásticas não sejam derivadas de células sanguíneas, e, sim, devem migrar do tecido conjuntivo adjacente. Esse atraso foi evidente, até, aproximadamente, o 11^o. dia de estudos e à partir desse período, a evolução do tecido passou a acompanhar o grupo de animais Controle. Essas observações mostraram que as baixas doses de radiação X aplicadas imediatamente após a produção de um ferimento, ou seja, anteriormente ao período de maior sensibilidade dos tecidos, produzem um pequeno efeito quantitativo, reversível, em um curto período de tempo.

O trabalho de ABDALLA¹(1988), ratifica esses resultados sobre os efeitos quantitativos encontrados neste experimento, ou seja, o atraso na gênese e evolução do tecido de granulação induzido artificialmente, utilizando - se baixas doses de radiação. Outros autores também ratificam estes achados, com um porém: a utilização de doses de radiação muito além das que foram aqui utilizadas, que ficaram em torno de 1,806 x

10^{-3} C/kg (ou 7 R). Estes são os casos de GRILLO & POTSAID²⁰(1961); GRILLO¹⁹(1963); DMITRIEVA¹²(1967); SHEARER⁴¹(1967); SCHULE & LUDIWIG³⁹(1968); BRYANT, SLESH e WEEKS⁷(1968); ITOIZ, et al²³(1969); DOTTO, et al¹⁵(1970); STAJIC & MILOVANOVIC^{42,43}(1970 e 1971); SCHULE⁴⁰(1971); DONATI¹³(1971) DONATI,et al ¹⁴(1972); van den BRENK & STONE^{46,47}(1974); MOORE²⁹(1984); KAHNBERG & THILANDER²⁵(1987) e GORODETSKY, Mc BRIDE e RODNEY WITHERS¹⁸(1988), que utilizaram doses de radiação de 600 a 20.000 C / Kg e encontraram atraso no processo de cicatrização.

BARTON, et al⁶(1985) também obtiveram redução na produção celular, mas na camada basal epidérmica. Os autores utilizaram-se de baixas doses de radiação(0,5 e 1,0 Gy), encontrando resultados semelhantes aos deste trabalho.

Já, RAEV, CHIRKOV e PARKHOMENKO³³(1983), utilizando-se de doses tão baixas quanto 15 R, encontraram um efeito estimulatório dessas doses, mas testou sistemas "in vitro" e não "in vivo", como foi o caso deste trabalho de pesquisa.

DE LOECKER, et al¹¹(1976) relata que em vista dos efeitos inibitórios da irradiação com doses entre 750-3000 R sobre a hidroxilação da prolina e em analogia com o mecanismo protéico, durante o ciclo de pêlos, a aumentada concentração colágena na pele dos animais irradiados, durante esse ciclo, pode ser atribuída a uma perda de fluído celular. Os autores constataram haver diferenças apenas quantitativas, ou seja, atraso das reações da pele, não encontrando alterações qualitativas, no que concerne à composição aminoácida de colágeno

solúvel e insolúvel. Estas observações estão basicamente de acordo com os achados deste trabalho, apesar da dose de radiação ser diferente.

DMITRIEVA¹²(1967), utilizando doses de 800 R, encontrou um atraso no desenvolvimento do tecido de granulação quando irradiado logo após o ferimento, exatamente como foi realizado neste trabalho. Mas o autor, além do atraso na gênese desse tecido, também observou um aumento na formação de células, tipo poliblasto de tecido adiposo, o que pode ser provavelmente uma reação compensatória devido ao diminuto número de poliblastos hematógenos.

HOPEWELL & YOUNG²²(1982), relataram ser possível que os tecidos proliferem muito rapidamente; quando um determinado campo irradiado produz morte celular, induzem assim a migração celular e a difusão de fatores humorais da borda do campo, que ocorrem, quando da irradiação fracionada. Isso poderia modificar a subsequente reação. O grau de migração celular seria um fator limitante e importantíssimo, que afetaria os tecidos em reparo, sendo mais comum ser uma função do mínimo tamanho do campo irradiado, principalmente, no campo da radioterapia. Nesta pesquisa, apesar do feixe de radiação procurar conter estritamente a área da ferida, as bordas da mesma também foram expostas aos raios X, causando assim, provavelmente, um pequeno efeito em ambos os grupos experimentais tratados, considerando-se a baixa dose de radiação aplicada. O efeito maior, ficou claro, ocorreu nos animais que receberam a dose de maneira dividida, principalmente, devido à irradiação no período da mais intensa proliferação celular e não

do efeito da irradiação das bordas das feridas. Esse efeito ocorreu nos animais do grupo D.U.. HOPEWELL & YOUNG²²(1982) ainda afirmaram, em seu trabalho, que a tolerância da pele foi determinada pela migração de elementos vasculares e outros da borda do campo irradiado. O grau de migração dos elementos vasculares e células epidérmicas, estabelecidos nos estudos de cicatrização de feridas, são da ordem de 1mm em 6-7 dias. Realmente, esses achados ratificam nossas observações, pois o ferimento inicial, que era de aproximadamente 1 cm², ao redor do 11^o. dia, já se apresentava totalmente recoberto por tecido epitelial e para o período final do processo de cicatrização, por volta do 28^o.dia, apresentava-se completamente curado.

6.2-Coloração pelo azul de toluidina ph=4.

O tratamento estatístico dos dados obtidos pela leitura das lâminas coradas com o azul de toluidina ph=4, técnica histofotométrica para o estudo das glicosaminoglicanas(GAGs), evidenciou não haver diferenças estatísticas entre os três grupos experimentais estudados. CHVAPIL⁹(1967) afirmou que existem quatro fases intimamente conectadas do processo de reparo, que podem ser assim distinguidas: mobilização celular, proliferação de substância fundamental, formação de proteína colágena e organização final. A síntese de GAGs é indispensável para a formação de colágeno, enquanto o aumento destes, nos espaços extracelulares, providenciam

a condição para a agregação da proteína colagenosa na forma de fibras.

As GAGs são sintetizadas no tecido de granulação, especialmente pelos fibroblastos, que também produzem colágeno. É possível que os fibroblastos possam sintetizar colágeno e mucopolissacarídeos ácidos ao mesmo tempo, embora recentes dados indiquem que os fibroblastos, que estão produzindo uma grande quantidade de colágeno, produzam poucas GAGs e vice-versa. É aceito que a polimerização de colágeno, na forma de fibras, somente ocorre quando as unidades macromoleculares são formadas por GAGs com a proteína colágena. Prévios trabalhos reportaram que as moléculas de GAGs ácidos são estreitamente associadas ao colágeno e esta associação é feita através de uma bem marcada orientação responsável pela estabilidade do colágeno. CAMPANI & REGIANINI (1950), UHER (1965) e CHVAPIL (1967) (apud VIZIOLI⁴⁹, 1971), afirmaram que a formação de GAGs no tecido de granulação inicia-se por volta de dois a quatro dias, o que está totalmente de acordo com os resultados aqui obtidos. Também apontaram que o início da síntese de GAGs ocorre por volta do terceiro dia pós-ferimento, e a maior formação dessas moléculas por volta dos 70.- 80. dias pós-ferimento, nos três grupos experimentais, sendo que um segundo pico de crescimento da síntese de GAGs, bem menor, ocorreu por volta do 210. dia, principalmente no grupo D.D. que, em geral, apresentou maior atraso na maturação do tecido, sendo então relativo ao período final de maturação. Como indicado por VIZIOLI⁴⁹ (1971), a máxima atividade da síntese de glicosaminoglicanas é concomitante com o pico da síntese de colágeno e, após a

diminuição de ambos os processos, a orientação é estabelecida. Logo, os resultados obtidos por esse autor, através da histofotometria estão de acordo com as observações morfológicas, as quais sugeriram que após 12 dias, o tecido de granulação tratado estava maduro e organizado. A associação macromolecular entre as GAGs e o colágeno começaram ao redor do 7º dia de desenvolvimento do tecido de granulação, alcançando a organização final após duas semanas. DROZDZ, et al¹⁶ (1981) obtiveram um aumento na quantidade de GAGs e de outros elementos quando expôs vários tecidos a uma dose de 500 R. O efeito da radiação sobre o tecido conjuntivo pode conduzir a destruição de substância fundamental amorfa, podendo estimular mudanças no metabolismo de colágeno. DROZDZ, KUCHARZ e MANCIAR¹⁷ (1982) encontraram uma marcada diminuição de colágeno ácido solúvel na pele irradiada em oposição ao aumento do colágeno insolúvel. Estes resultados são, supostamente, um efeito direto da radiação sobre a estrutura e maturação do colágeno tanto quanto uma influência sobre a substância fundamental, causando assim, indiretamente, uma desestabilização das fibras colágenas, concluindo que as GAGs foram alteradas pela irradiação, explicando a causa da desestabilização dos feixes de fibras colágenas. Em nossas observações não encontramos alterações das GAGs (quantitativamente) nem tão pouco desestabilização das fibras colágenas dos tecidos estudados, devendo-se considerar a dose de radiação utilizada pela autora (elevada em relação a nossa) e a qualidade da radiação empregada.

Neste trabalho de pesquisa houve a ocorrência de dois picos de formação das GAGs, o primeiro por volta do 7º dia e o segun-

do, bem menor, ao redor do 21^o. dia, nos três grupos experimentais; houve uma pequena diferença entre os grupos, principalmente, do grupo Dose Dividida em relação ao grupo Controle, porém esta diferença foi, estatisticamente, não significante. Isso mostra que a produção das GAGs foi praticamente a mesma em todos os grupos, o que prova que a dose de radiação de aproximadamente 7 R ou $1,806 \times 10^{-3}$ C/Kg utilizada não alterou de maneira significativa a produção das GAGs, nestas condições experimentais. Estes resultados deixam claro que não há alteração quantitativa ou qualitativa na produção das GAGs no tecido de granulação induzido experimentalmente, com o nível de dose de radiação empregada.

6.3-Impregnação pela prata.

Previamente, o dicroísmo foi empregado por VIDAL & ROMHANYI(1963)(apud VIZIOLI⁴⁹, 1971), que constataram que o dicroísmo exibido por secções de tecidos orgânicos corados pelo azul de toluidina relata a orientação molecular das GAGs. Assim ficou claro que, através do dicroísmo, haveria a possibilidade de determinar-se o momento no qual a orientação da associação entre as GAGs e o colágeno tomam lugar, o que, entre outros aspectos, determina a organização molecular do tecido de granulação. Neste trabalho de pesquisa, ao invés do azul de toluidina, foi utilizada a impregnação pela prata, usufruindo-se de sua propriedade de apresentar-se com diferentes cores quando observada ao microscópio de pola-

rização , segundo GOMORI(apud PEARSE⁴², 1968). E geralmente aceito que a estabilidade do colágeno depende da associação entre as macromoléculas de GAGS-colágeno, de acordo com JACKSON(1953) e BERNARDI(1957)(apud VIZIOLI⁴⁹, 1971) . Esta associação é feita de maneira orientada segundo VIDAL 1963(apud VIZIOLI⁴⁹, 1971). A impregnação pela prata ao longo das fibras colágenas é feita de acordo com a sua deposição nas moléculas de GAGs. Já está estabelecido que somente os tecidos organizados, vêm a apresentar o dicroísmo.

KULONEN(1965)(apud VIZIOLI⁴⁹, 1971) mostrou que a síntese de colágeno no tecido de granulação induzido experimentalmente começa ao redor do 5º dia, fato que está de acordo com os nossos resultados . Assim, não foi estranho que ao redor do 7º dia, a associação entre as macromoléculas de GAGs e o colágeno estivessem presentes, produzindo o dicroísmo. Isso permitiu supor que a organização do tecido somente foi estabelecida quando a síntese das GAGs alcançou um máximo, o que foi observado por volta do 7º dia nos 3 grupos de animais experimentais. É claro que a síntese de colágeno também deva estar presente, mas não é necessário que essa síntese já tenha alcançado a sua maior atividade. A presença de dicroísmo evidenciada pela impregnação argêntica, nos três grupos estudados, tornou claro que a radiação X, aplicada em baixas doses como nesta pesquisa, não influenciou sobre a orientação macromolecular dos tecidos irradiados. Esta afirmação, contudo, necessita de estudos posteriores, com maiores doses de radiação X, para ser confirmada ou não.

A dose de radiação X utilizada neste experimento foi estipulada em aproximadamente 7R ($1,806 \times 10^{-3}$ C/Kg). Segundo estimativas do "Council on Dental Material, Instruments and Equipment"¹⁰ (1982), poder-se-ia considerar arbitrariamente a demarcação entre baixas e altas doses o valor de 0,20 Gy ou 20 R. A revista da literatura por nós realizada mostrou que os estudos dos efeitos de baixas doses de radiação, abaixo de 20 R, foram de certa forma carentes. No levantamento bibliográfico, foram citados apenas 4 autores que utilizaram doses abaixo de 10 R ($2,58 \times 10^{-3}$ C/Kg), ou seja, realmente a níveis odontológicos. Entre eles estão, MESTER, et al²⁸(1971), JOVANOVIC²⁴(1974) e ABDALLA¹(1988). A grande maioria dos autores pesquisados utilizou em seus experimentos dose de radiação acima de 500 R ($0,129$ C/Kg), outros poucos utilizaram doses entre 11 a 500 R ($2,58 \times 10^{-3}$ a $0,129$ C/Kg). Apesar de muitos deles considerarem as dosagens utilizadas como baixas, ficou claro, no nosso entender, estarem elas muito além dos níveis considerados de baixas doses pelo "Council on Dental Material, Instruments, and Equipaments"¹⁰. Atribuímos este fato ao pouco interesse das pesquisas científicas sobre os efeitos dessas baixas doses de radiação na área médico-odontológica, pois esses efeitos, quando existentes, geralmente, são reversíveis.

A dose utilizada de 7 R ($1,806 \times 10^{-3}$ C/Kg) tem equivalência aproximada à dose de um completo exame de boca-toda (14 periapicais + 4 interproximais), mais a dose de uma radiografia panorâmica, e também a dose requerida em uma telerradiografia. Estes exames radiográficos são rotineiramente feitos em clínicas

odontológicas.

O resumo dos resultados apurados nesta pesquisa mostrou realmente haver diferenças entre os grupos experimentais, no que concerne aos aspectos quantitativos e nenhuma evidência diz respeito a efeitos da radiação X sobre aspectos qualitativos da gênese e evolução do tecido de granulação. A descrição histológica dos tecidos de granulação tratados e não-tratados evidenciou apenas aspectos quantitativos em relação aos efeitos produzidos pela radiação X; enquanto que as análises do dicroísmo e das GAGs deixaram explícito, o fato de não haver diferenças qualitativas entre os três grupos de animais estudados dentro destas condições experimentais. Os raios X, aplicados em baixas doses, modificam a tábua de eventos do processo de cicatrização, mas não a resposta final.

Devemos levar em consideração que, do ponto de vista genético, toda e qualquer dose de radiação pode ser perigosa; e também o fato de trabalharmos com animais de laboratório(ratos). Embora, simples e pequenas exposições possam parecer insignificantes, na verdade, elas podem resultar em uma sobrecarga de exposição para o indivíduo quando considerada em conjunto(cumulativa) com outras fontes de radiação existentes no meio ambiente.

7. CONCLUSOES

De acordo com os resultados obtidos dentro das condições experimentais desta pesquisa, pudemos concluir que:

A) Quando da exposição aos raios X de feridas cirúrgicas induzidas experimentalmente, sob as condições utilizadas neste experimento, a gênese e evolução do tecido de granulação é afetada.

B) O tecido de granulação irradiado com dose única de aproximadamente 7 C/kg, imediatamente após a produção da ferida cirúrgica no dorso dos animais, apresentou um pequeno retardo em sua gênese e evolução, nos períodos de 7 e 11 dias de observação, quando comparado ao grupo de animais não irradiados.

C) O tecido granulação dos animais irradiados com dose dividida, de aproximadamente 7 C/kg em dias alternados (três doses de aproximadamente 2,33 C/kg), imediatamente após a produção da ferida cirúrgica no dorso dos animais, apresentou retardo em sua gênese e evolução, quando comparado aos outros dois grupos experimentais, durante todo o período experimental.

D) A organização do tecido de granulação dos três grupos experimentais apenas tornou-se evidente à partir do 70º dia de observação, sendo que não houve diferença significativa na organização do mesmo entre os grupos estudados, como evidenciou o estudo do dicroísmo.

E) Não houve diferença, estatisticamente significativa, entre os três grupos de animais estudados, no que concerne à produção das glicosaminoglicanas, sendo que ficou evidente dois picos de crescimento das mesmas. O primeiro ao redor do sétimo dia e o segundo ao redor do vigésimo dia pós-ferimento.

F) Os efeitos da radiação X sobre a gênese e evolução do tecido de granulação induzido experimentalmente sob as condições utilizadas neste trabalho de pesquisa, foram apenas quantitativos e não qualitativos

8. RESUMO

O presente trabalho teve por finalidade pesquisar a gênese e evolução do tecido de granulação induzido experimentalmente em ratos, sob a ação local de baixas doses de radiação X, comparando-se os possíveis efeitos produzidos quando da aplicação em dose única e em dose dividida, com o tecido de granulação normal.

O tecido de granulação foi estudado aos 2, 4, 7, 11, 14, 21 e 28 dias de evolução. Os estudos realizados foram os seguintes: coloração com hematoxilina-eosina, para se verificar a morfologia do tecido de granulação; técnica histofotométrica, para se verificar a síntese de mucopolissacarídeos ácidos por meio da coloração metacromática com azul de toluidina $\text{ph}=4$; e, por fim, os tecidos foram submetidos à técnica de impregnação pela prata, para se evidenciar o dicroísmo entre as fibras colágenas e a consequente organização macromolecular do tecido de granulação.

Os animais foram divididos em 3(três) grupos experimentais, sendo eles: controle, dose única(7,0 R) e dose dividida(7,0 R, divididos igualmente em três frações).

Os resultados encontrados mostraram efeitos quantitativos e não qualitativos da radiação X sobre a gênese e evolução do tecido de granulação. Os efeitos mais evidentes foram constatados no grupo de animais que recebeu dose dividida de radiação X, sendo que o grupo que recebeu dose única apresentou um pequeno efeito, quando comparados aos tecidos normais. Os efeitos apresentados em ambos os grupos mostraram ser temporários e não definitivos, de acordo com a dose de radiação empregada.

9. SUMMARY

The purpose of this search was to study histological and histoquimical aspects of the genesis and evolution of artificially induced granulation tissue under the effects of low doses X-irradiation. By the other hand, it was also compared the effects produced by X-irradiation applied in simple and divided doses with the untreated granulation tissue aspects.

It were used 63 rats, divided in 3 experimental groups as follows: control group, simple dose(7,0 R ou $1,80 \times 10^{-3}$ C/Kg) group and divided dose(7,0 R ou $1,80 \times 10^{-3}$ C/Kg, divided in 3 parts of $6,0 \times 10^{-4}$ C/Kg) group.

The results showed that low doses of X-irradiation affects the genesis and evolution of granulation tissue quantitatively but not qualitatively. The major effect was the retardation on the granulation tissue evolution in the treated groups, mostly in the animals from the group which has received divided doses.

The X-irradiation which was applied in these experimental circumstances has partially inhibited the rhytm of granulation tissue evolution.

10.REFERENCIAS
BIBLIOGRAFICAS

- 1 .ABDALLA, C.M. Estudo histológico da gênese e evolução do tecido de granulação, sob efeito de baixas doses de radiação X. Piracicaba, 1988. 60 p. Tese (Mestrado) Faculdade de Odontologia de Piracicaba -UNICAMP.

- 2.ANDRADE, E. D. *Estudo histológico e histométrico do tecido de granulação de ratos em condições normais e sob ação de drogas antiinflamatórias.* Piracicaba, 1980. 48 p. Tese(Mes - trado). Faculdade de Odontologia de Piracicaba-UNICAMP.

- 3 .ARCHER, R. R. ; et al Irradiation effect on wound healing in rats. *Radiat. Res.*, v.41, p.104-12, 1970.

- 4 .ARLASHCHENKO, N. I. Role of the dose-rate in the radiation response of the tissue - vascular barrier. *Radiobiologia* , v.21, n.1, p.151-5, 1981.

- 5 .BAILEY, A. J. Effect of ionizing radiation on connective tissue components. *Int. Rev. Connect. Tissue Res.*, v.4, p.233-281, 1968.

- 6 .BARTON, S. P.; et al Detection of the effects of low dose ionizing irradiation on epidermal function. *Br. J. Radiol*, v.58, n.685, p.73-6, 1985.

- 7 .BRYANT, W. ; SLESH, M. Z. ; WEEKS, P. M. Collagen and mucopolysaccharide synthesis in healing irradiated wounds. *Surg. Forum.*, v.19, p.503-5, 1968.

- 8.CAMPANI, M.; et al. *Physiology of connective tissue.* London, Butterworths, 1967, 258.

- 9.CHVAPIL, M. *Physiology of connective tissue.* (Butterworths, London / Czechoslovak Medical Press), Prague, 1967, p.258.

- 10.COUNCIL ON DENTAL MATERIALS, INSTRUMENTS, AND EQUIPMENT. Biological effects of irradiation from dental radiography . *J. Am. Dent. Assoc.*, v.105, p.275-81, 1982.

- 11.DE LOECKER, W.; et al. The effects of X-irradiation on collagen metabolism in rat skin. *Int. J. Radiat. Biol.*, v.29, n.4, p.351-58, 1976.

- 12.DIMITRIEVA, E.V. Development of granulation tissue in total and local exposures to X-rays. *Arkh. Anat. Gistol. Embriol.*, v.52, p.25-34, 1967.
- 13.DONATI, R.M. Combined surgical and radiation injury- IV. Effect antimicrobials on the wound healing pattern of X - irradiated rat. *Arch. Surg.*, v. 102, p. 132 - 35, 1971.
- 14.DONATI, R.M.; et al. Combined surgical and radiation injury-VII. Trace element studies of the healing wound(36145). *Arch. Surg.*, v.139, p.367-371, 1972.
- 15.DOTTO, C. A.; et al. Quantitative study of vascular response in irradiated wounds. *Surg. Ginecol. Obstet.*, v.130, n.5, p.875-78, 1970.
- 16.DROZDZ, M.; et al. Effect of irradiation on glycosaminoglycans content in rat tissue. *Arch. Immunol. Ther. Exp.*, v.29, p.515-19, 1981.
- 17.DROZDZ, M.; KUCHARZ, E.; MAMCZAR, A. Collagen content in tissues of irradiated rats. *Exp. Pathol.*, v.22, p.125-27, 1982.
- 18.GORODETSKY, R.; Mc BRIDE, W.H.; RODNEY WITHERS, H. Assay of radiation effects in mouse skin as expressed in wound healing. *Rad. Res.*, v.116, n.135-44, 1988.
- 19.GRILLO, H.C. Origin of fibroblasts in wound healing : an autoradiographic study of inhibition of celular proliferation by local X - irradiation. *Ann. Surg.*, v.157, n.3, p.453-67, 1963.
- 20.GRILLO, H.C.; POTSAID, M.S. Studies in wound healing: IV. retardation of contraction by local X-irradiation , and observations relating to the origin of fibroblasts in repair. *Ann. Surg.*, v.154, n.5, p.741-50, 1961.
- 21.GUIDUGLI NETO, J. The effects of roentgen radiation on the radiation on the capillary sprouts and superficial loops of granulation tissue: I. quantitative study of the vascular volume. *Rev. Fac. Odont. Univ. São. Paulo.*, v.1, n.4, p.6-8, 1987.

- 22.HOPEWELL, J. W.; YOUNG, M.A. The effects of field size on the reaction of pig skin to single doses of X rays (correspondence). *Br. J. Radiol.*, v.55, n.660, p.356-61, 1982.
- 23.ITOIZ , M. E. ; et al. Histochemical study of healing wounds : alkaline and acid phosphatase. *J. Oral Surg.*, v.27, p.641-44, 1969.
- 24.JOVANOVIC, D. The influence of radiation on blood vessels and circulation: V. noncelular factors. *Curr. Top. Radiat. Res. Q.*, v.10, p.75-84, 1974.
- 25.KAHNBERG , K. E.; THILANDER, H. Healing of experimental excisional wounds in the rat palate. *Swed. Dent. J.*, v.11, p.61-70, 1987.
- 26.LISON, L. Histochimie et citochimie animales: principes et methodes. *Paris, Gauthier-Villais, 1960. p.280. v.1.*
- 27.MANSON - HING , L. R. *Fundamental of Dental Radiography.* 2.ed. Philadelphia, 1985. p-236.
- 28.MESTER, E.; et al Effect of laser rays on wound healing. *Am. J. Surg.*, v.122, p.5321-5, 1971.
- 29.MOORE, M. J. The effect of radiation on connective tissue. *Otolaryngol. Clin. North Am.*, v.17, n.2, p.389-99, 1984.
- 30.NIKOLAEVA, S.S.; et al. The influence of ionizing radiation on the structure of human achilles tendon collagen fibres. *Radiobiologia*, v.28, n.4, p.483-8, 1988.
- 31.NIMNI, M.E.; LYONS, C.; BAVETTA, L.A. Collagen and hexosamine changes in subcutaneous granuloma irradiated locally with a Co⁶⁰ source.(31072). *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, v.122, p.134-37, 1966.
- 32.PEARSE, A. G. E. Histochemistry: theoretical and applied. *Edinburgh, Churchill livingstone, 1968. p: 331. v.1.*

33. RAEV, B. A.; CHIRKOV, Y. Y.; PARKHOMENKO, I. M. The effect of low doses of X-ray irradiation on cAMP level in Chinese hamster fibroblasts. *Experientia*, v.39, p.1310-11, 1983.
34. REINHOLD, H. S. The influence of radiation on blood vessels and circulation. *Current Topics in Radiation Research Quartely*, v.10, p.3-8, 1974.
35. ROGERS, R. T. Radiation dose to the skin in diagnostic radiography. *Br. J. Radiol.*, v.42, p.511-8, 1969.
36. ROSS, R.; EVERETT, N. B.; TYLER, R. Wound healing and collagen formation. *J. Cell Biol.*, v.44, p.645-54, 1970.
37. RUDOLPH, R.; et al Slowed growth of cultured fibroblasts from human radiation wounds. *Plast. Reconstr. Surg.*, v.82, n.4, p.669-77, 1988.
38. SANIVOV, A. G. Mechanism of action of small doses of radiation. *Radiobiologiya*, v.26, n.4, p.482-7, 1986.
39. SCHULE, VON H.; LUDWIG, F. Wound healing following tooth extraction: I. histological studies on the healing of extraction wounds in tissue injured by radiation. *Dtsch. Zahn_ Mund_ Kieferheilkd*, v.51, n.1/4, p.3-22, 1968.
40. SCHULE, H. Experimental and clinical studies on the effects of x-rays in the cicatrization of the alveolar wound after extraction. *Rev. Stomatol. Chir. Maxillofac.*, v.72, p.346-50, 1971.
41. SHEARER, H. T. Effect of cobalt - 60 radiation on extraction healing in the mandibles of dogs. *J. Oral Surg.*, v.25, p.115-21, 1967.
42. STAJIC, J.; MILOVANOVIC, A. Radiation and wound healing : evaluation of tensile strength in excised skin-wound of irradiated rats. *Strahlentherapie*, v.139, p.87 - 90, 1970.
43. _____ Radiation and wound healing : histological changes in the damaged skin of irradiated rats. *Strahlentherapie*, v.141, p.244-9, 1971.

44. STEIN, M.; BRADY, L.W.; RAVENTOS, A. The effects of radiation on extraction wound healing in the rat. *Cancer*, v.10, p.1167-81, 1957.
45. TRAEELNES, K.R. ; et al The effect of X-irradiation collagen metabolism in polyvinyl - sponge granulomas. *Radiat. Res.*, v.47, p.224-32, 1971.
46. VAN DEN BRENK, H.A.S.; STONE, M. Effects of X- irradiation on growth and function of the repair blastema (granulation tissue): III. measurement of pharmacodynamic activity in vitro. *Int. J. Radiat. Biol.*, v.26, n.3, p.237-49, 1974.
47. VAN DEN BRENK, H.A.S.; STONE, M. Effects of X - irradiation on the growth and function of the repair blastema (granulation tissue). I. Wound contraction. *Int. J. Radiat. Biol.*, v.25, n.1, p.1-19, 1974.
48. VANE, J. R. ; FERREIRA, S. H. *Handbook of pharmacology*. Berlin, Springer - Verlag, 1979. p.223 - 54, 348 - 98, 598-634.
49. VIZIOLI, M. R. Macromolecular organization of rat sponge - induced granulation tissue as revealed by dichroism. *Acta Anat.*, v.80, p.73-81, 1971.
50. VIZIOLI, M.R. Relação entre fosfomonoesterases e a síntese de colágeno e mucopolissacarídeos ácidos no tecido de granulação. Piracicaba, 1975, 61 p. Tese (Docência Livre). Faculdade de Odontologia de Piracicaba-UNICAMP.
51. VIZIOLI, M. R.; ALMEIDA, O. P. Effects of carnosine on the development of rat sponge - induced granulation I. General morphology and glycosaminoglicans histophotometry. *Cell. Mol. Biol.*, v.23, p.267-73, 1978.
52. WEEKS, P. M. Irradiation effect on collagen degradation. *Surg. Forum*, v.20, p.498-9, 1969.
53. WOODARD, H. Q. The influence of X - rays on the healing of fractures. *Health Phys.*, v.19, p.791-9, 1970.
54. ZELMAN, D.; et al. The effect of total body irradiation on wound healing and the hematopoietic system in mice. *Bull. N. Y. Acad. Med.*, v.45, n.3, p.293-300, 1969.

11. APENDICE

QUADRO AIV - Equação da curva de regressão de ordem 4, grupo Controle.

!coeficiente de x, grau 0 :	-32.1537
!coeficiente de x, grau 1 :	27.8757
!coeficiente de x, grau 2 :	-03.1144
!coeficiente de x, grau 3 :	00.1305
!coeficiente de x, grau 4 :	-00.0019
!coeficiente de correlação:	00.9270

QUADRO AV - Equação da curva de regressão de ordem 4, grupo Dose Unica.

!coeficiente de x, grau 0 :	-48.1715
!coeficiente de x, grau 1 :	36.0991
!coeficiente de x, grau 2 :	-04.3653
!coeficiente de x, grau 3 :	00.2002
!coeficiente de x, grau 4 :	-00.0031
!coeficiente de correlação:	00.8881

QUADRO AVI - Equação da curva de regressão de ordem 4, grupo Dose Dividida

!coeficiente de x, grau 0 :	-33.8035
!coeficiente de x, grau 1 :	29.5679
!coeficiente de x, grau 2 :	-03.6477
!coeficiente de x, grau 3 :	00.1703
!coeficiente de x, grau 4 :	-00.0027
!coeficiente de correlação:	00.9779

Percentuais acumulados de frequências

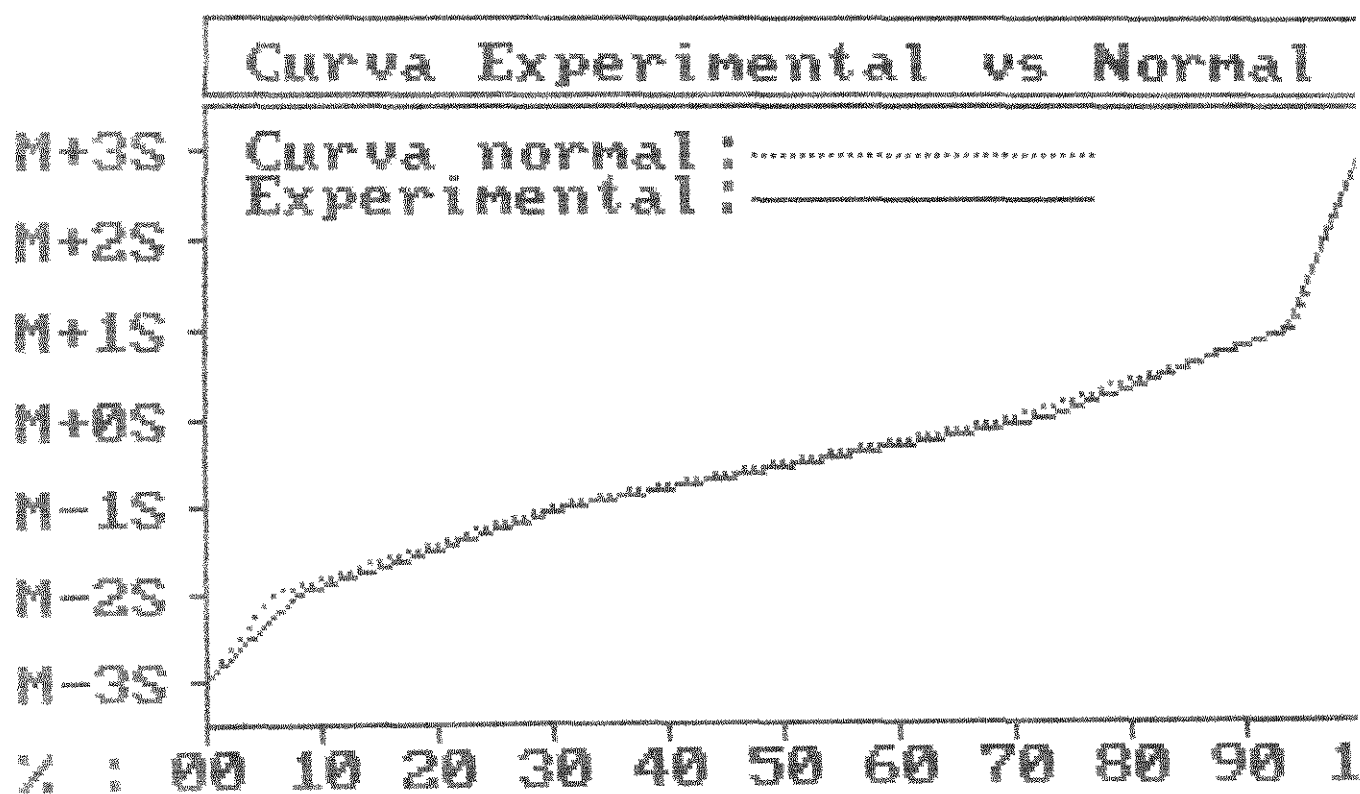


FIGURA A1-Gráfico das médias dos dados originais, perc. acum. de freq.

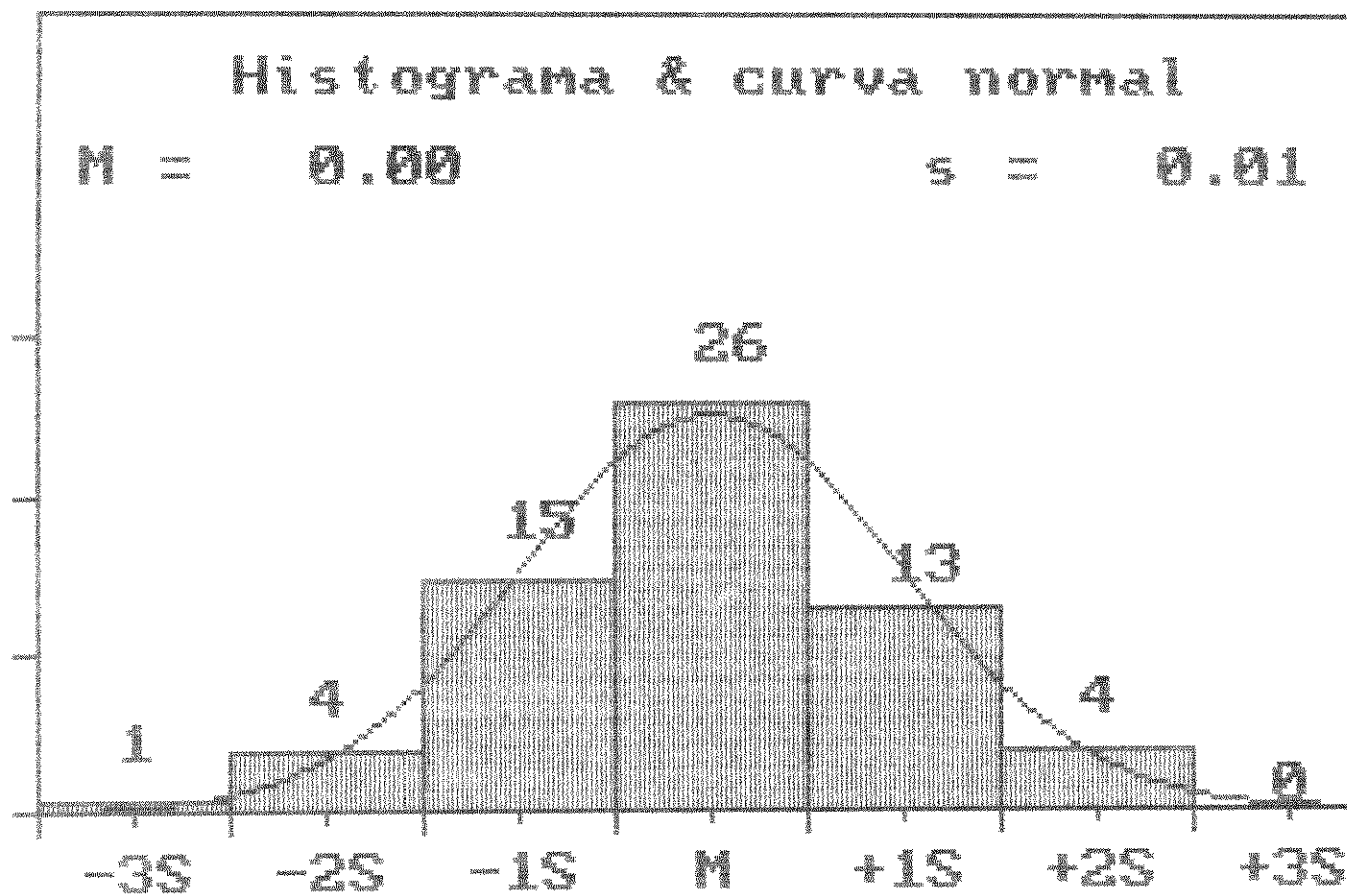


FIGURA A2 - Histograma das médias dos dados originais.

Percentuais acumulados de frequências

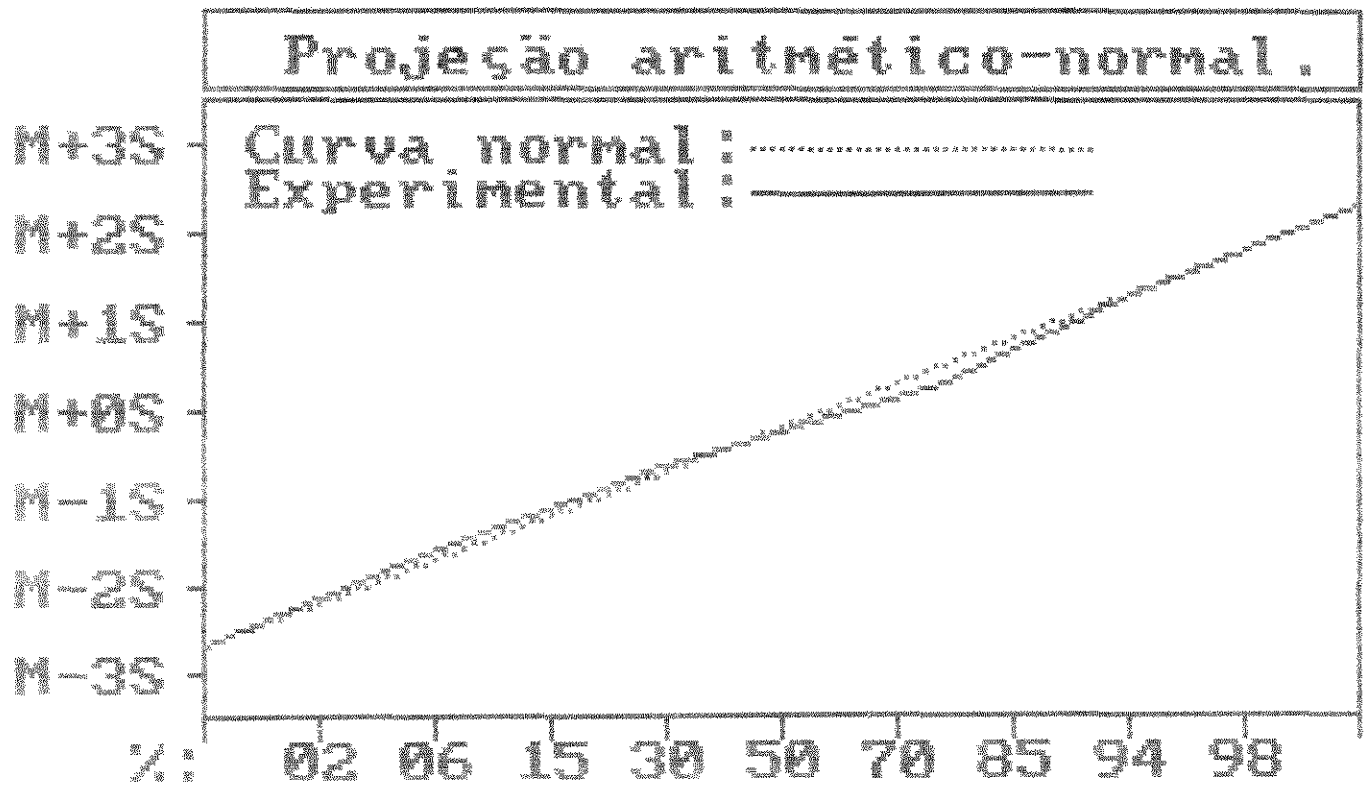


FIGURA A3-Grafico das médias dos dados originais, projeção aritm.-norma

QUADRO AIV - Equação da curva de regressão de ordem 4, grupo Controle.

!coeficiente de x, grau 0 :	-32.1537
!coeficiente de x, grau 1 :	27.8757
!coeficiente de x, grau 2 :	-03.1144
!coeficiente de x, grau 3 :	00.1305
!coeficiente de x, grau 4 :	-00.0019

!coeficiente de correlação:	00.9270

QUADRO AV - Equação da curva de regressão de ordem 4, grupo Dose Unica.

!coeficiente de x, grau 0 :	-48.1715
!coeficiente de x, grau 1 :	36.0991
!coeficiente de x, grau 2 :	-04.3653
!coeficiente de x, grau 3 :	00.2002
!coeficiente de x, grau 4 :	-00.0031

!coeficiente de correlação:	00.8881

QUADRO AVI - Equação da curva de regressão de ordem 4, grupo Dose Dividi

!coeficiente de x, grau 0 :	-33.8035
!coeficiente de x, grau 1 :	29.5679
!coeficiente de x, grau 2 :	-03.6477
!coeficiente de x, grau 3 :	00.1703
!coeficiente de x, grau 4 :	-00.0027

!coeficiente de correlação:	00.9779

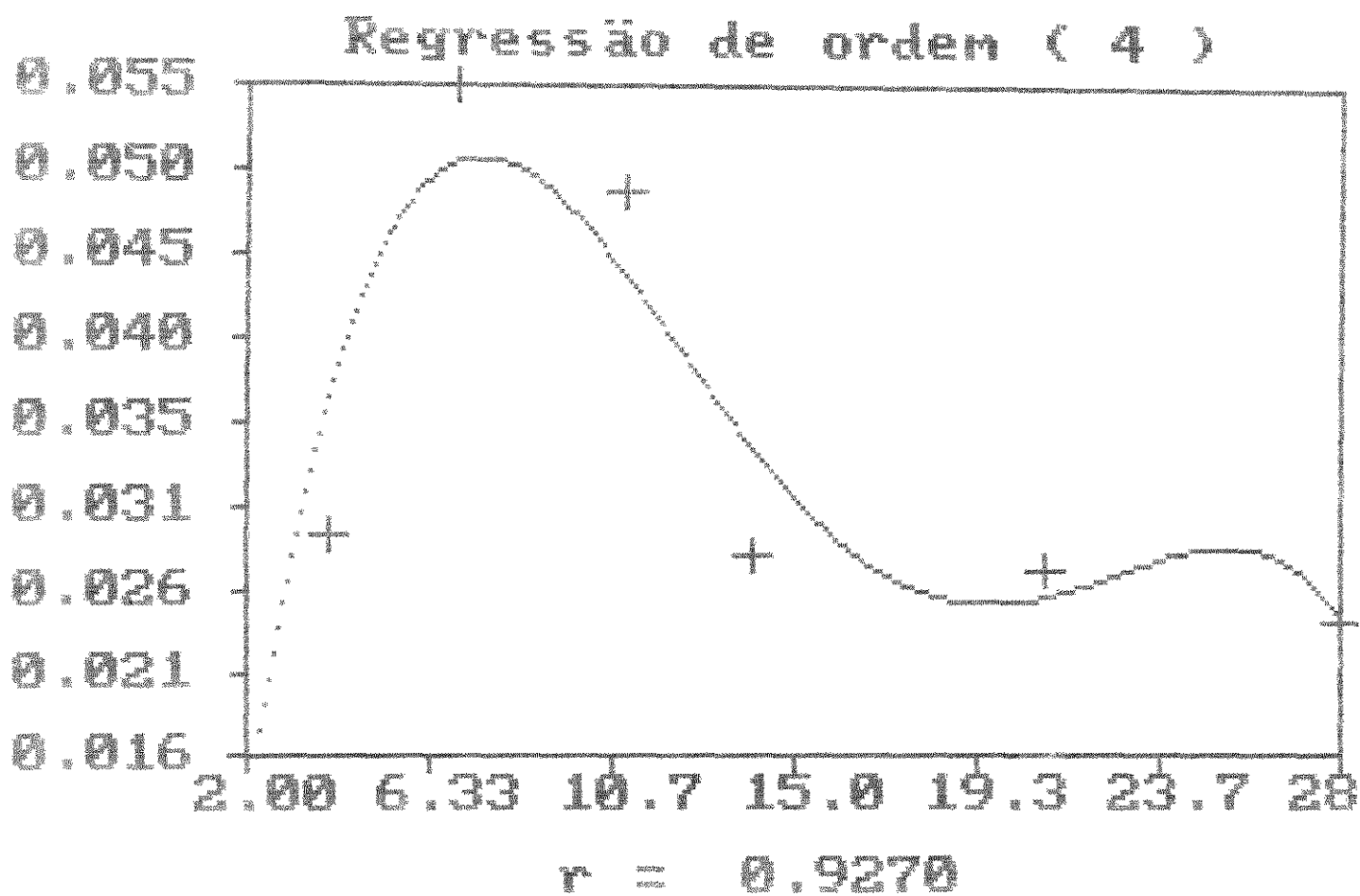


FIGURA A4 -Gráfico da curva de regressão de ordem 4, grupo Controle.

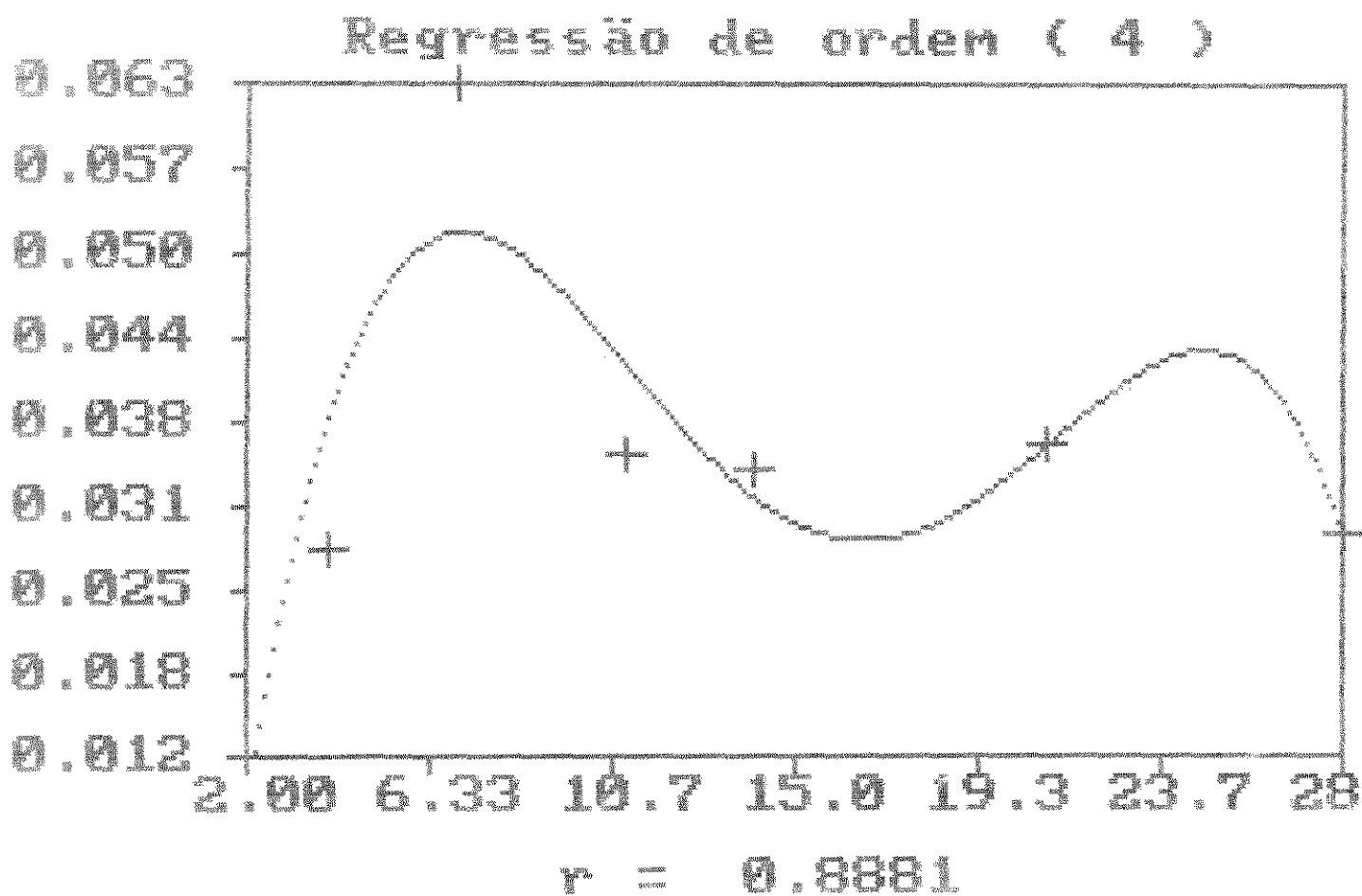


FIGURA A5 -Gráfico da curva de regressão de ordem 4, grupo Dose Unica.

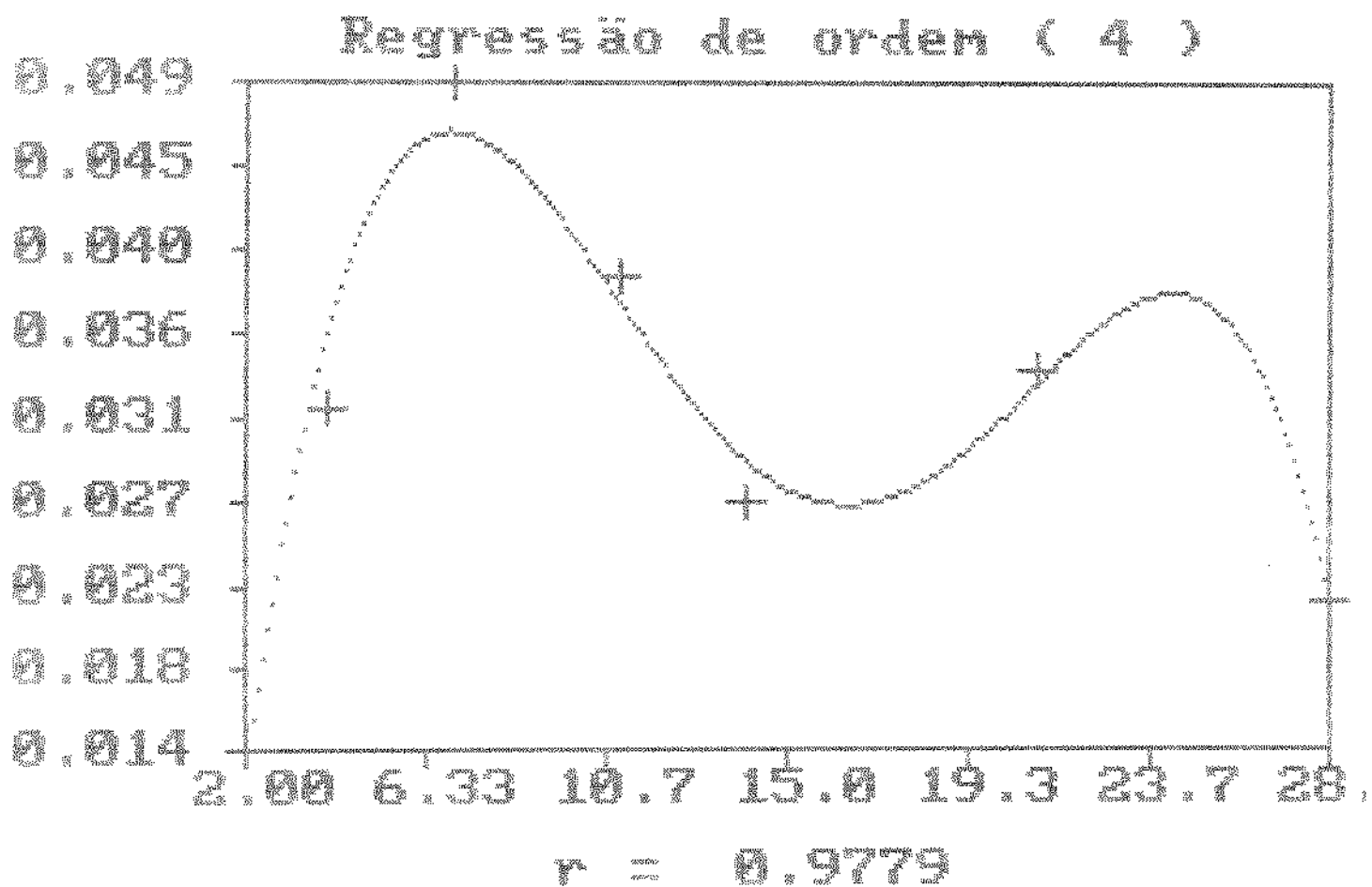


FIGURA A6 -Gráfico da curva de regressão de ordem 4, grupo Dose Dividida