SOLANGE APARECIDA CALDEIRA MONTEIRO

EFEITOS DA IRRADIAÇÃO POR ELÉTRONS EM FERIDAS E EM TECIDOS DE GRANULAÇÃO

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

Piracicaba – SP
– 1999 –

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

SOLANGE APARECIDA CALDEIRA MONTEIRO

EFEITOS DA IRRADIAÇÃO POR ELÉTRONS EM FERIDAS E EM TECIDOS DE GRANULAÇÃO

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

Este exemplar foi devidamente corrigido, de acordo com a Resolução CCPG-036/83
CPG, 14/03/2000
Assinatura do Orientador

Orientador: Prof. Dr. FRAB NORBERTO BÓSCOLO

Banca examinadora:
Prof. Dr. Cláudio de Freitas
Prof. Dr. Frab Norberto Bóscolo
Prof.Dr. Mário Roberto Vizioli
Profa. Dra. Marlene Fenyo Soeiro de Matos Pereira
Profa. Dra. Solange Maria de Almeida

Piracicaba – SP
– 1999 –

UNICAMP B C
Nº CHAMADA:
T/UNICAMP
M764e
V.
TOMBO 40990
PROC. 278100
D
PREÇO R$ 11,00
DATA 25/04/00
Nº CPD

CM-00142017-6

Ficha Catalográfica

Monteiro, Solange Aparecida Caldeira.

M764e Efeitos da irradiação por elétrons em feridas e em tecidos de granulação. / Solange Aparecida Caldeira Monteiro. -- Piracicaba, SP : [s.n.], 1999.

99p. : il.

Orientador : Prof. Dr. Frab Norberto Bóscolo.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Tecido de granulação. 2. Radiação ionizante. I. Bóscolo, Frab Norberto. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.

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

UNICAMP

FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Tese de DOUTORADO, em sessão pública realizada em 17 de Dezembro de 1999, considerou a candidata SOLANGE APARECIDA CALDEIRA MONTEIRO aprovada.

1. Prof. Dr. FRAB NORBERTO BOSCOLO _____

2. Profa. Dra. MARLENE FENYO SOEIRO DE MATOS PEREIRA _____

3. Prof. Dr. CLAUDIO DE FREITAS _____

4. Prof. Dr. MARIO ROBERTO VIZIOLI _____

5. Profa. Dra. SOLANGE MARIA DE ALMEIDA _____

"A Justiça Divina não necessita de advogados em defesa daqueles que fogem das Leis do Amor e da Harmonia. Nos Tribunais da Infinito, o réu é o seu próprio e severo juiz"

Josepho

(do livro "O Alvorecer da Espiritualidade"
Dolores Bacelar – médium e Josepho – espírito)

Dedico este trabalho

àquele que me ajudou constituir e ter uma família

NINO (RUBENS);

àqueles que me fazem sentir o valor de uma família, meus filhos:

BINO (RUBENS),
PILU (BIBIANA),
BRANCA (STEFÂNIA)
e XUXU (BEATRIZ)

àqueles que me deram uma família

SOLON e ANÉSIA

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Ao Prof. Dr. ***FRAB NORBERTO BÓSCOLO***, pela dedicação na orientação deste trabalho, e pelos ensinamentos ministrados durante todo período de convívio. Ensinamentos, estes, não só relativos à ciência, mas também ao relacionamento humano. Agradeço, especialmente, à oportunidade concedida , um dia permitindo meu ingresso no curso. Meu eterno agradecimento.

Ao Prof. Dr. ***MÁRIO ROBERTO VIZIOLI***, pelo auxílio na realização deste trabalho; e sobretudo pelo ensinamento, de que o conhecimento aliado a paciência e a dedicação, são as maiores armas de um mestre.

À Profa. Dra. ***SOLANGE MARIA DE ALMEIDA***, pela presença amiga e constante disposição para transmitir ensinamentos e auxiliar àqueles com quem convive.

Ao Prof. Dr. ***AGENOR MONTEBELO FILHO***, pela presteza com que atende quando são solicitados seus conhecimentos, dedicação e amizade.

Ao Prof. Dr. ***FRANCISCO HAITER NETO***, pelo exemplo de determinação e pela disposição em dividir os conhecimentos adquiridos.

Agradecimentos

À Faculdade de Odontologia de Piracicaba, nas pessoas de seu Diretor Prof. Dr. **Antonio Wilson Sallum** e Diretor Associado Prof. Dr. **Frab Norberto Bóscolo**.

À comissão dos Cursos de Pós- Graduação da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, nas pessoas Profa. Dra. Altair **Antoninha Del- Bel Cury**, Coordenadora; Prof. Dr. **Pedro Luiz Rosalen**, Sub- coordenador; Sra. **Sônia Maria Lordello Arthur**, Secretária Geral; e Srta. **Érica Alessandra Pinho**, secretária.

Ao físico **José Renato de Oliveira Rocha**, do centro de Engenharia Biomédica, pela presteza e dedicação no atendimento para irradiação dos animais.

Ao físico **José Renato de Oliveira Rocha**, do Centro de Engenharia Biomédica, pela presteza e dedicação no atendimento para irradiação dos animais.

Às disciplinas de **Farmacologia, Histologia e Patologia** da FOP- Unicamp, por terem aberto as portas de seus laboratórios para a realização da parte prática deste trabalho.

Ao Sr. **Paulo Amaral**, pelo processamento das peças e confecção das lâminas e à disciplina de Farmacologia nas pessoas do Prof. Dr. **José Ranali** e dos funcionários, **José Carlos Gregório** e **Ademir Mariano**.

Aos amigos **Solange Maria Almeida** e **Roberto Martins Lourenço** pelo companheirismo na nossa luta comum no Biotério e Laboratório.

Aos colegas dos cursos de **Especialização, Mestrado e Doutorado**, ao longo dos 10 anos de permanência no Departamento de Radiologia da FOP- Unicamp, na pessoa da Profa. Marcia Regina Brunelli companheira de luta e amiga de todas as horas.

Ao **CAISM**- Centro de Assistência Integral e Saúde da Mulher- nas figuras de seu Diretor, Dr. **Luiz Carlos Zeferino**; Dr. **Márcio de Oliveira Cunha**, Diretor do serviço de Radioterapia e da Dra. **Maria Salete Costa Gurgel**, Diretora da Divisão de Apoio Médico à Pesquisa.

Às Bibliotecárias da Fop- Unicamp na pessoa da Sra. **Heloísa Maria Cecotti**, pelas orientações na busca e ordenação das referências bibliográficas.

Ao colega e amigo **Marcelo Gonçalves** e aos meus filho **Rubens Caldeira Monteiro** e "**Fernando Torensan Nascimento**", pelo auxílio na parte de Processamento de Dados.

À Profa. Dra. **Cristina Maria Dumit Sewell**, responsável pela disciplina de Radiologia da UNIARARAS e Profa. **Addah Regina da Siva Freire**, responsável pela disciplina de Radiologia UFMG, pela cooperação e amizade.

Aos funcionários **Raquel, Gislaine, Giselda** e **Valdeck** da disciplina de Radiologia da FOP- UNICAMP pela dedicação e cooperação.

À **CAPES**, pela concessão da bolsa de estudos que permitiu a execução deste trabalho.

A Deus.

SUMÁRIO

Lista de Ilustrações 01
Lista de Abreviaturas 04
Resumo 05
Abstracts 07
I – Introdução 09
II – Revista da Literatura 12
III – Proposição 41
IV – Material e Métodos 43
V – Resultados 50
VI – Discussão 73
VII – Conclusão 87
Referências Bibliográficas 89
Apêndice – Glossário 98

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

figura: 1.1- dorso do animal após tricotomia e incisão, observando-se no leito da ferida o tecido muscular. (página 49).

figura: 1.2- aparelho Mevatron 74- Siemens. (página 49).

figura: 1.3- animal posicionado para irradiação. (página 49).

figuras: 2.1, 2.3, 2.5, 2.7, 2.9, 2.11, 2.13, 2.15, 2.17, 2.19, 2.21, 2.23, 2.25, 2.27- coloração por hematoxilina- eosina – lâminas pertencentes ao grupo controle. (páginas 61 a 64). O tempo transcorrido entre a ferida e a coleta do material expresso acima da figura correspondente.

figuras: 2.2, 2.4, 2.6, 2.8, 2.10, 2.12, 2.14- coloração por hematoxilina- eosina – lâminas pertencentes ao grupo ferida irradiada. (páginas 61 e 62). O tempo transcorrido entre a ferida e irradiação e a coleta do material expresso acima da figura correspondente.

figuras: 2.16, 2.18, 2.20, 2.22, 2.24, 2.26, 2.28- coloração por hematoxilina- eosina – lâminas pertencentes ao grupo tecido de granulação irradiado. (páginas 63 e 64). O tempo transcorrido entre a ferida e a coleta do material expresso acima da figura correspondente. A irradiação foi administrada 72 horas após a realização da ferida.

figuras: 3.1, 3.3, 3.5, 3.7, 3.9, 3.11, 3.13, 3.15, 3.17, 3.19, 3.21, 3.23, 3.25, 3.27- exame da birrefringência - lâminas pertencentes ao grupo controle. (páginas 65 a 68). O tempo transcorrido entre a ferida e a coleta do material expresso acima da figura correspondente.

figuras: 3.2, 3.4, 3.6, 3.8, 3.10, 3.12, 3.14- exame da birrefringência – lâminas pertencentes ao grupo ferida irradiada. (páginas 65 e 66). O tempo transcorrido entre a irradiação e ferida e a coleta do material expresso acima da figura correspondente.

figuras: 3.16, 3.18, 3.20, 3.22, 3.24, 3.26, 3.28- exame da birrefringência – lâminas pertencentes ao grupo tecido de granulação irradiado. (páginas 67 e 68). O tempo transcorrido entre a ferida e a coleta do material expresso acima da

figura correspondente. A irradiação foi administrada 72 horas após a realização da ferida.

figuras: 4.1, 4.2, 4.3, 4.4- exame do dicroísmo linear- lâminas pertencentes ao grupo controle. (página 69). O tempo transcorrido entre a ferida e a coleta do material expresso acima da figura correspondente. As setas indicam o sentido de rotação da lâmina.

figuras: 4.5, 4.6, 4.7, 4.8- exame do dicroísmo linear- lâminas pertencentes ao grupo ferida irradiada. (página 69). O tempo transcorrido entre a ferida e irradiação e a coleta do material expresso acima da figura correspondente. As setas indicam o sentido de rotação da lâmina.

figuras: 4.9, 4.10, 4.11, 4.12- exame do dicroísmo linear- lâminas pertencentes ao grupo tecido de granulação irradiado. (página 70). O tempo transcorrido entre a ferida e a coleta do material expresso acima da figura correspondente. As setas indicam o sentido de rotação da lâmina. . A irradiação foi administrada 72 horas após a realização da ferida.

figuras: 5.1, 5.2, 5.3, 5.4, 5.5, 5.6- coloração por hematoxilina- eosina – lâminas pertencentes ao grupo ferida irradiada, para comparação com o grupo tecido de granulação irradiado. (página 71). O tempo comum transcorrido entre a ferida e coleta do material expresso acima da figura correspondente.

figuras: 6.1, 6.2, 6.3, 6.4, 6.5, 6.6- exame da birrefringência – lâminas pertencentes ao grupo ferida irradiada , para comparação com o grupo tecido de granulação irradiado. (página 72). O tempo comum transcorrido entre a ferida e coleta do material expresso acima da figura correspondente.

LISTA DE ABREVIATURAS

cG- centéssimo de Gy

GAGs- glicosaminoglicanas

GC- grupo controle

GFI- grupo ferida irradiada irradiada

GTGI- grupo tecido de granulação irradiado

Gy- Gray

HE- hematoxilina- eosina

i.e.- "id est"- isto é

LET- linear energy transfer

MeV- milhão de elétrons volts

R- Roentgen

Rad- radiation absorved dose

RBE- relative biological effectiveness

Sv- Sievert

Wr- radiation weighting factor

RESUMO

Com a finalidade de estudar o efeito de irradiação por elétrons em tecido de reparação, foram utilizados 75 ratos Wistar e divididos em 4 grupos. Foram realizadas feridas excisionais medindo 2 cm x 1 cm a uma distância de 1 cm da espinha dorsal. Para cada tempo dos grupos foram utilizados 3

animais. O grupo controle e o grupo ferida irradiada imediatamente após a cirurgia, foram analisados nos tempos 2, 4, 7, 11, 14, 17 e 21 dias. O grupo controle e o grupo tecido de granulação, irradiado 3 dias após a remoção do tecido, foram analisados nos tempos 5, 7, 10, 14, 17, 20 e 24 dias. O feixe de elétrons produzido por um acelerador linear Mevatron 74, com 6 MeV de energia, foi ministrado na dose de 1Gy. No momento da irradiação houve coincidência entre a ferida e a abertura da lâmina de chumbo usada para proteção do animal, ficando o resto do corpo do animal protegido da irradiação por elétrons. Os tecidos foram submetidos aos tratamento de HE para estudo da morfologia do tecido de granulação, impregnação pela prata- para verificação da formação e maturação dos feixes de colágeno, reação histoquímica pelo azul de toluidina pH 4 para verificação da produção de GAGs e suas ligações com as moléculas de colágeno. Os resultados mostraram atraso na reparação do grupo ferida irradiada (tecidos irradiados imediatamente após a cirurgia) e no grupo tecido de granulação irradiado (irradiação ministrada no 3° dia da gênese tecidual), sobretudo no grupo tecido de granulação irradiado. Ao final do período experimental, todos tecidos apresentavam características bastantes semelhantes, indicando ser o atraso transitório.

ABSTRACT

In order to study the effect of electrons irradiation on the repair tissue, 75 *Wistar* rats were used. The animals were divided at random into 4 experimental groups. The controls groups were sacrificed at: 2, 4, 5, 7, 10, 11, 14, 17, 20, 21 and 24 days after the surgical procedure. The animals that had the wound irradiated immediately after the surgery were analyzed at 2, 4, 7, 11, 14, 17 and 21 days after irradiation. The groups which had the granulation tissue irradiated 3 days after the removal of the tissue were evaluated at 5, 7, 10, 14, 17, 20 and 24 days after wounding. All the wounds were 2 cm x 1 cm and were located 1 cm to the dorsal spine. The electron beam produced using a Mevatron 74 linear accelerator, with

energy of 6 MeV, was applied to give a dose of 1Gy. In the moment of the irradiation, the beam was directed to the hole of a leaded apron that was used to protect the rest of the animal body from the electrons radiation. All the tissues were submitted to treatment by silver impregnation, in order to study collagen formation and maturation, and histochemical reaction by toluidine-blue aqueous solution at pH 4, for the evaluation of GAG production, as well as its association to the collagen macromolecules. HE was employed to study the morphology of granulation tissue. The results showed a delay in the repair of the tissues irradiated just after the wounding and mainly at the 3rd day of formation; however, at the end of the experimental period, all the tissues presented very similar characteristics, which indicated that the delay was temporary.

INTRODUÇÃO

O ser humano sempre esteve exposto às radiações ionizantes de baixa intensidade, oriundas dos raios cósmicos e elementos radioativos da Terra. A partir do momento em que estas radiações passaram a ser produzidas artificialmente e em grande escala e seus efeitos danosos nas células vivas puderam ser melhor observados, teve início um novo ramo da ciência - a radiobiologia.

As pesquisas demonstram efeitos biológicos bastante variáveis para os vários tipos e doses de radiações ionizantes, para os diversos tecidos e células do corpo humano, com conseqüências variáveis, como danos reparáveis, morte celular, mutações genéticas, aberrações cromossômicas e transformações malignas.

Apesar do conhecimento dos efeitos danosos aos seres vivos, os raios ionizantes trazem informações diagnósticas importantes e servem como medidas terapêuticas das quais não podemos prescindir, tendo em vista serem maiores os benefícios obtidos. Pesa sobre o profissional a responsabilidade da indicação da administração da radiação, calculando o risco e o benefício, assim como o melhor momento para aplicação da radioterapia ou da realização de tomadas radiográficas. O problema da decisão assume maiores proporções quando há anteriormente perda tecidual e o processo de reparo encontra-se instalado buscando reparar o dano, devendo permanecer imperturbado.

Tecidos parenquimais, como a pele, após sofrerem perda tecidual, passam a depender da regeneração ou reparação do estroma para que a normalidade seja restituída. O estroma, constituído por tecido conjuntivo como um todo, assim como as células endoteliais dos pequenos vasos que aí se encontram, ocupam posição intermediária entre as 4 categorias de sensibilidade á radiação ionizante das células parenquimais, consideradas por Casaret em 1963.

As células do estroma do tecido conjuntivo permanecem em estado quiescente, sendo consideradas células estáveis, dividindo-se somente em intervalos irregulares para manter a população ou na presença de estímulos específicos como a perda tecidual. Algumas vezes, durante o período de intensa divisão celular e atividade metabólica para reparar o dano causado pela perda tecidual, faz-se necessária a exposição do local à radiação ionizante com a finalidade de obter-se maiores informações por meio de radiografias ou tomografias, ou ainda o uso de radiação com finalidades terapêuticas, que sabidamente interferem com a reparação. Mas os danos trazidos aos tecidos dependem de inúmeras variáveis como dose, tipo de radiação, forma de administração da dose, tempo de reparação no qual o tecido é atingido pela radiação; além de outras variáveis.

O tecido conjuntivo em reparo tem mostrado alterações quando é irradiado, embora não seja determinado se a causa reside nas alterações vasculares ou dos fibroblastos ou ainda em ambos. O tecido de granulação, formado por inúmeros pequenos vasos e vários tipos de células, busca pela fibroplasia restaurar a continuidade e a forma de todo tecido lesado, e suas células apresentam aspectos de intensa atividade como: migração, proliferação e diferenciação. Esse tecido deve permanecer imperturbado ou ser auxiliado por fatores que favoreçam sua evolução, devendo ser evitados aqueles que possam prejudicar a restauração da integridade tecidual, como as radiações ionizantes, às quais é muito sensível devido às intensas atividades mitótica e metabólica que acentuam a radiosensibilidade inerente ao tecido conjuntivo.

A extensão da interferência das radiações ionizantes na reparação é influenciada por vários fatores, dentre eles, o tipo de radiação, a dose, o número de doses e o tempo transcorrido entre a perda tecidual e a administração da radiação, que podem impedir ou alterar o tempo gasto para a restauração da continuidade tecidual, além de também alterar as características dos tecidos formados.

Embora os efeitos danosos não possam ser evitados, o uso de radiações ionizantes com objetivos terapêuticos ou diagnósticos busca tirar partido da capacidade dos tecidos normais resistirem ou repararem os danos.

Algumas investigações sugerem que a irradiação diminui a reação inflamatória favorecendo a proliferação do tecido conjuntivo e epitelial durante a reparação, enquanto outras consideram haver somente efeitos prejudiciais.

Apesar de inúmeros estudos e da farta literatura, a radiobiologia apresenta ainda maior número de perguntas do que de respostas para os tecidos irradiados.

REVISTA DA LITERATURA

Revendo a bibliografia ao nosso alcance, pudemos observar a grande preocupação dos pesquisadores em procurar conhecer os efeitos causados pelas radiações ionizantes nos tecidos

O efeito dos raios X de 2 comprimentos de ondas diferentes - 0,34 Å e 0,18Å- em tecidos de reparação de feridas excisionais, não suturadas, irradiadas com 1000R, antes ou após a realização de feridas, foi estudado por POHLE *et al.*

em 1931. No 1^0 grupo, as irradiações ocorreram 1, 3, 7, 10, 14, 21 ou 30 dias antes da cirurgia e, no 2^0 grupo, as feridas foram irradiadas imediatamente, ou 24, ou ainda 48 horas após a cirurgia. A remoção de tecido para biópsia e análise deu-se aos 7 dias após a cirurgia ou após a cicatrização. Concluíram não haver diferença no tempo de reparação das feridas em locais previamente irradiados. Quando comparados aos respectivos controles, os grupos irradiados após a cirurgia mostraram retardo e alterações morfológicas, principalmente quando a irradiação se deu 24 horas após a cirurgia. Ao final do processo de reparação, não houve diferenças significativas entre os grupos experimentais e controles.

O significado clínico de estudos experimentais realizados em animais de laboratório, questionado por alguns cientistas, foi estudado por HOWES & HARVEY (1935). Os autores concordaram que possam ser feitas generalizações dos resultados obtidos, em estudos experimentais sobre reparação tecidual, quando controladas as variáveis, embora o rato não esteja sujeito às vicissitudes humanas. Nesse estudo utilizaram a força de tensão como parâmetro, pela sua capacidade de mensuração. Em relação à reparação tecidual, verificaram que a fibroplasia iniciada abruptamente por volta do 4° dia continua com velocidade diminuída até a fase de resistência máxima, atingida por volta do 12° ao 14° dia; no 6° dia, a resistência atinge 1/3 e, no 8° dia, 2/3; e que estes fatos são comuns a todos os tecidos e animais. Concluíram que fatores locais não inibem o crescimento de fibroblastos, mas que podem causar retardo no surgimento da fase de fibroplasia, devido a uma reação exsudativa excessiva, e que os distúrbios na reparação podem ser devidos a alterações sistêmicas profundas. Sugeriram que a fase de diferenciação das células indiferenciadas varia de acordo com a espécie e taxa de diferenciação embriológica. Concluíram, também, que os fibroblastos originam-se de células surgidas no processo exsudativo inicial e não do tecido adjacente fixo.

POHLE *et al.* (1949) estudaram o efeito dos raios X na reparação de feridas incisionais as quais tiveram suas bordas aproximadas por grampo. Compuseram 3 grupos de ratos assim divididos: no 1^0 grupo, 18 ratos foram estudados macroscopicamente 14 dias após utilizarem as doses de 150R, 350R e 700 R logo

após a realização das feridas; o 2^0 grupo, composto por 90 ratos, foi dividido primeiramente em 3 subgrupos nos quais ministraram as doses de 150R, 300R e 700R, sendo que metade de cada subgrupo foi irradiada imediatamente após a realização das feridas e a outra metade após 24 horas. Os períodos para a coleta do tecido de reparação foram de 3, 5 e 7 dias para cada um dos 5 ratos que compunham os sub- grupos. O 3^0 grupo, formado por 32 ratos, foi dividido para receberem as doses de 10R e 25R, nos tempos de irradiação: imediatamente e 24 horas após a cirurgia, e que foram analisados 3 e 5 dias após a incisão. Para compor o grupo controle, foram utilizadas porções cefálicas ou caudais das feridas irradiadas (sem que os autores fornecessem dados quanto à proteção do restante da ferida). Os autores atribuíram as diferenças no tempo de reparação do 1^0 grupo às diferenças observadas na aproximação das bordas das feridas e eventual ocorrência de processos infecciosos, mas não às diferentes doses de irradiação. O 2^0 grupo, o qual foi submetido à análise histológica em que a reação fibroblástica nas margens das feridas foi o critério mais relevante, também não foi conclusivo quando considerados os diferentes tempos nas diversas doses. O atraso ou aceleração no processo de reparação foi também atribuído à aproximação das bordas das feridas; embora os autores notassem que os grupos irradiados com doses mais altas apresentavam-se em desvantagem em relação aos controles. Em relação às baixas doses, os autores concordaram com a importância da aproximação das bordas das feridas e sugeriram que, em alguns casos, quando este fator deixa de ser preponderante para explicar a aceleração na reparação, as baixas doses não afetam a real produção dos fibroblastos mas reduzem a produção do exsudato inflamatório. Pelos métodos comuns de microscopia utilizados, não foi verificada evidência de estimulação da reparação, como foi encontrada por pesquisadores anteriormente.

O crescimento característico de fibroblastos na reparação tecidual, foi estudado por SCHILLING *et al.* (1953), pela introdução de esferas de malhas de tântalo, em 75 cobaias. Os animais foram sacrificados em intervalos de tempo que compreenderam períodos variandode horas a meses. Os tecidos obtidos do interior e da periferia das malhas foram analisados microscopicamente e cultivados para

observação do comportamento dos fibroblastos em proliferação nos vários períodos durante a reparação. Os espécimens observados pela microscopia eletrônica e fotomicrografia mostraram que a proliferação dos fibroblastos iniciou-se nas 24 ou 36 horas após a implantação das esferas; nos 6 dias seguintes houve aumento marcante no número de fibroblastos e do 7° ao 13° dia, os fibroblastos continuaram a deposição de colágeno e havia redução do processo inflamatório agudo. No período do 14° ao 20° dia, quando a quantidade de citoplasma dos fibroblastos mostrou-se diminuída, a deposição do colágeno foi proeminente. Na 4ª semana, os autores relataram predominância de colágeno e substância fundamental. Nesse período, ou até 6 semanas após o início da reparação, foi observado desaparecimento da atividade dos fibroblastos. A perda de crescimento potencial dos fibroblastos foi evidente no 4° mês.

PUCK & MARCUS, em 1956, estudaram a ação da radiação X em culturas de células HeLa. As células não irradiadas mostraram 100% de competência para formar colônias. As placas irradiadas mostraram atraso na formação de colônias, e os autores verificaram que células HeLa letalmente danificadas podem não cessar a atividade de multiplicação imediatamente após a irradiação, mas nas 5as ou 6as gerações subsequentes. Verificaram, também, que a dose de 100R causam atrasos visíveis no crescimento. A formação de células gigantes foi observada em grande proporção em qualquer dose de irradiação. Os autores sugeriram que a radiosensibilidade acentuada das células HeLa pode contribuir para a determinação da dose letal média para irradiação de corpo todo em mamíferos.

As mudanças no tecido de granulação que levam à contração da ferida foram estudadas por GRILLO *et al.* (1958), os quais pesquisaram a formação do colágeno, o encurtamento de suas fibras, a diminuição do conteúdo da ferida e outros mecanismos que puxam a massa do tecido de granulação. Feridas excisionais em cobaias tiveram os 4 cantos e os pontos médios entre eles marcados com tinta para tatuagem. Em intervalos de tempo até o 30° dia as feridas foram decalcadas em papel translúcido e a área foi medida com o auxílio de planímetro. O tecido neoformado foi posteriormente excisicionado para análise laboratorial e histológica.

Foi observada contração completa no 15° dia, sendo que em muitos casos o epitélio mostrou-se completamente formado antes da contração da ferida. Laboratorialmente foram determinados os valores de várias substâncias, na busca de explicar o fenômeno de contração, mas não foi possível determinar o mecanismo de contração, embora as dissecções tenham levado os autores a suporem que a região de contração ativa reside nas áreas marginais do tecido neoformado e limite da pele.

Em continuação ao trabalho anterior, ainda no ano de 1958, WATTS *et al.* procuraram localizar a força de contração da ferida em cobaias, que foram separadas em 5 grupos. Em um primeiro grupo retiraram a porção central do tecido de granulação de feridas excisionais , e em uma segunda parte foi feita nova remoção 3 dias após. Em um 2° grupo, todo tecido de granulação foi retirado com a base. No 3° grupo foram retiradas as margens do tecido normal e a periferia do tecido de granulação juntamente com a base. No 4° grupo foram retiradas apenas as margens da ferida com sua respectiva base. O grupo 5, além do tratamento recebido pelo grupo 2, teve as bases da fascia liberadas em torno de toda ferida, e em um sub-grupo, a liberação foi realizada diariamente até a ferida controle ter completado a contração, mas não sofreu remoção do tecido de granulação. Os experimentos foram realizados no 7° dia após a ferida e o fenômeno de contração foi mensurado com o auxílio de um planímetro. Os autores focalizaram a atenção na atividade marginal e concluíram que o tecido de granulação não interfere com a contração, mas que a excisão dos limites da ferida causava transtornos imediatos atrasando a contração e que a separação das margens da pele, avançando da base da ferida inibia a contração. Concluíram que a maior parte da contração de uma ferida aberta repousa nas margens da ferida e não na porção central do tecido de granulação ou na pele periférica ativamente envolvida, e finalizaram sugerindo ainda que outros fatores estariam envolvidos nas fases iniciais da contração.

A falta de restauração da continuidade em tecidos pode ser causada por agentes que interferem com a formação de brotos capilares. VAN DER BRENK (1959) usou 84 câmaras implantadas nas orelhas de coelhos para estudar *in vivo* brotos capilares irradiados com raios x e γ, em doses únicas, que variaram de 200R a

5000R, administradas entre o 7° e 10° dia após o aparecimento do blastema de reparação. O autor concluiu não ocorrerem alterações observáveis no crescimento dos brotos capilares em dose inferior a 400R, dano considerável nas doses entre 400 e 2000R, particularmente na faixa de 1000 a 2000R e nas altas doses (4000R) observou completa destruição e necrose na porção central do blastema de reparação. VAN DER BRENK ainda descreveu e ilustrou a formação de barreiras fibrosas avasculares e do fenômeno de super-regeneração, nas doses acima de 1000R. Observou, também, que os brotos capilares, sujeitos a irradiação, comportam-se de várias formas, quantitativa e qualitativamente. Concluiu que a exposição de vasos à radiação ionizante não é responsável pelo reparo inadequado subseqüentemente em resposta a injúria, mas que fatores indiretos, como alterações na forma do tecido, índice celular alterado, fibrilogênese, hialinização no estroma, comuns a todos tecidos conjuntivos atróficos, foram os responsáveis pelas alterações.

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

HARRINGTON, em 1960, investigou os efeitos de 50 a 500R de radiação X (ministrada 2 ou 3 dias em sub-culturas de fibroblastos), na divisão celular e síntese de ácidos nucleicos. A dose de 500R provocou inibição quase completa do

crescimento celular, apesar do pequeno número de morte celular. Pela incorporação de substâncias radioativas observou pronunciada queda no índice mitótico, até 105 minutos após a irradiação das células com 500R. Esse quadro permaneceu nas primeiras 13 horas, quando então houve aumento inesperado no número de figuras mitóticas (superior ao grupo controle) até o 4° dia; a partir daí houve nova queda para níveis inferiores a 40% do controle. O aumento do índice mitótico, a partir da 13ª hora, foi atribuído ao provável tempo gasto pelas células em mitoses abortivas, pois as células apresentavam aumento da fase M, mas poucas células conseguiram realizá-la. A queda de 50% na síntese de DNA ocorreu mais tardiamente (18 e 24 horas), após a irradiação com 500R, não podendo então ser responsável pela imediata inibição da mitose. Os resultados levaram HARRINGTON a crer que a inibição da síntese de DNA, que mostrou ser efeito específico e marcado da irradiação, resulta da inibição de mitose ou ocorrência de mitose abortiva.

Os resultados divergentes obtidos com altas doses de radiação , na opinião de YAMADA & PUCK, em 1961, seriam devidos à perda da capacidade reprodutiva das células e, por esse motivo, estudaram os efeitos das baixas doses de radiação X (0,34 a 1,35 Gy), quando somente as frações mais vulneráveis refletiriam um dano apreciável. A marcação do DNA de células HeLa S3 com timidina tritiada imediatamente após a irradiação, permitiram aos autores verificarem que as alterações na fase S não foram significativas, assim como não foi significativo o bloqueio de G1 para S. Mas foi observado bloqueio significativo na fase tardia de G2 e que o bloqueio era proporcional à dose. A queda na freqüência das figuras mitóticas ocorrida após a irradiação retornava ao normal depois de 2 horas para a dose de 34 rads, 5,5 horas para a dose de 68 rads e somente 11 horas após a queda para a dose de 135 rads. Propuseram que a falha mitótica reversível seja devida ao dano cromossômico , interferindo com a condensação dos cromossomos pouco antes ou na fase inicial da mitose.

A interligação entre as diversas fases do ciclo celular e a regularidade em que ocorrem, levaram TILL, em 1961, a estudar os efeitos da radiação ionizante sobre a fase M subseqüente quando administrada na fase S, tendo que em vista trabalhos

anteriores haviam demonstrado que o atraso radio-induzido na mitose causava atraso na fase S subseqüente. Culturas celulares de camundongo de cepa L em suspensão foram irradiadas com 2000 e 5000R. Logo após a irradiação foi observado atraso dose-dependente na mitose, sendo de 13 horas para a dose de 2000R e 20 horas para 5000R. Embora as figuras mitóticas reaparecessem no ciclo seguinte, a capacidade proliferativa das células parecia não ser restaurada, pois continuavam por 1 ou 2 ciclos e depois tornaram-se incapazes de proliferar. A duração do período G1-S foi aparentemente aumentada pela irradiação e não parece ter sofrido qualquer distorção nas primeiras horas após a irradiação. O movimento das células G2-M, após a irradiação parou rapidamente e o reaparecimento de figuras mitóticas foi marcadamente atrasado. Concluiu que a radiação ionizante parece causar aumento na duração dos estágios conhecidos do ciclo celular, e que G2 foi o período que sofreu maior influência dos efeitos da radiação.

O fenômeno de contração de feridas submetidas à ação dos raios X foi estudado por GRILLO & POTSAID, em 1961. Em feridas excisionais de cobaias irradiadas com 750R, o lado direito recebeu irradiação direta e o esquerdo foi protegido somente pela colimação, recebendo 1/7 a 1/10 da dose fornecida para o lado direito, em diferentes tempos, antes e após a cirurgia. Em uma 2ª parte, as feridas foram realizadas no lado direito, uma anterior à outra, separadas por uma distância de 3,5 cm, sendo protegida a ferida não irradiada. A irradiação foi centrada na ferida abrangendo 1 cm de sua periferia, 36 horas após a cirurgia. O critério usado para avaliação da contração; foi o delineamento das margens das feridas em papel transparente e mensuração com auxílio de planímetro. As feridas irradiadas mostraram atraso na contração, o período mais crítico à irradiação mostrou ser o compreendido entre 24 e 48 horas após a cirurgia. Nas amostras irradiadas indiretamente, os efeitos foram similares àqueles das irradiadas diretamente, mas as proporções do dano foram menores. Já as feridas protegidas não mostraram retardo na contração. Histológicamente, foram observadas alterações nas formas, tamanho e número dos fibroblastos, no padrão de orientação e formação das fibras colágenas e

inibição na proliferação capilar. Os efeitos mais dramáticos foram observados quando a irradiação foi ministrada entre 24 e 48 horas após a cirurgia, particularmente no tempo de 36 horas após.

A população celular e a formação de fibrilas foram estudadas pelas microscopias óptica comum e eletrônica por ROSS & BENDITT, em 1961. O período de estudo compreendeu as 16 horas iniciais até 14 dias após a realização de feridas incisionais, em cobaias. Nas primeiras 24 horas, os autores observaram aumento rápido no número de elementos representativos da fase aguda, sendo que, após o 3° dia, havia diminuição bastante rápida desses elementos. Pela microscopia comum, observaram grande aumento no número de fibroblastos no 6° ou 7° dia, sendo a formação ativa do colágeno observada no 5° dia, pelo aparecimento de fibras argirófilas. Por volta do 9° dia, concomitante à diminuição de fibroblastos, foi observada quantidade aumentada de colágeno espessado. Pela microscopia eletrônica, células caracterizadas por grandes, extensos e bem desenvolvidos retículos endoplasmáticos sugerindo síntese protéica, foram reconhecidas como fibroblastos nas 24 horas. No 3° dia, a fibrina e muitos leucócitos estavam presentes, além de grande população de macrófagos e pequeno número de fibrilas colágenas extracelulares. No 5° dia, as fibras colágenas apresentavam periodicidade característica. Com o aumento da idade da ferida, os fibroblastos mantiveram a morfologia, havendo ainda aumento da quantidade de fibras colágenas e diminuição do conteúdo celular.

As controvérsias encontradas na literatura, quanto à origem dos fibroblastos nos tecidos de reparação, levaram GRILLO, em 1963, a buscar esclarecer esse aspecto por meio de marcação do núcleo das células próximas à divisão, pela injeção de timidina tritiada em cobaias no 5° dia do processo de reparação. Trabalhos prévios haviam mostrado as alterações quantitativas devidas à irradiação da área e periferia de feridas excisionais. A irradiação X, na dose de 750 R, foi administrada 20 minutos antes e após a realização de feridas e 28 horas após a cirurgia. Pela técnica autorradiográfica, não foi encontrada marcação nas paredes capilares do tecido conjuntivo pré- existente longe do limite da ferida, assim como no

núcleo dos leucócitos, células mononucleares ou linfócitos. Enquanto isso, no tecido neo-formado, foram inúmeras as marcações de células mesenquimais, além de mais alta concentração de células marcadas em torno dos capilares e células endoteliais dos vasos neo-formados. O autor observou ligeira redução na gênese tecidual de células mesenquimais, quando a irradiação antecedia a excisão. Nos grupos irradiados após a cirurgia, as reduções foram significativas, sendo de aproximadamente 45% para o grupo irradiado 20 minutos após- cirurgia (antes do aparecimento do infiltrado celular do sangue) e de 53% no grupo irradiado após 28 horas. Os resultados levaram o autor a crer na origem local dos fibroblastos, se não totalmente, pelo menos predominantemente. Histológicamente, GRILLO verificou que as feridas irradiadas após 28 horas apresentavam menor quantidade de exsudato.

O fato de todos os órgão possuírem capilares circundados por células mesenquimais indiferenciadas com capacidade de se transformar em qualquer célula especializada de tecido conjuntivo, somado à capacidade dos órgãos formarem tecido de granulação, conduziram TOTO & ABATI, em 1963, a estudarem este processo em granulomas produzidos em ratos. Uma hora após a injeção de timidina tritiada, os ratos foram sacrificados diariamente entre o 1° e o 8° dia, bem como nos tempos: 2 semanas e 1 mês. Somente algumas células endoteliais e os fibroblastos foram marcados pela timidina. A presença de algumas células marcadas nos brotos capilares foi interpretada como sendo células do tecido conjuntivo indiferenciado de reserva perivasculares do tecido conjuntivo de reserva indiferenciado que proliferam e diferenciam-se para formar novos capilares no tecido de granulação. TOTO & ABATI chamaram a atenção para o fato de que somente as células indiferenciadas do tecido conjuntivo frouxo de reserva da derme e da camada sub- muscular foram marcadas, indicando que somente elas são capazes de proliferação para o desenvolvimento do tecido de granulação, e que a diferenciação em fibroblastos ocorre concomitantemente à produção de fibras e substância fundamental.

ROSSI, em 1964, buscou contribuir com a radiobiologia, sob o ponto de vista da física, para elucidar a absorção da energia primária. Reconheceu as limitações das informações obtidas pelas curvas dose-efeito, nas quais as hipóteses em

radiobiologia são testadas e baseadas. Reconheceu, também, que as curvas expressam as mais importantes informações quantitativas, mas ocupam-se somente do início e fim de uma cadeia de processos químicos, físicos e biológicos, e necessitem de grande cautela na interpretação. Considerou ser o LET de utilidade restrita, e que sua aproximação grosseira com o RBE, devido a determinados propósitos, é adequada, tendo-se em vista outras incertezas envolvidas.

WHITMORE & TILL, em 1964, reuniram conhecimentos sobre experimentos que buscam predizer o comportamento de populações celulares após a irradiação, e dos problemas que surgem quando são considerados os efeitos da irradiação em sistemas celulares complexos *in vivo*. Apresentaram uma nova proposta para interpretação de alguns resultados obtidos em experimentos, em nível celular, para mensuração dos efeitos da irradiação de células crescendo em condições controladas. Essa nova proposta permitiria o estudo do atraso na divisão celular, perda da capacidade reprodutiva e alterações na atividade metabólica em culturas de tecidos.

STORER, em 1964, verificou haver grande concordância quanto à existência de um período de latência, decorrido entre a exposição à radiação ionizante e a evidenciação dos danos histológicos e fisiológicos em mamíferos. Reconheceu a importância do fator ritmo de dose (dose única causando mais efeitos deletérios quando comparados aos causados pela mesma dose administrada de forma fracionada ou por longo período de tempo). O autor apontou os pontos positivos e negativos nos métodos usados para estimar a taxa de recuperação em mamíferos.

Os trabalhos anteriores sobre o local de origem dos fibroblastos foram resumidos por GRILLO, em 1964. O autor verificou que a maior dificuldade na identificação residia nas técnicas empregadas para o estudo, as quais conduziram às mais diversas conclusões. A origem vascular, embora demonstrada em numerosos trabalhos anteriores, parece não ser a fonte predominante dos fibroblastos. Por outro lado, a origem tecidual dos fibroblastos é fortemente sugerida pela intensa proliferação celular local no tecido conjuntivo lesado. Para GRILLO, a íntima relação entre as respostas proliferativas dos capilares e os fibroblastos torna impossível a

separação entre eles, concluindo ser o sistema capilar- fibroblastos nos mamíferos o sistema reparador primário; não sendo possível estabelecer se são os fibroblastos diferenciados ou as células mesênquimais em repouso que modulam os fibroblastos em resposta às injúrias.

ROSS & ODLAND (1968), pela técnica da microscopia eletrônica, estudaram o processo de reparação em feridas incisionais provocadas no tecido conjuntivo humano, para observarem os eventos que ocorrem em humanos e compará-los àqueles encontrados nos animais experimentais. Observaram similaridade no que diz respeito às respostas inflamatórias e fibrogênese de animais experimentais e humanos. Em humanos foram feitas observações da relação entre células epiteliais e células mesenquimais. Em relação às células mononucleares, sugeriram terem elas um papel significante na ingestão e digestão das proteínas extracelulares, mas não encontraram evidências de transformação em fibroblastos, baseados na escassez de retículo endoplasmático rugoso. Sustentaram a opinião de autores que sugerem ser os fibroblastos oriundos de células do tecido conjuntivo perivascular. Nas fases iniciais, nenhuma presença de fibroblastos foi observada, mas, antes disso, células semelhantes a fibroblastos, na forma imatura, foram vistas no tecido conjuntivo perivascular, e posteriormente mostraram grande desenvolvimento do retículo endoplasmático rugoso. O achado microscópico encontrado nas células humanas em reparação, que as diferenciou das células dos animais experimentais, foi o contacto entre as células epidérmicas das camadas basais em regeneração e as células mononucleares ativamente fagocitárias entre o 4° e 7° dia.

ROSS *et al.* (1970) encontraram, na literatura, a possível origem dos fibroblastos, a partir de leucócitos que sofreriam transformações durante a reparação tecidual. Para testar essa hipótese, utilizaram ratos parabióticos irradiando-os com 800R de raios gama (Co_{60}), para destruição dos tecidos hematopoiéticos, sendo que um dos animais teve o fêmur protegido para servir de fonte de células sangüíneas para os 2 animais. Feridas incisionais no dorso foram realizadas, nos dois animais, 3 dias após a irradiação. Neste tempo, o animal cujo fêmur foi protegido recebeu injeção de timidina tritiada. e provocada a parada da circulação sangüínea por 20 minutos; e o outro animal recebeu frio e a injeção da timidina não

radioativa. Os tecidos foram analisados 1, 2 e 6 dias após as cirurgias. No 6° dia todas as células dos animais protegidos apresentavam-se marcadas, mas os animais que não tiveram o fêmur protegido apresentavam somente linfócito, monócitos e leucócitos marcados. Devido a ausência de marcação dos fibroblastos nos animais não protegidos, foi interpretado que os fibroblastos não teriam origem nas células sangüíneas mas provavelmente no tecido conjuntivo.

A vascularização em feridas irradiadas foi estudada quantitativamente por DOTTO *et al.*, em 1970. As feridas na região dorsal dos ratos serviram como controle e as produzidas na região lombar foram irradiadas com raios X na dose de 6000 rads. A radiação foi ministrada imediatamente, 3 e 6 dias após ferimento e estudadas pela técnica de Wachstein & Meisel (método histoquímico para fosfatase alcalina) nos tempos 7, 14, 21, 35, 60 e 75 dias após a injúria. Em todos os grupos irradiados, observaram redução no desenvolvimento vascular. A depressão inicial da vascularização foi seguida por aumento (superior aos grupos controles), mas, ao final dos 75 dias, os grupos controle e irradiado exibiam o mesmo padrão e grau de vascularização indicando ser o atraso apenas temporário. Embora tenha sido observado o mesmo comportamento em todos os grupos irradiados, houve variação no tempo.

A produção e organização do colágeno foram estudadas por ARCHER *et al.*, em 1970, com o auxílio de prolina ^{14}C. O estudo foi realizado em feridas de ratos irradiados com raios X nas doses de 750R e 1500R após a sutura das feridas. As feridas compreendiam incisões do pescoço até a base da cauda sendo chamadas de feridas primárias. Os animais que sofreram irradiação com 1500R apresentaram diminuição da hidroxilação da prolina ^{14}C durante todo período experimental (1° ao 7°, 14° e 21° dias). No grupo irradiado com a dose de 750R, este fato foi observado somente até o 4° dia dos vários períodos de tempo estudados. Para o estudo da resistência à força de tensão foi acrescentado o sub-grupo irradiado com 1000R. As irradiações ocorreram em diferentes tempos após a ferida. No 7° dia as suturas foram retiradas e as feridas rompidas mecanicamente e suturadas novamente (feridas secundárias). Os tecidos irradiados no 3° dia pós- incisão demostraram maior sensibilidade, com depressão da força de tensão nas feridas secundárias com a

dose de 750R. Efeitos danosos foram observados com as outras doses e mostraram-se proporcionais a elas. Entre as conclusões dos autores constou a de que uma única dose de radiação inibe a hidroxilação da prolina, sendo que o grau e a duração da inibição são doses dependentes.

Os fibroblastos responsáveis pela produção das moléculas de protocolágeno são também responsáveis pela síntese dos glicosaminoglicanas que agregam as moléculas de colágeno para formar as fibras colágenas. VIZIOLI, em 1971, para estudar a organização macromolecular em tecidos de granulação, utilizou-se da implantação de esponjas de polivinil em ratos, para determinar o momento no qual ocorria a associação orientada entre fibras colágenas e as moléculas de GAGs através da metacromasia e do dicroísmo, para o tecido conjuntivo da cápsula fibrosa e tecido de granulação no interior das esponjas, que tiveram o mesmo padrão de desenvolvimento. A metacromasia estava presente no primeiro tempo de observação (3 dias), atingindo seu máximo do 7° ao 10° dia e diminuindo no 13° dia permanecendo até o último dia de observação (28° dia). O período de aparecimento do dicroísmo coincidiu com o período no qual houve o máximo da reação de metacromasia (7° dia), permitindo ao autor supor que a organização máxima do tecido somente é estabelecida quando a síntese de GAGs ácidos atinge seu máximo e que a organização final do tecido se dá em torno de 2 semanas após a implantação das esponjas.

Para BACCHETTI & SINCLAIR (1971) ficou bem estabelecido, em culturas sincronizadas, que a síntese de DNA é afetada se células de mamíferos forem expostas à radiação ionizante, principalmente se forem irradiadas durante a replicação; e que irradiação na fase G2 leva a atraso na divisão parecendo não impedir a síntese normal de DNA no ciclo subseqüente. Os autores estudaram os efeitos dos raios X na síntese do RNA e outras proteínas e a ação da cicloheximidine, nas 4 fases do ciclo celular, por serem poucos conhecidos. Irradiaram culturas sincronizadas de hamsters chineses, com dose de 710 rads de raios X em única dose. As culturas foram estudadas quanto aos efeitos bioquímicos da radiação; foi também determinada a capacidade de formar colônias e o atraso na divisão celular. Os achados em relação à síntese de DNA confirmaram dados já

encontrados e relatados na literatura, inclusive o bloqueio na fase G2. A síntese de RNA e outras proteínas foi estimulada em todas as fases do ciclo; os autores sugeriram que a síntese extra de proteínas parece ser necessária para que as células retomem a divisão. A adição de ciclohexemide inibiu a síntese de DNA, RNA e outras proteínas, e na sua remoção, não ocorreu diferença significativa. Observaram que a interferência da radiação com a síntese protéica de células irradiadas prolonga o atraso na divisão, mas protege as células quanto à capacidade de formar colônias.

JOVANOVIC, em 1974, fez breve revisão sobre os danos causados pela irradiação, aos constituintes não celulares do sistema vascular. Encontrou que, além de alterações físico- químicas características, existem alterações provocadas por substâncias vasoativas que causam extravasamento de plasma, pelo aumento da permeabilidade da membrana basal da túnica adventícia. JOVANIC resumiu os efeitos instantâneos e tardios de despolimerização causados pela irradiação, sobre os mucopolissacarídeos mesmo em baixas doses (1 ou 2 rads), e a variabilidade do tempo de duração do processo . A fragmentação de fibras elásticas e as alterações da permeabilidade permitem o extravasamento de água e alguns solutos, na proporção inversa ao conteúdo de mucopolissacarídeos. Ao final, cita drogas radioprotetoras como o tiosulfato, 5- hidroxitriptamina e cistemina.

TEN-CATE & FREEMAN (1974), pela microscopia eletrônica, estudaram em biópsias de 14 dias o remodelamento em feridas incisionais e excisionais na pele de ratos, tendo como controle tecido sadio retirado das adjacências da ferida. Estudaram 3 zonas nas peças histológicas, chamaram de zona do tecido conjuntivo velho, zona do tecido conjuntivo novo (o tecido formado após as incisões) e zona juncional (zona de transição entre o velho e o novo). Encontraram, na zona de tecido conjuntivo velho, características semelhantes às do tecido controle, feixes de tecido conjuntivo denso arranjados em lamelas e fibroblastos contendo quantidade moderada de retículo endoplasmático rugoso e complexo de Golgi. O tecido conjuntivo novo exibia fibrilas de colágeno dispersas e não ainda agregadas em feixes, os fibroblastos continham grande quantidade de retículo endoplasmático rugoso e os contornos numerosos complexos de Golgi, características de células em

fraco período de síntese. Na zona juncional, os fibroblastos em seus interiores exibiam presença de numerosos contornos contendo colágeno e colágeno enrolado, com freqüente polarização da célula, enquanto o outro polo exibia retículo endoplasmático rugoso e complexo de Golgi. Os achados indicaram ser o fibroblasto o responsável pela síntese e degradação do colágeno na derme, assim como anteriormente verificado para o ligamento periodontal, na qual a maior taxa de remodelação facilita as observações. Sugerem que os fibroblastos da pele, assim como do ligamento periodontal, têm a propriedade de fagocitar e degradar seu próprio produto, o colágeno.

VIZIOLI (1975) pesquisou a presença de enzimas durante a gênese do tecido de granulação, utilizando-se da introdução de esponjas de policlorovinil (PVC) no dorso de 112 ratos. As análises dos tecidos foram realizadas do 5° ao 40° dia com intervalos regulares de 4 dias. Os tecidos sofreram os devidos tratamentos para serem analisados por várias técnicas: HE (análise morfológica), radioautografia (síntese de colágeno), histofotométrica por meio da coloração metacromática pH4 (síntese de mucopolissacarídeos), técnicas histoquímicas para pesquisa de fosfomoesterases (fosfatase ácida, fosfatase alcalina, adenosin- trifosfatase, 5'-nucleotidase e glucose 6- fosfatase). Os resultados mostraram que a síntese de colágeno e mucopolissacarídeos iniciada nos primeiros 5 dias atingiu seu máximo entre o 15° e o 20° dia, sendo acompanhadas pelo aumento da fosfatase alcalina. As enzimas ATPase e 5'- nucleotidase tiveram suas atividades aumentadas entre 15 e 20 dias, período de alto gasto energético, e a fosfatase ácida e a glucose 6- fosfatase estariam ligadas aos macrófagos, sendo que a fosfatase ácida pareceu não participar do processo de reparação. O autor relacionou o aumento da fosfatase alcalina ao aumento da síntese do colágeno e dos mucopolissacarídeos, demonstrando sua importância na agregação do complexo colágeno- mucopolissacarídeos ácidos, assim como a brusca queda sofrida por esta enzima quando o granuloma já se mostrava organizado.

A necessidade da irradiação da pélvis, após laparotomia, em casos de tumores malignos, levou BLYTHE *et al.*, em 1975, a estudarem, em animais, o efeito da dose de 1000R de raios X em incisões que tiveram suas bordas reaproximadas

por suturas interrompidas, no dorso de 175 ratas. A irradiação foi administrada logo após a cirurgia, assim como no 3° e 5° dia; e os animais sacrificados nos tempos 8, 13, 18 e 23 dias, para serem analisados por métodos histológicos e resistência à tensão. As feridas não irradiadas mostraram maior resistência à força de tensão quando comparadas às irradiadas, que não apresentaram diferenças significativas entre si quando irradiadas nos vários tempos, mas a resistência mostrou-se menor no 8° dia para as feridas irradiadas imediatamente e 3 dias após as incisões. Histológicamente, as feridas mostraram depressão da atividade dos fibroblastos e inibição da proliferação e desorganização da arquitetura do reparo, sendo mais marcante nas feridas irradiadas no 5° dia. Concluíram que o atraso do tempo da irradiação não altera os parâmetros - força de tensão e aparência histológica - em feridas irradiadas.

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

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

SUMI *et al.* (1983) examinaram a reação de enxertos à irradiação procurando determinar o melhor tempo para irradiação, pelas alterações vasculares no enxerto. As feridas foram realizadas na pele dorsal de 190 ratos, as peles para enxerto removidas do abdome. As irradiações, com doses de 1000 e 1500 rads de raios X usados em terapia superficial, no regime de dose única, ocorreram nos períodos de 2 dias, 4 dias,1, 2, 3 e 6 semanas após a colocação do enxerto. As reações da pele normal e enxertada, assim como da pele circunjacente, foram verificadas diariamente ao longo de 12 semanas; os exames microangiográficos foram realizados no 2° e 4° dias e com 1, 2, 3 e 6 semanas após o enxerto. O exame das peles normais e irradiadas no 2° dia mostraram crescimento de pelos na 3ª semana; os efeitos mais severos foram das feridas irradiadas no 4° dia e a partir daí havia diminuição da reação; a severidade do dano para as duas doses usadas no experimento obedeceu à seguinte ordem decrescente: 4 dias, 1, 2, 3 semanas, 2 dias e 6 semanas. Estas observações levaram os autores a sugerir que a irradiação clínica deveria iniciar-se na 3ª ou 4ª semana após o enxerto, por serem as fases iniciais do processo de reparação mais sensíveis à irradiação do tecido; mas chamam atenção para o período de 2 dias, quando a reação foi similar a da pele normal e atribuídas à hipovascularização do enxerto e de seu leito. Os autores concluíram que o grau de vascularização do enxerto e do leito são responsáveis pela reação tecidual à irradiação.

LUCE (1984), em um simpósio sobre reparação de feridas, concluiu que a reparação de feridas irradiadas está na dependência de fatores como características do tecido patológico, prejuízo trazido aos tecidos pela dose, tipo e profundidade da irradiação; e que o sucesso clínico da radioterapia depende do efeito letal sobre as células tumorais e subletal nos tecidos normais. O autor salientou, também, a necessidade de aumento da dose de radiação em sessões subseqüentes à primeira, levando à necrose tecidual. LUCE expressou também seu pensamento de que as alterações mais significativas nos tecidos irradiados são devidas à diminuição no suprimento sangüíneo pela obliteração dos vasos, e que este fator sobrepor-se-ia a outras adversidades como a má nutrição e contaminação dos tecidos. Considerou também que as complicações trazidas pela radioterapia (como a ruptura de carótida

nas irradiações de cabeça e pescoço) comprometem mais a sobrevida de pacientes irradiados quando comparados aos que não receberam radiação; ao final sugerindo conduta terapêutica para as úlceras provocadas pela radiação.

MOORE (1984), ciente da necessidade do uso conjugado de cirurgia e irradiação, nos casos oncológicos de cabeça e pescoço, teceu considerações e fez breve revisão, durante o simpósio sobre reparação de feridas. Entre as duas fontes de radiação ionizantes mais utilizadas, cobalto 60 e elétrons produzidos pelos aceleradores lineares, o autor reconheceu as vantagens do emprego de elétrons, pois os aparelhos podem produzir feixes altamente definidos limitando o volume de tratamento em relação ao cobalto 60, necessidade de menor tempo de exposição (havendo menor chance de movimentação do paciente), e permitem penetração em uma profundidade específica e proporcional a energia do feixe poupando os tecidos subjacentes e contralaterais. Salientou que a interação feixe-célula produz radicais livres, íons altamente carregados, que interagem com as células, causando a morte reprodutiva; o autor também reconheceu que nas fases mais agudas as alterações epiteliais são mais evidentes e obscurecem as alterações do tecido vaso-conjuntivo. Nas fases crônicas, as alterações do tecido conjuntivo, a avascularidade e a fibrose, são progressivas, irreversíveis e dose dependentes. Considerou, ainda, as conseqüências das irradiações pré ou pós operatórias em função do tempo transcorrido entre elas e a relação dose-efeito.

As informações da literatura acerca dos efeitos da radiação, em tecidos de granulação, e a relação com a radionecrose levaram GUIDUGLI NETO (1987) a estudar os efeitos de altas doses de raios X (2000R), em tecidos de granulação com 6 dias de formação em 20 ratos. Para estimular a formação do tecido, realizou feridas circulares de 1 cm de diâmetro, e para proteção do resto do corpo dos animais usou proteção de Pb tendo uma abertura de 2 cm de diâmetro, permitindo, desta forma, que uma área de tamanho superior a ferida fosse irradiada; outros 20 ratos foram usados para controle. Os tecidos foram coletados e analisados nos períodos de 1/2, 3, 6, 12 horas e 3, 7, 15, 30 dias após a realização das feridas. Foram contados os pontos que correspondiam aos vasos superficiais incluindo alças e brotos capilares ,sendo observada uma diminuição na quantidade de vasos,

principalmente do 1° ao 7° dia. Pelo crescimento de vasos na porção superficial, concluiu que a hipervascularização não ocorreu, mas sugeriu que os achados de hipervascularização relatados na literatura podem ser devidos ao crescimento de vasos profundos.

RUDOLPH *et al.* (1988), partindo do pressuposto de que as alterações teciduais na reparação de tecidos previamente irradiados seriam causadas pela oclusão dos pequenos vasos, estudaram a proliferação de fibroblastos, em culturas celulares da pele de 4 pacientes que haviam recebido tratamento radioterápico. As células foram obtidas em três áreas distintas: úlcera, tecido irradiado sem ulceração, área não irradiada de outra região do corpo do paciente para servir como controle. Os autores entenderam ser a cultura tecidual a melhor forma para estudo, pois a proliferação de fibroblastos não dependeria da nutrição fornecida pelos vasos. Os fibroblastos obtidos dentro dos limites das úlceras não apresentaram crescimento em nenhum caso; os fibroblastos da área irradiada sem ulceração, em pelo menos metade dos casos, por volta do 7° ou 10° dia foram capazes de produzir fibroblastos nas culturas enquanto que os fibroblastos da pele normal produziam-nos em 4 ou 6 dias. Em um único caso a produção de fibroblastos da área irradiada foi próxima à produção do controle, sendo o doador, o único do qual se tinha conhecimento sobre a radioterapia previamente empregada (irradiação por elétrons); embora não se tenha conhecimento do tratamento radioterápico dos outros pacientes, os autores suspeitaram de outros tipos de radioterapia em função da profundidade dos tumores. Os autores sugeriram que a radiação em doses terapêuticas causa danos significativos e permanentes aos fibroblastos e resulta num atraso no aparecimento de miofibroblastos em feridas abertas, ou uma ablação de sub- populações de fibroblastos que independem da diminuição do suprimento sangüíneo.

A influência de um dos fatores de crescimento derivados de plaquetas (PDGF-BB) aplicado no local de incisão mostrou-se potente agente quimiotático e fator mitogênico para células derivadas do mesênquima. MUSTOE *et al.*, em 1989 pesquisaram a ação do fator, em ratos irradiados com 48 horas antes da realização de feridas. Alguns animais foram irradiado corpo todo com raios gama, com a dose sub- letal de 800 rads, procurando poupar, desta forma, os fibroblastos da derme dos

ratos que receberam a dose de apenas 200 rads; neste grupo, os elementos derivados da medula óssea foram severamente deprimidos pela irradiação e não houve efetividade no tratamento com PDGF-BB. Os autores sugeriram que existe necessidade de células derivadas da medula óssea para que este fator de crescimento possa exercer sua atividade. Para irradiação prévia do local da incisão, foram utilizados elétrons na dose de 2500 rads com 6 MeV de energia; com este tipo de irradiação, o objetivo foi poupar o sistema hematopoiético, e estudar a ação da radiação nas células de origem mesenquimal. Os dados histológicos e tensométricos mostraram os benefícios do uso de PDGF-BB para reverter o quadro de prejuízo causado pela irradiação local. Concluíram que o PDGF-BB requer a presença de células derivadas da medula óssea para sua atividade e que pode ser útil como agente tópico nas incisões pós- cirúrgicas, e que este fator não ativa diretamente os fibroblastos a produzirem colágeno.

BAKER & KROCHAK, em 1989, realizaram revisão sobre a resposta do sistema microvascular à radiação. Encontraram que as células endoteliais, assim como as células do estroma de suporte, sofrem divisão somente para manter a população ou quando solicitadas por estímulos específicos ou pelas injúrias da irradiação. São consideradas de radiosensibilidade intermediária, entre as células estáveis e células tronco. Diante de baixas doses de radiação ionizante, a primeira resposta apresentada pelos pequenos vasos sangüíneos é o aumento transitório na permeabilidade, causado pela despolimerização da substância cimentante de mucopolissacarídeos e a liberação de aminas vasoativas. Em relação ao tecido de granulação, os autores encontraram que fatores como o baixo pH, hipóxia do tecido antes da total vascularização e possíveis fatores neuroendócrinos têm a capacidade de reduzir a radiosensibilidade desse tecido.

MILLER & RUDOLPH (1990) consideraram as alterações macroscópicas ocorridas em locais que sofreram irradiação com finalidade terapêutica. Na literatura encontraram restar a dúvida se essas alterações seriam devidas aos problemas vasculares ou às alterações nos fibroblastos. Recomendaram os cuidados e tratamentos locais e apontaram as alternativas de tratamento.

A não formação de cicatriz na reparação em fetos tem sido alvo de pesquisas. SIEBERT *et al.* (1990), por meio de várias análises (histológicas, cromatográficas, microscopia eletrônica, eletroforese e análise de amino ácidos), tendo como modelo experimental feridas em fetos de coelho, compararam a cicatrização de coelhos adultos. Após coleta de material feita do 4° ao 7° dia após a cirurgia, encontraram a presença de hidroxiprolina e hidroxilisina no 7° dia de reparação, confirmando a presença de colágeno, sendo que esta substância não foi encontrada por outros pesquisadores. A diferença na periodicidade das fibras do colágeno formado durante a reparação, quando comparada ao colágeno normal, foi atribuída a artefatos de técnica. Os autores discordam do fenômeno de regeneração, por terem encontrado diminuição no número dos apêndices cutâneos, mas suportaram a hipótese de um alto grau de reorganização tecidual. Pela eletroforese, foi verificado ser a reparação de feridas fetais composta quase totalmente pela glicosaminoglicana específica-ácido hialurônico, que atualmente acredita-se estar relacionada à melhora na qualidade da reparação.

O uso de elétrons no tratamento de quelóides e cicatrizes hipertróficas, que tendem a reincidir mesmo após a remoção pela cirurgia plástica, foi estudado por LO *et al.* (1990). Realizaram levantamento do sucesso conseguido em lesões tratadas com feixes de elétrons com baixa megavoltagem (1,5 e 3,5 MeV). As irradiações foram usadas com objetivos terapêuticos ou preventivos. Os locais irradiados profilaticamente com doses variáveis de 8 a 20 Gy não desenvolveram lesões hipertróficas. Não houve diferença estatísticamente significante no sucesso das lesões, que após a cirurgia para remoção receberam doses de 9 ou mais Gy (82 a 90% de sucesso); nas doses inferiores a 8 Gy o sucesso foi obtido em 14% dos casos e com 8 Gy em 57%. A taxa de sucesso foi menor quando a irradiação não foi antecedida por cirurgia (48%), e, nos casos em que a cirurgia precedia a irradiação, o êxito foi obtido em 87%. Não foi observado o aparecimento de lesões malignas secundárias nos pacientes seguidos por mais de 30 anos.

As microcirurgias vasculares que se realizam após a colocação de retalhos cirúrgicos, em cirurgias reconstrutivas, têm seus resultados questionados quando o leito receptor é previamente irradiado. AITASALO *et al.*, em 1992, formaram grupos

de ratos que tiveram 3 cm de suas peles das virilhas direitas expostas a feixes de elétrons com energias de 6 Mev, na dose de 20 Gy em uma única fração, na semana que precedeu a transferência do retalho, no grupo leito irradiado. Ao final de 30 dias, histologicamente , foram observadas alterações na organização do colágeno e espessura do tecido perivascular; a força de tensão mostrou-se significativamente diminuída e as avaliações bioquímicas demonstraram aumento na concentração de proteínas refletindo acúmulo excessivo de matriz orgânica e diminuição relativa no número de células no tecido recipiente pré-irradiado. Os autores concluíram não haver maiores diferenças na capacidade de reparação de retalhos de pele livres na microcirurgia vascular entre áreas recipientes irradiadas ou não.

A eficácia da aplicação tópica do fator de transformação do crescimento- TGF $ß_1$ na aceleração da reparação de tecidos moles foi estudada por CROMACK *et al.*, em 1993. Cientes dos efeitos nocivos da irradiação na reparação tecidual, os autores usaram-na para o estudo da substância. Um grupo de ratos recebeu irradiação em todo corpo, por raios γ na dose de 800 rads, e a dose na pele desses animais foi medida ser de 360 rads,os outros receberam irradiação por elétrons na superfície da pele na dose de 2500 rads; as irradiações ocorreram 2 dias antes das incisões serem realizadas. Nas amostras irradiadas, foi verificado déficit na reparação nos tempos estudados, 7 e 12 dias. Apesar da supressão do sistema hematopoiético, nos animais irradiados corpo todo, o TGF $ß_1$ acelerou o reparo e aumentou a força das feridas, demonstrando capacidade de induzir diretamente a síntese de colágeno, apesar das alterações hematológicas verificadas laboratorialmente; nos animais que tiveram a superfície irradiada, as alterações nos fibroblastos foram de tal ordem que não houve reversão do quadro. Os autores concluíram que o TGF $ß_1$ atua por mecanismos diretos na síntese do colágeno durante o reparo tecidual.

BERNSTEIN *et al.* (1993) realizaram revisão da literatura acerca da ação ionizante da radiação na pele, pois desde o início da utilização de radiação com finalidade terapêutica, a pele tem servido de guia orientador nos tratamentos radioterápicos que buscam eliminar células tumorais e preservar tecidos normais. Chamaram atenção para o fato de ainda não se saber exatamente qual seja o alvo crítico na célula, mas que existem fortes evidências que apontam o DNA como sendo

o alvo chave. Os autores levantaram os aspectos físicos, biológicos da radiação e parâmetros de tratamento. Os efeitos da radiação na pele foram estudados em relação aos queratinócitos, melanócitos, fibroblastos, colágeno, vascularização, apêndices cutâneos, alterações agudas e tardias; consideraram também o tecido de reparação e o efeito carcinogênico.

As bases moleculares do atraso na divisão celular, após a administração de radiação ionizante, foram revistas por MAITY *et al.*, em1994. Encontraram que os eventos subseqüentes à irradiação dependem da dose: em doses relativamente altas (>5 Gy), não há detenção na fase G1, ocorrendo atraso na fase S e detenção na fase G2; em doses baixas e até mesmo em doses inferiores a 1 Gy, a detenção é verificada na fase G2. As evidências apontam para a hipótese de que o dano causado pela radiação é reparado em G2; registros na literatura vêm ao encontro desta hipótese, pois quando a detenção em G2 ocorre por menor tempo, a sobrevida das células é diminuída. Após a revisão, os autores concluíram que o entendimento dos mecanismos moleculares podem levar a melhoras na eficácia da radioterapia.

YANASE *et al.* (1993) analisaram, em culturas de fibroblastos humanos irradiados, o fenômeno de contração e taxa de crescimento; justificaram a preferência pela cultura de tecidos, pois assim procedendo, seria eliminada a possível influência da irradiação sobre os vasos. Os fibroblastos foram obtidos da mucosa bucal de pacientes submetidos a cirurgias orais. As culturas, pelo método cultura tri-dimensional, foram submetidas a irradiações X no regime dose única de 2, 4, 6, 8 e 10 Gy na fase logarítmica de proliferação, para comparação da taxa de crescimento em culturas controles e irradiadas; os tempos de análise foram imediatamente, 2 e 8 semanas após a irradiação. Somente nas culturas irradiadas com 6 Gy ou menos, após 2 semanas, apresentaram crescimento. Com respeito à contração do gel colágeno, foi observado o efeito de inibição relacionado à dose. Após considerável inibição na 2ª semana, foi verificada retomada na taxa de contração na 8ª semana. Nos filamentos de actina também ocorreram alterações dose- dependentes. Os autores concluíram que a irradiação parece inibir a

organização do citoesqueleto constituído pela actina, resultando na inibição da contração da ferida.

WATANABE *et al.*, em 1994, utilizando modelo experimental de tecido de granulação formado em feridas de ratos, estudaram os efeitos de baixas doses de raios X. A dose de 7R foi administrada em dose única em um dos grupos e outro grupo de animais recebeu a dose dividida em 3 frações: imediatamente após a realização das feridas, 24 e 48 horas no pós- cirúrgico. As análises, histológicas e histofotométricas dos tecidos entre 4 e 28 dias, apontaram para alterações quantitativas mas não qualitativas na gênese tecidual, quando comparados os grupos controles aos irradiados; sendo as alterações quantitativas foram mais evidentes no grupo dose dividida. Ao final do período experimental de 28 dias, os efeitos mostraram-se transitórios para a dose de 7R.

BERNSTEIN *et al.* (1994) descreveram um modelo para o estudo de feridas irradiadas, em cobaias, com a finalidade de determinar o efeito dos raios ionizantes na contração das feridas. Nesse estudo, os animais foram protegidos por uma caixa de chumbo, que apresentava uma fenda, através da qual a radiação atingia a pele; foi utilizada a dose de 18 Gy de radiação X, 2 dias antes da realização de feridas circulares com 6 cm de diâmetro. A avaliação da reparação foi feita levando em consideração a mensuração do tamanho das feridas, nos 5^{os}, 7^{os}, 10^{os} e 14^{os} dias, e comparadas às feridas contralaterais realizadas na pele não irradiada que mostraram aumento na velocidade de reparo. Os autores concluíram que esse modelo de feridas abertas é apropriado para avaliação da ação de substâncias tópicas e de fatores de crescimento, em feridas prejudicadas pelo uso de radiação.,

WANG *et al.* (1994) estudaram o efeito da irradiação por elétrons com 4 MeV de energia, na reparação de feridas incisionais feitas na pele de ratos 7 dias após a irradiação local com 9,6 Gy. Foram utilizados 3 ratos para cada período de estudo (1, 3, 7, 14 dias), após a realização da ferida, o mesmo número foi utilizado para compor o grupo controle correspondente. Os resultados sugerem que a dose única de elétrons, parcial e com profundidade controlada (3mm) de 9,6 Gy, causa atraso na reparação tecidual até por volta de 7^0 dia, diminuindo o número de células inflamatórias, bem como do exudato tecidual, causando lentificação da migração

epitelial, redução no número de fibroblastos e atraso na formação dos feixes de colágeno. Por volta do 14^0 dia não havia atraso significativo entre os grupos, concluindo então, os autores, ter havido atraso, mas não impedimento da reparação tecidual.

JOINER (1994) considerou as evidências da existência de processos específicos nas células de mamíferos, que sobre-regulam a resposta à radiação ionizante nas pequenas doses, aumentando o reparo e removendo a injúria causados pela radiação ionizante. O autor cita trabalhos realizados em nível molecular confirmando mudanças em proteínas citoplasmáticas e nucleares, e que expressão aumentada de alguns genes podem ocorrer dentro de algumas horas ou mesmo minutos após a irradiação, levando as células ao estado de radioresistência adquirida O real mecanismo de radioproteção induzida permanece indefinido não se sabendo se reside no reparo do dano, controle no ciclo celular ou ainda em outro processo.

WEST, em 1995, publicou revisão da literatura sobre a radiosensibilidade intrínseca dos diferentes pacientes, e seu uso para predizer as diferentes respostas apresentadas aos esquemas de radioterapia. O autor resumiu dados relativos à radiosensibilidade dos diversos tumores, fibroblastos e linfócitos; fez também sugestões para as aplicações práticas destes dados no campo da radioterapia. As reações costumeiras dos tecidos (eritema, telangectasia, fibrose) devem ser mantidas dentro de limites aceitáveis em casos de tratamentos radioterápicos, e a identificação da radiosensibilidade pode levar ao aumento ou diminuição da dose de radiação, sendo um fator adicional a ser considerado, além do volume do tumor, tempo de tratamento, tamanho da fração. Pela correlação entre os efeitos tardios da irradiação e a sensibilidade observada nas culturas de fibroblastos, a literatura tem indicado que a avaliação da sensibilidade do paciente à radioterapia pode ser feita utilizando fibroblastos, enquanto outros autores sugerem o uso de linfócitos do sangue periférico.

Na busca de explicar os mecanismos básicos da fibrose radio-induzida à luz da radiobiologia molecular e biologia celular, RODEMANN & BAMBERG, em 1995, estudaram a seqüência terminal de diferenciação nos compartimentos de células em

processo de diferenciação em fibroblastos para a fase de fibroblastos progenitores e destes em fibroblastos pós-mitóticos, em casos de fibrose pulmonar após tratamento radioterápico. Os marcadores tipo-específico de células nos fibrócitos pós-mitóticos têm registrado que, ao atingir o estágio terminal diferenciado de fibroblastos, caracterizado pela capacidade específica para sintetizar colágenos intersticiais tipos I, III e V, além das proteoglicanas e outros componentes da matriz extra-celular, sofrem degeneração via indução de apoptose. Baseados em experimentos, é calculado que, para manter uma função ordenada de tecido celular, a taxa de fibroblasto real seja de 2 fibroblastos progenitores para cada fibrócito pós-mitótico; nas reações fibróticas após radioterapia, ocorre aumento da deposição de colágeno intersticial, espessamento das paredes dos vasos, oclusão vascular e grande quantidade de deposição de matriz extra-celular . A radiação ionizante nas doses de 1 a 10 Gy tem se mostrado indutora da diferenciação terminal no sistema celular fibroblasto/fibrócito dentro de um período de tempo menor, mas com expectativa de vida reduzida em 40 a 45%. A síntese de colágeno intersticial tipos I, III e V é aumentada por um fator de 5 a 8 ,quando comparada à população de fibroblastos progenitores.

DRAKE & OISHI (1995) fizeram revisão sobre reparação tecidual nos tratamentos radioterápicos e quimioterápicos; após breves considerações sobre as fases da reparação, comentaram sobre os efeitos agudos e tardios, efeitos diretos sobre o DNA e indiretos pela criação de radicais livres. Mostraram grande preocupação quanto ao uso de radiações pré- operatórias pela fato de serem insuficientes os dados na literatura, e serem eles baseados nos trabalhos realizados em modelos animais, considerando-os portanto menos confiáveis. A preocupação sendo ainda maior em relação a irradiação de cabeça e pescoço por serem freqüentes as complicações nesta região, quando comparada a outras regiões irradiadas no corpo. Quando consideraram as doses, encontraram que a dose de 300cGy ou menos, ministrada de uma só vez, não afeta significativamente a reparação, mas a dose de 1000cGy ou mais causa retardo significante na reparação. Para irradiação pós-cirúrgica encontram que o 5^0 e 7^0 dias são os mais críticos, e a partir do 7^0 dia, os efeitos mostram-se menos severos; fazendo exceção a

braquiterapia que, mesmo após o 7^0 dia, mostra atraso na reparação tecidual. A quimioterapia tem mostrado efeitos mais transitórios do que os tratamentos radioterápicos no tocante à reparação tecidual.

Os efeitos da irradiação na neovascularização foram estudados por DOYLE *et al.*, em 1996, com a finalidade de determinar o melhor tempo para cirurgias reconstrutivas; para esse estudo foram utilizados ratos que receberam dois implantes de material estranho no pedículo vascular epigástrico (modelo de estudo descrito por Walton e Brown). Para irradiação, foram usados feixes de elétrons produzidos em acelerador linear, com energia de 6 MeV. Os animais foram divididos em 7 grupos, o primeiro grupo não foi irradiado e os grupos irradiados receberam diferentes números de doses de 300 cGy. O grupo 2 recebeu dose única no dia do implante; o grupo 3 recebeu uma fração no dia do implante e outra fração no dia seguinte; grupo 4, além das doses recebidas pelo grupo 3, recebeu nova dose no 3° dia; o grupo 5 recebeu dose única 48 horas após o implante; no grupo 6, os animais foram irradiados com intervalos de 1 a 3 dias para recuperação, até completarem 10 frações e o grupo 7 constituiu o grupo pré- irradiado por 3 dias consecutivos havendo coincidência entre o último dia e o dia do implante. Após a remoção dos implantes, os achados entre o lado irradiado (direito) e o lado não irradiado (esquerdo) foram similares, e até a dose de 900 cGy, não havendo redução na neovascularização. A diferença na taxa de neovascularização entre os implantes colocados nos dois lados não se mostrou significativa, mesmo no grupo 6 (3000 cGy) ao final de 18 dias, mas não foi feita comparação com o controle. Embora não significativas, as maiores reduções da taxa de neovascularização foram observadas nos grupos 3 e 4 e foi também verificado retomada ao normal. O efeito da dose de 900cGy antes do implante (grupo 7) foi menor do que quando ministrada após o implante (grupo 4). O estudo encontrou não haver prejuízo na neovascularização estimulada 24 horas após a última fração de 900cGy; os autores sugeriram, finalmente, que a reconstrução pode ser realizada assim que as reações a irradiação tenham cessado.

WANG *et al.* (1996) verificaram haver poucas informações sobre os efeitos de uma única dose de radiação por elétrons dadas durante cirurgias cutâneas e a compatibilidade existente entre o leito da ferida irradiada e o enxerto. Dos 44 ratos

utilizados, 4 não receberam tratamento, 20 receberam tratamento cirúrgico e foram *sham* irradiados, 20 receberam tratamento cirúrgico e irradiação por elétrons na dose de 10 Gy. Os intervalos de estudo foram de 1, 3, 7, 14 e 21 dias após a cirurgia. Foi demonstrado que a irradiação tem efeito na fase isquêmica do enxerto e prejuízo na deposição de fibrina com possíveis danos radio-induzidos nos microvasos, atraso na re-epitealização, demora na substituição da fibrina pelo tecido de granulação vascular, diminuição do diâmetro das fibrilas colágenas.

SALONE *et al.*, em 1996, estudaram a relação entre o tratamento condicionante por baixas doses de raios X (2cGy e 1 Gy), para posterior tratamento subseqüente por altas doses de raios X ,em culturas de linfócitos humanos,por estas células apresentarem resultados variáveis. Procuraram relacionar o tratamento prévio a mudanças no ciclo celular ou atraso no índice mitótico e resposta adaptativa. Eventos celulares observados nas células de alguns doadores não induziram qualquer resposta adaptativa para as altas doses. Os autores salientam as diferenças nas células do doadores, como sendo fator constitucional; mostraram receio pela interpretação errônea da resposta adaptativa como radioproteção. Mas admitem que o uso de baixas doses pode ser importante na avaliação do risco genético.

ALMEIDA, em 1997, trabalhando com feixes de elétrons com energia de 6 MeV , administrou a dose de 1 Gy às feridas produzidas em peles de ratos, imediatamente após terem sido elas realizadas ou 3 dias após. Para permitir que somente 1,0 cm circunjacente á área da ferida fosse irradiada, protegeu-a com lâmina de chumbo assim como o restante do corpo do animal. As avaliações realizadas pelos métodos histológicos e histoquímicos, nos vários tempos estudados da reparação tecidual, permitiram concluir que a incidência de irradiação por elétrons, na dose de 1 Gy, em bordas de feridas, causa retardo no processo de reparação, sobretudo quando administrada 3 dias após a excisão do tecido.

NACHTRAB *et al.* (1998) cientes das reações diversas apresentadas pelos pacientes, quando tratados pela mesma dosagem e seguindo o mesmo esquema, estudaram fibroblastos de pacientes exibindo reações normais, agudas e/ou tardias, comparando-as às reações apresentadas por portadores de ataxia- telangectasia. O

critério utilizado para avaliação foi a freqüência de formação de micronúcleos nas células irradiadas com doses compreendidas entre 1 e 7 Gy. Foi encontrado aumento na freqüência de micronúcleos nas doses de 2 a 4 Gy; nas doses superiores houve declínio da freqüência, sendo este achado atribuído ao prejuízo causado por irradiações a altas doses. A freqüência também mostrou-se relacionada à sensibilidade apresentada pelos pacientes. Apesar da necessidade de maiores estudos e otimização da metodologia, os autores sugeriram que testes com baixas doses em células de pacientes necessitando de tratamento radioterápico podem orientar a dosagem total e o esquema de tratamento pela utilização do teste de formação de micronúcleos.

O workshop realizado no Reino Unido no período de 14 a 16 de julho de 1997, relatado por PEACOCK *et al.* em 1998 teve por objetivo reunir físicos, radioterapeutas e radiobiologistas para discutirem formas de poupar os tecidos normais nos tratamentos radioterápicos, pois o grande desafio da radioterapia tem sido conseguir maior dose no tratamento para os tecidos alvos e ao mesmo tempo diminuir a probalidade de danos para os tecidos normais. Os radiobiologistas têm observado reações diversas das células tronco dos tecidos normais nos diferentes pacientes, quando submetidos ao mesmo tratamento; e que o estudo prévio da radiosensibilidade característica do paciente poderia permitir individualização do tratamento.

LOURENÇO (1998) estudou o efeito dos raios X, na dose de 7,4R em feridas não suturadas e feridas que tiveram suas bordas aproximadas por fios de sutura. Pelos métodos de coloração de hematoxilina-eosina e impregnação pela prata concluiu que as feridas irradiadas e suturadas foram as primeiras a completarem a reparação tecidual e as feridas que não foram suturadas e que receberam a radiação repararam-se mais tardiamente.

PROPOSIÇÃO

Os efeitos da irradiação por elétrons, em doses altas, encontram-se bem documentados na literatura científica; mas em relação a baixas doses, poucos trabalhos foram encontrados na revista da literatura. Este trabalho se propõe, a:

1. Verificar, morfológica e ultraestruturalmente , os possíveis efeitos da radiação de elétrons, na dose de 1 Gy de elétrons com 6 MeV de energia, sobre o processo de reparo em feridas irradiadas imediatamente após a cirurgia.

2. Verificar os mesmos objetivos acima em tecidos de granulação irradiadas após 72 horas da cirurgia.

MATERIAIS E MÉTODOS

Para a realização deste trabalho foram utilizados os seguintes materiais:

➢ *Materiais de laboratório*

- Balança de precisão
- Tintura de azul de metileno

➢ *Materiais para anestesia*

- Solução injetável Hypinol a 3%, para uso veterinário do Laboratório Fantoveter Divisão Cristália
- Seringas hipodérmicas e agulhas intradérmicas para insulina

➢ *Materiais cirúrgicos*

- cabo e lâminas de bisturi
- pinça dente de rato
- tesoura reta de ponta fina
- pinça reta
- Gabarito de plástico – retângulo de 2 cm x 1 cm
- Gaze, algodão hidrófilo

➢ *Materiais usados no procedimento de irradiação*

- Acelerador linear, modelo Mevatron 74, da Siemens
- Lâmina de chumbo de 4mm de espessura, com abertura retangular medindo 2 cm x 1 cm

➢ *Materiais para coleta das peças*

- Éter etílico P.A.
- Clorofórmio
- Cloreto de sódio
- Papel de filtro
- Solução fixadora de Lillie
- Vidros com tampa para colocação da solução fixadora e peças histológicas

MÉTODOS

Modelo experimental

Foram utilizados para o trabalho 75 ratos adultos, machos, de mesma linhagem – *Rattus Norvegicus, Albinus, Wistar*, procedentes do Biotério Central da Unicamp, pesando entre 180 e 300 gramas, com idade entre 60 e 90 dias. Os ratos foram mantidos em biotério climatizado, dentro de gaiolas apropriadas, alimentação com ração balanceada padrão e água *ad libitum* desde o nascimento até a data do sacrifício.

Grupos experimentais

Os ratos foram divididos aleatoriamente em 3 grupos e receberam marcas com azul de metileno para identificação. Para cada tempo estudado foram utilizados 3 animais. Os grupos ficaram assim constituídos:

- Grupo GC – os grupos controles foram constituídos por 33 animais sacrificados aos 2, 4, 5, 7, 10, 11, 14, 17, 20, 21 e 24 dias após a ferida, tempos estes que coincidiram com o tempo de sacrifício dos animais irradiados nos demais grupos (GFI e GTGI).
- Grupo GFI - feridas irradiadas, imediatamente após a excisão do tecido nos tempos 2, 4, 7, 11, 14, 17 e 21 dias. Foram usados 21 animais.
- Grupo GTGI – 21 animais irradiados 72 horas após a confecção da ferida e sacrificados nos tempos 5, 7, 10, 14, 17, 20 e 24 dias após a cirurgia.

A irradiação das feridas ocorreu em tempos diferentes em relação à realização da ferida (imediatamente ou 72 horas após), porém o tempo transcorrido entre a irradiação e a coleta do material foi mantido constante.

Nos tempos de coleta do material 7, 14 e 17 dias, houve coincidência nos

tempos transcorridos entre a cirurgia e a coleta de material dos grupos GC, GFI, GTGI.

Produção da ferida

Para a realização das feridas, os ratos foram pesados em balança de precisão, marcados, e as doses de sedativo foram determinadas seguindo-se a orientação da Disciplina de Farmacologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba – Unicamp - 40mg/kg injetadas intraperitonialmente. Após a sedação com hypinol e depilação manual, foram realizadas as feridas, usando-se bisturi.

As feridas foram feitas de forma retangular e tiveram seus tamanhos selecionados em plano piloto, medindo 2 cm em seu lado maior e 1 cm em seu lado menor. Para manter constante o tamanho das feridas, foi confeccionado um gabarito de plástico. O local das incisões foi marcado com o auxílio de caneta hidrográfica, à uma distância de 1 cm da espinha dorsal em direção laateral (fig.1.1).

A excisão tecidual compreendeu as camadas epitelial, derme e tecido conjuntivo sub-dermal, até o músculo *panniculus carnosus*, sem atingi-lo. A peça foi então dissecada do músculo resultando em um leito anatômicamente constante e rico em suprimento vascular. A ferida produzida teve profundidade de aproximadamente 2 mm.

As feridas permaneceram abertas e deixadas descobertas. Por não haver indício de infecção, não foi necessário o uso de antibióticos.

Irradiação

Os feixes de elétrons, usados na irradiação, foram produzidos em um acelerador linear Mevatron 74 pertencente ao CAISM da Unicamp (fig.1.2). A dose de 1 Gy foi distribuída em uma única irradiação, a uma distância alvo- fonte

de 100 cm. A deposição da dose máxima do feixe, com energia de 6 MeV, ocorreu a 1cm de profundidade no tecido.

No momento da irradiação do grupo GFI, os animais estavam ainda sob o efeito da anestesia. A anestesia foi repetida no grupo GGTGI 3 dias após a cirurgia para permitir a irradiação dos animais. Neste tempo, o mesmo procedimento foi realizado para os outros animais do experimento, para que não fosse introduzida esta variável. Durante a irradiação, os animais foram colocados em decúbito ventral e protegidos por lâmina de chumbo, ficando apenas a área da ferida exposta ao feixe de elétrons (fig. 1.3).

Coleta do material

Decorrido o tempo previamente estabelecido para o estudo da evolução dos tecidos, os animais foram anestesiados pela inalação de éter etílico para a retirada do tecido néo- formado e circundado por tecido normal. As peças foram então lavadas com solução salina fisiológica para remoção do sangue da peça, e o excesso da solução de cloreto de sódio foi retirado com o auxílio de papel filtro.

As peças foram então colocadas em recipientes de vidro com tampas contendo a solução fixadora de Lillie, e aí mantidas por um período de 72 horas até o processamento da peça. Após a retirada dos tecidos os animais foram sacrificados por inalação de clorofórmio .

Preparo das peças para exames histológicos

As peças foram incluídas em parafina, e processadas em micrótomo na espessura de 7 μm. De cada peça foram confeccionadas 9 lâminas e submetidas aos tratamentos de acordo com as técnicas preconizadas; 3 foram coradas pelo método de hematoxilina - eosina, 3 lâminas preparadas para reação histoquímica de metacromasia pelo azul de toluidina pH 4, em concentração de 0,025%, de acordo

com a técnica de Lison (1960), e 3 para impregnação argêntica, de acordo com a técnica de Del Rio – Hortega, como indicado por Lillie.

A coloração pela técnica da hematoxilina-eosina, de acordo com a técnica de rotina, permitiu a observação morfológica do processo de reparo dos diferentes grupos estudados.

A impregnação argêntica, para análise da birrefringência de forma dos feixes sob luz polarizada sem o uso de compensadores, permitiu a observação do colágeno dos tecidos de granulação.

A reação histoquímica do azul de toluidina foi usada para observação da reação do corante com as moléculas de GAGs, pelo dicroísmo linear para verificação da orientação macromolecular das fibras colágenas.

Todas estas observações microscópicas foram feitas com o auxílio de um fotomicroscópio "Zeiss- Pol 01", onde foram também obtidas as microfotografias.

FIGURA 1.1- dorso depilado e ferido

FIGURA 1.2- Mevatron 74

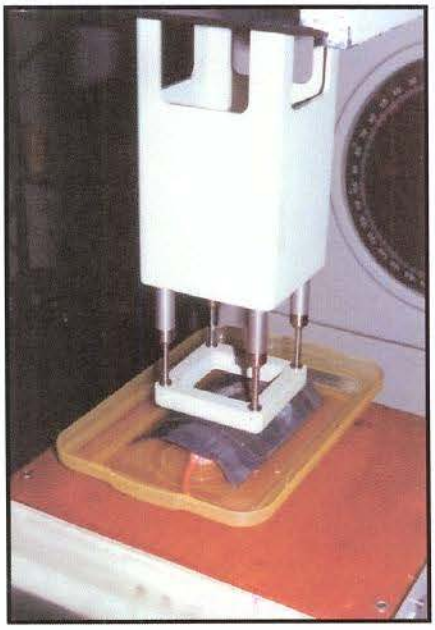

FIGURA 1.3- irradiação

RESULTADOS

Seguem-se os resultados obtidos pelas análises microscópicas do material obtido.

DESCRIÇÃO MORFOLÓGICA

COLORAÇÃO POR HEMATOXILINA- EOSINA

GRUPOS CONTROLE E GRUPOS FERIDA IRRADIADA

2º dia de reparação tecidual

GC - o tecido, aos 2 dias, apresentou coberto por restos necróticos, com formação de crosta superficial. Abaixo da zona de necrose, o tecido mostrou um infiltrado de células redondas (linfócitos e plasmócitos) e também macrófagos. Notou-se também a presença de polimorfonucleares, principalmente no limite com a região necrótica. Mais para a profundidade, observou-se a presença de arteríolas e vênulas dilatadas (fig. 2.1).

GFI - o aspecto geral do tecido foi similar ao controle de 2 dias, sem nenhuma outra particularidade (fig. 2.2).

4º dia de reparação tecidual

GC - a região continuou a exibir a crosta necrótica superficial e a zona necrótica subjacente, porém, mostrou menor presença de células inflamatórias. Imediatamente abaixo desta zona, notou-se o desenvolvimento de um tecido de granulação ainda incipiente, muito celular e vascularizado e praticamente ainda sem fibrogênese (fig. 2.3).

GFI - a ferida mostrou a presença de crosta superficial e de uma região necrótica e quase acelular, imediatamente abaixo. Comparando-se com o controle, quase não havia gênese do tecido de granulação, e sim um tecido ainda não organizado e de pequena espessura, com zonas ainda necróticas (fig. 2.4).

7º dia de reparação tecidual

GC - a este tempo, a zona em estudo mostrou a presença da crosta superficial remanescente, com um tecido ainda não organizado subjacente a ela. No entanto, o tecido de granulação mostrou-se já ordenado, com vasos sangüíneos orientando-se verticalmente em direção à superfície e formando alças. Notou-se também grande quantidade de fibroblastos, indicando o início da fibrogênese. Nas laterais do tecido, o epitélio superficial iniciou a sua proliferação em direção ao centro da ferida (fig. 2.5).

GFI - o tecido irradiado, a este tempo, mostrou-se superficialmente coberto com uma crosta mais ampla que a correspondente do controle. Subjacente à ela, o tecido ainda necrótico apresentou-se mais espesso que o exibido pelo grupo controle. Mais profundamente, o tecido de granulação em proliferação exibiu aspecto menos ordenado que o controle, com maior número de vasos sangüíneos ativos e néo-formados e mostrou-se bastante celular (fibroblastos principalmente). Iniciou-se a proliferação epitelial lateralmente à ferida (fig. 2.6).

11º dia de reparação tecidual

GC - o tecido de granulação apresentou-se completamente recoberto por epitélio estratificado, ainda com muitas camadas celulares e quase nenhuma queratinização. Abaixo do epitélio, o tecido mostrou-se bem ordenado, com diminuição de células e vasos e aumento da fibrogênese em relação ao controle 7 dias (fig. 2.7).

GFI - tecido sem evidências de cobertura epitelial, ainda com presença de crosta necrótica superficial. O tecido de granulação subjacente exibiu células inflamatórias permeando a proliferação de fibroblastos, e fibrinogênese ainda incipiente. O número de vasos sangüineos néo- formados e ativos foi maior que o tecido controle (fig. 2.8).

14º dia de reparação tecidual

GC - o tecido de granulação mostrou-se coberto com um epitélio estratificado de espessura normal, com poucas camadas e queratinizado. O tecido retraiu-se e mostrou-se completamente fibrosado, embora os feixes de fibras colágenas fossem ainda menos espessos que o tecido normal. Notou-se ainda o início de formação de anexos da pele (fig. 2.9).

GFI - tecido de granulação coberto com epitélio estratificado ainda bastante espessado maior que o normal. O tecido de granulação subjacente ainda se mostrou bastante celular e vascular, denotando fibrogênese pouco acentuada em relação ao controle (fig. 2.10).

17º dia de reparação tecidual

GC - região da ferida bastante contraída, com a cicatriz quase completamente estabelecida. A zona apresentou-se altamente fibrosada, embora os feixes de colágeno néo formados fossem ainda menos espessos que os normais. Anexos da pele já formados povoando o local (fig. 2.11).
GFI - o tecido mostrou-se coberto por epitélio normal e o tecido de granulação apresentou-se bem fibrosado, mas com retração ainda pequena. Praticamente não houve formação de anexos da pele denotando sensível atraso em relação ao controle (fig. 2.12).

21° dia de reparação tecidual
GC - retração notável do tecido completamente fibrosado e cicatrizado (fig. 2.13).
GFI - tecido coberto por epitélio funcional normal, tecido de granulação bem ordenado mas menos fibrosado que o controle correspondente. Presença de anexos da pele mas menor retração do tecido em relação ao controle (fig. 2.14).

GRUPOS CONTROLE E TECIDO DE GRANULAÇÃO IRRADIADO

5° dia de reparação tecidual
GC - a ferida exibiu uma crosta necrótica superficial, com uma zona delgada de tecido também desorganizado, com células inflamatórias em grande quantidade . Abaixo deste tecido inflamado, apresentou-se um tecido de granulação contendo muitos vasos néo- formados e fibroblastos em proliferação. Não há formação de feixes de colágeno neste estágio (fig. 2.15).
GTGI - a ferida apresentou uma grande área necrótica superficial, maior que a área necrótica do grupo controle. Em contraposição, a área de tecido de granulação subjacente mostrou-se mais delgada e celular que o controle (fig. 2.16).

7° dia de reparação tecidual

GC - a este tempo, a zona em estudo mostrou a presença da crosta superficial remanescente, com um tecido ainda não organizado subjacente a ela. No entanto, o tecido de granulação mostrou-se já ordenado, com vasos sangüíneos orientando-se verticalmente em direção à superfície e formando alças. Notou-se também grande quantidade de fibroblastos, indicando o início da fibrogênese. Nas laterais do tecido, o epitélio superficial iniciou a sua proliferação em direção ao centro da ferida (fig. 2.17).

GTGI - a ferida não exibiu sinais de contração, permanecendo ainda recoberta pela crosta necrótica, relativamente delgada. Abaixo da crosta, houve ainda a presença de um tecido desorganizado, com sinais evidentes de necrose celular. O tecido de granulação subjacente exibiu grande número de vasos néo- formados, com orientação perpendicular à superfície, formando alças. O tecido mostrou-se mais celular e menos fibroso que o controle correspondente (fig. 2.18).

10º dia de reparação tecidual

GC - houve significativa contração lateral da ferida, não mais exibindo crosta necrótica, mas sendo recoberta completamente pelo epitélio ainda imaturo e espesso,e mostrou muitas digitações. O tecido de granulação, embora não muito fibroso e consequentemente bastante celular, não mais apresentou células inflamatórias da fase aguda, mas sim um número crescente de fibroblastos em proliferação. Os vasos sangüíneos diminuíram em número, e já se apresentaram ativos (fig. 2.19).

GTGI - a ferida ainda não sofreu contração lateral, e continuou mostrando a crosta necrótica superficial, sem sinal de proliferação do epitélio das bordas. Abaixo da crosta mostrou-se um tecido de granulação ainda incipiente, mas mais evoluído no que se refere ao grau de fibrosamento do que o tecido irradiado de 7 dias (fig. 2.20).

14º dia de reparação tecidual

GC - o tecido de granulação mostrou-se coberto com um epitélio estratificado de espessura normal, com poucas camadas e queratinizado. O tecido retraiu-se e mostrou-se completamente fibrosado, embora os feixes de fibras colágenas fossem

ainda menos espessos que o tecido normal. Notou-se ainda o início de formação de anexos da pele (fig. 2.21).

GTGI - a ferida exibiu-se ainda recoberta pela crosta necrótica superficial, sem sinais de cobertura epitelial lateral. Abaixo da crosta superficial, o tecido de granulação, ainda pouco evoluído, mostrou grande quantidade de vasos sangüíneos (alguns ainda néo- formados) dispostos perpendicularmente à superfície. O tecido apresentou-se bastante celular, com pequeno grau de fibrosamento (fig. 2.22).

17º dia de reparação tecidual

GC - região da ferida bastante contraída, com a cicatriz quase completamente estabelecida. A zona apresentou-se altamente fibrosada, embora os feixes de colágeno néo formados fossem ainda menos espessos que os normais. Anexos da pele já formados povoando o local (fig. 2.23).

GTGI - a contração lateral da ferida já se iniciou, e o epitélio recobriu inteiramente a superfície, embora ainda espesso e imaturo. O tecido de granulação mostrou-se ainda bastante celular, com feixes de colágeno começando a organizar-se apenas na profundidade. O tecido apresentou-se ainda muito vascularizado (fig. 2.24).

20º dia de reparação tecidual

GC - a cicatriz evoluiu ao máximo, sendo apenas perceptível em relação ao tecido normal lateral pela menor espessura dos feixes de fibras colágenas (fig. 2.25).

GTGI - a ferida apresentou-se recoberta por epitélio estratificado queratinizado, embora ainda espesso e digitado. O tecido de granulação subjacente teve seu fibrosamento aumentado e consequentemente mostrou-se menos celular e menos vascularizado. A contração do local foi significativa (fig. 2.26).

24º dia de reparação tecidual

GC - A região da ferida exibiu aspecto totalmente semelhante ao normal. (fig. 2.27).

GTGI - a ferida exibiu completa cicatrização, com epitélio normal recobrindo-a. No entanto, o fibrosamento foi mais delgado que o tecido normal, e a contração ainda não se mostrou completa (fig. 2.28).

GRUPOS CONTROLE E TECIDO DE GRANULAÇÃO IRRADIADO

7º dia de reparação tecidual

GFI - o tecido irradiado, a este tempo, mostrou-se superficialmente coberto com uma crosta mais ampla que a correspondente do controle. Subjacente à ela, o tecido ainda necrótico apresentou-se mais espesso que o exibido pelo grupo controle. Mais profundamente, o tecido de granulação em proliferação exibiu aspecto menos ordenado que o controle, com maior número de vasos sangüíneos ativos e néo-formados e mostrou-se bastante celular (fibroblastos principalmente). Iniciou-se a proliferação epitelial lateralmente à ferida (fig. 5.1).

GTGI - a ferida não exibiu sinais de contração, permanecendo ainda recoberta pela crosta necrótica, relativamente delgada. Abaixo da crosta, houve ainda a presença de um tecido desorganizado, com sinais evidentes de necrose celular. O tecido de granulação subjacente exibiu grande número de vasos néo-formados, com orientação perpendicular à superfície, formando alças. O tecido mostrou-se mais celular e menos fibroso que o controle correspondente (fig. 5.2).

14º dia de reparação tecidual

GFI - tecido de granulação coberto com epitélio estratificado ainda bastante espessado maior que o normal. O tecido de granulação subjacente ainda se mostrou bastante celular e vascular, denotando fibrogênese pouco acentuada em relação ao controle (fig. 5.3).

GTGI - a ferida exibiu-se ainda recoberta pela crosta necrótica superficial, sem sinais de cobertura epitelial lateral. Abaixo da crosta superficial, o tecido de granulação, ainda pouco evoluído, mostrou grande quantidade de vasos sangüíneos (alguns ainda néo-formados) dispostos perpendicularmente à superfície. O tecido apresentou-se bastante celular, com pequeno grau de fibrosamento (fig. 5.4).

17º dia de reparação tecidual

GFI - o tecido mostrou-se coberto por epitélio normal e o tecido de granulação apresentou-se bem fibrosado, mas com retração ainda pequena. Praticamente não houve formação de anexos da pele denotando sensível atraso em relação ao controle (fig. 5.5).

GTGI - a contração lateral da ferida já se iniciou, e o epitélio recobriu inteiramente a superfície, embora ainda espesso e imaturo. O tecido de granulação mostrou-se ainda bastante celular, com feixes de colágeno começando a organizar-se apenas na profundidade. O tecido apresentou-se ainda muito vascularizado (fig. 5.6).

ASPECTOS QUALITATIVOS

EXAME DA BIRREFRINGÊNCIA ATRAVÉS DA IMPREGNAÇÃO ARGÊNTICA

A birrefringência dos feixes de colágeno do tecido em desenvolvimento dos diferentes grupos (controle e irradiados) foi examinada através de cortes histológicos submetidos à impregnação pela prata, pelo método de Del Rio-Hortega, sob microscopia de luz polarizada.

A birrefringência intrínseca (própria) dos feixes de colágeno pode ser melhor evidenciada, principalmente nos primeiros dias de evolução do tecido, pela impregnação argêntica, o que a transforma em birrefringência de forma, igualmente valiosa para os propósitos de avaliação qualitativa empregados neste trabalho.

É conveniente observar que, pelo exame sob luz polarizada, o brilho dos feixes de colágeno (que expressa seu grau de orientação macromolecular) se torna tanto mais intenso quanto mais numerosos e mais maduros eles estão.

GRUPO CONTROLE (GC) – GRUPO FERIDA IRRADIADA (GFI)

O exame da birrefringência nada mostra, uma vez que, em ambos os grupos, não existe colágeno aos 2 dias (fig. 3.1 e 3.2). A birrefringência vai se tornando mais perceptível de acordo com o passar do tempo. A partir dos 4 dias de evolução, o GC mostrou que a gênese e o desenvolvimento dos feixes de colágeno foi aumentando gradativamente até aos 14 dias (fig. 3.3, 3.5, 3.7, 3.9). O mesmo aconteceu em relação ao GFI; no entanto, a birrefringência dos feixes de colágeno dos mesmos tempos de evolução mostrou-se menos intensa, denotando menor quantidade de feixes e menor grau de orientação macromolecular (fig. 3.4, 3.6, 3.8, 3.10). A partir dos 17 dias, até aos 21 dias, a diferença entre a birrefringência do colágeno dos tecidos de ambos os grupos, embora ainda mais intensa em favor do grupo GC, apresentou-se bem menos sensível (fig. 3.11 e 3.12, 3.13 e 3.14).

GRUPO CONTROLE (GC) - GRUPO TECIDO DE GRANULAÇÃO IRRADIADO (GTGI)

Nos tempos 5, 7, 10, 14 e 17dias, os grupos exibiram diferença bastante acentuada da birrefringência do colágeno em favor do grupo GC (fig. 3.15 e 3.16, 3.17 e 3.18, 3.19 e 3.20, 3.21 e 3.22, 3.23 e 3.24). Nos tempos 20 e 24 dias as diferenças entre GC e GTGI diminuíram, embora persistisse o maior brilho dos feixes de colágeno do GC (fig. 3.25 e 3.26, 3.27 e 3.28).

GRUPO FERIDA IRRADIADA (GFI) E TECIDO DE GRANULAÇÃO IRRADIADO (GTGI)

Nos tempos comuns de 7, 14 e 17 dias, pela birrefringência verificada nos tecidos, notou-se que o brilho dos feixes de colágeno do GTGI apresentou-se menos

intenso do que o correspondente do GFI, mormente nos tempos 14 e 17 dias (fig. 6.1, 6.2, 6.3, 6.4, 6.5, 6.6).

ASPECTOS QUALITATIVOS

EXAME DO DICROÍSMO LINEAR PELO AZUL DE TOLUIDINA

O fenômeno do dicroísmo (duas cores) foi utilizado para verificação da organização tecidual, i.e. detectar a presença ou ausência da orientação macromolecular do tecido em evolução.

Neste método de estudo, as moléculas do corante azul de toluidina se ligam às glicosaminoglicanas , produzidas pelos fibroblastos, que são ligadas orientadamente às moléculas de colágeno, conforme o tecido evolui..

O tecido corado com azul de toluidina 0,025% em solução aquosa pH 4, analisado sob luz polarizada, mostra coloração azul ortocromática quando as fibras colágenas encontram-se paralelas ao plano de polarização da luz; a rotação de 90° na platina rotatória do microscópio imprime coloração rosa metacromática às fibras colágenas orientadas. Esse fenômeno do dicroísmo só se apresenta quando há orientação macromolecular do tecido. Caso contrário, os tecidos, em qualquer plano de polarização da luz, permanecem com a cor azul ortocromática.

GRUPO CONTROLE (GC) – GRUPO FERIDA IRRADIADA (GFI)

Os exames dos tecidos do grupo GC mostraram que o tecido de granulação começa exibir dicroísmo a partir dos 7 dias de evolução, indicando que, a este tempo, o tecido já está em processo de organização, embora não completado.(fig. 4.1 e 4.2)

Por outro lado o GFI só começou a exibir dicroísmo a partir dos 14 dias de evolução (fig. 4.7, 4.8), denotando considerável atraso, quando comparado ao GC.

GRUPO CONTROLE (GC) - GRUPO TECIDO DE GRANULAÇÃO IRRADIADO (GTGI)

Os exames dos tecidos destes 2 grupos pelo dicroísmo mostrou que, enquanto o tecido do GC exibiu dicroísmo (e por conseguinte início de organização) aos 7 dias de evolução, o GTGI somente vai exibir tal fenômeno aos 17 dias, mostrando com isto considerável atraso na orientação macromolecular do tecido quando comparado ao GC (fig 4.11 e 4.12).

GRUPO FERIDA IRRADIADA (GFI) E TECIDO DE GRANULAÇÃO IRRADIADO (GTGI)

Comparando-se os dados obtidos pelos exames dos tecidos dos dois grupos irradiados, observou-se que ambos os grupos sofreram atraso no desenvolvimento do processo em relação aos grupos controles, no entanto o atraso é maior no GTGI (fig. 4.11 e 4.12)..

COLORAÇÃO HEMATOXILINA-EOSINA

FIGURA 2.1- GC 2 dias

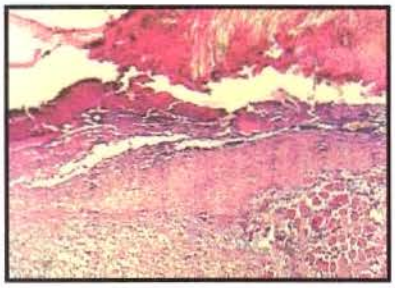

FIGURA 2.2- GFI 2 dias

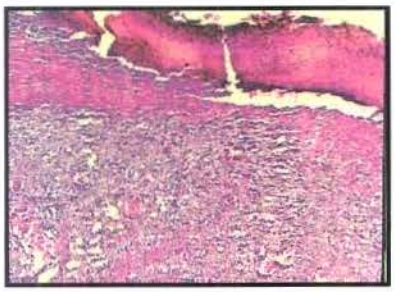

FIGURA 2.3- GC 4 dias

FIGURA 2.4-GFI 4 dias

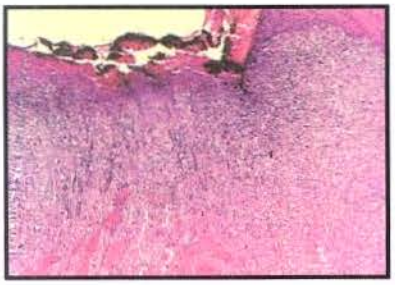

FIGURA 2.5- GC 7 dias

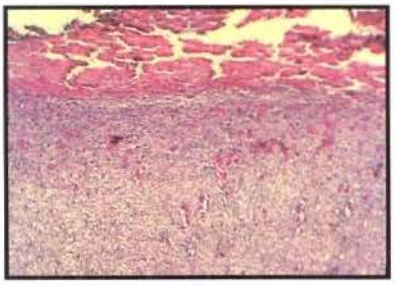

FIGURA 2.6- GFI 7 dias

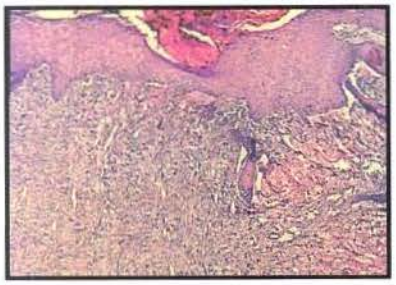

FIGURA 2.7- GC 11 dias

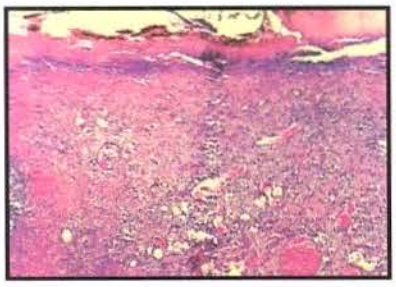

FIGURA 2.8- GFI 11 dias

COLORAÇÃO HEMATOXILINA-EOSINA

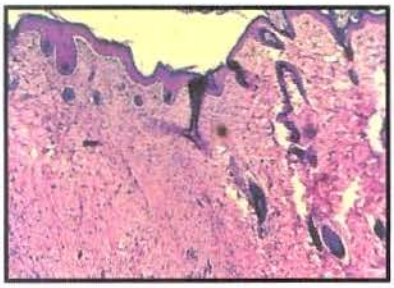

FIGURA 2.9- GC 14 dias

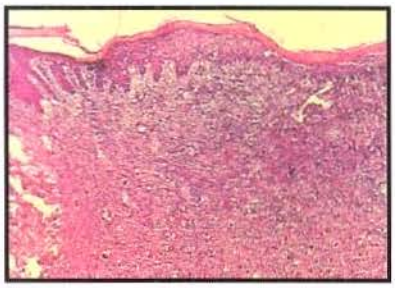

FIGURA 2.10- GFI 14 dias

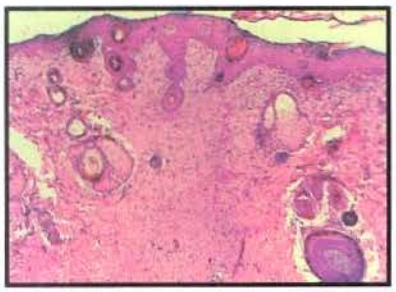

FIGURA 2.11- GC 17 dias

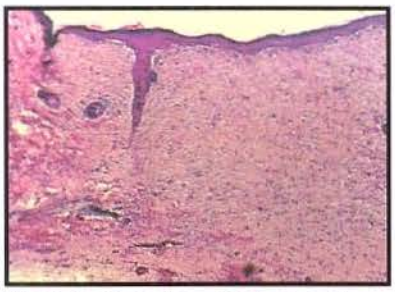

FIGURA 2.12- GFI 17 dias

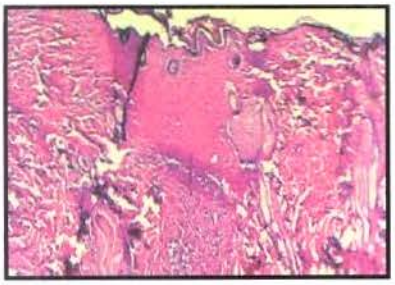

FIGURA 2.13- GC 21 dias

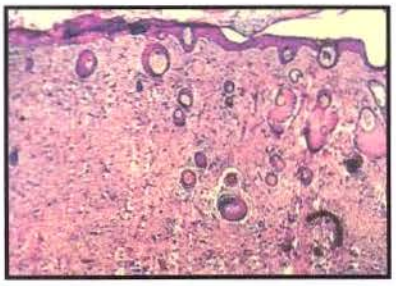

FIGURA 2.14- GFI 21 dias

COLORAÇÃO HEMATOXILINA-EOSINA

FIGURA 2.15- GC 5 dias

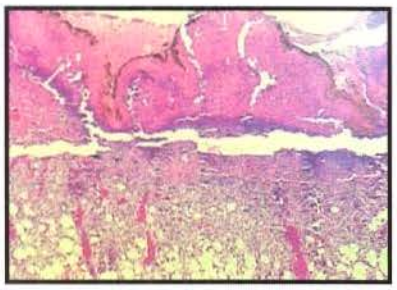

FIGURA 2.16- GTGI 5 dias

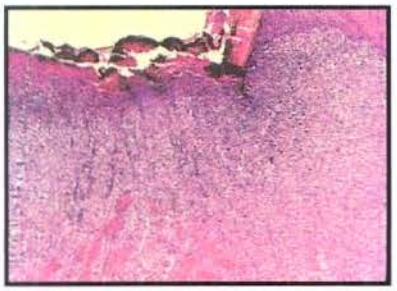

FIGURA 2.17- GC 7 dias

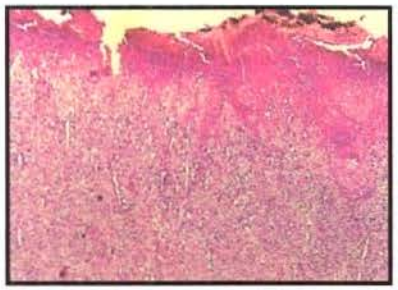

FIGURA 2.18- GTGI 7 dias

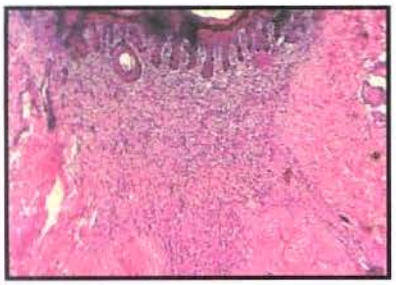

FIGURA 2.19- GC 10 dias

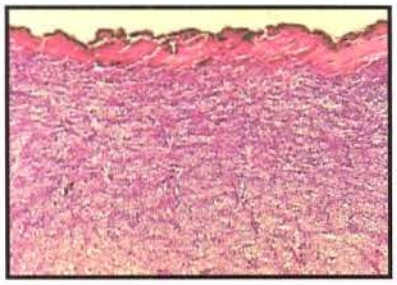

FIGURA 2.20- GTGI 10 dias

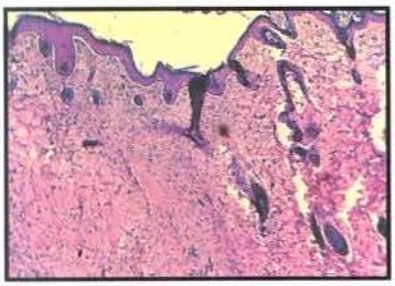

FIGURA 2.21- GC 14 dias

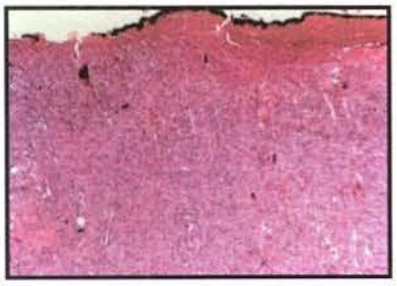

FIGURA 2.22- GTGI 14 dias

COLORAÇÃO HEMATOXILINA-EOSINA

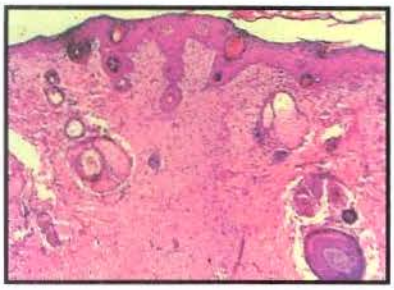

FIGURA 2.23- GC 17 dias

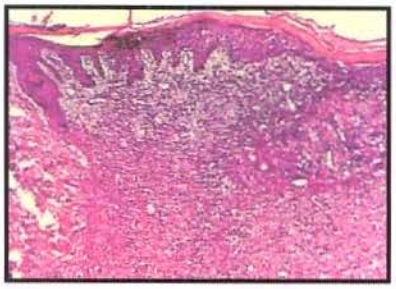

FIGURA 2.24- GTGI 17 dias

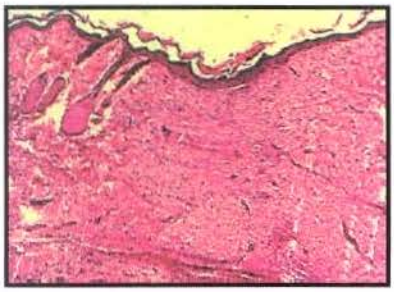

FIGURA 2.25- GC 20 dias

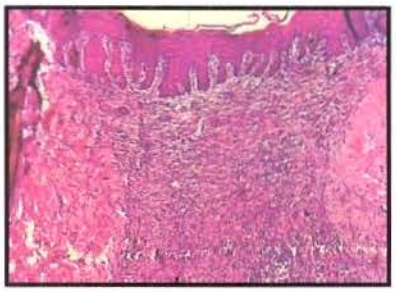

FIGURA 2.26- GTGI 20 dias

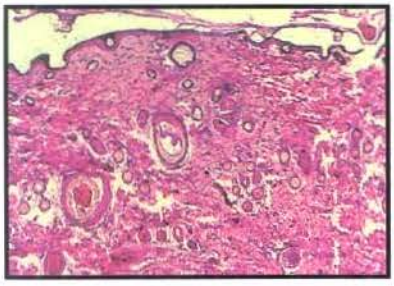

FIGURA 2.27- GC 24 dias

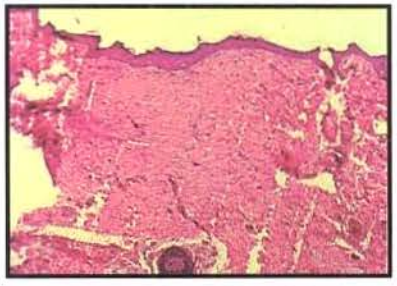

FIGURA 2.28- GTGI 24 dias

EXAME DA BIRREFRINGÊNCIA

FIGURA 3.1- GC 2 dias

FIGURA 3.2- GFI 2 dias

FIGURA 3.3- GC 4 dias

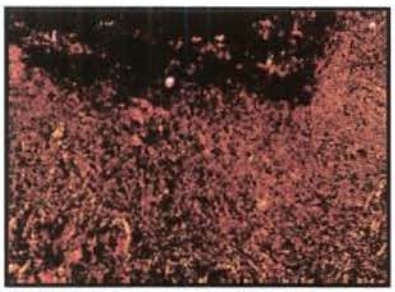

FIGURA 3.4- GFI 4 dias

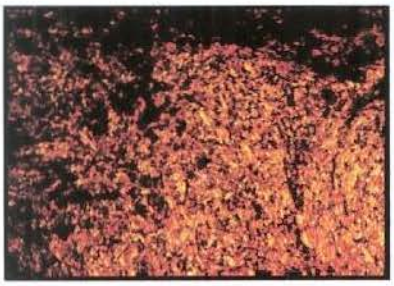

FIGURA 3.5- GC 7 dias

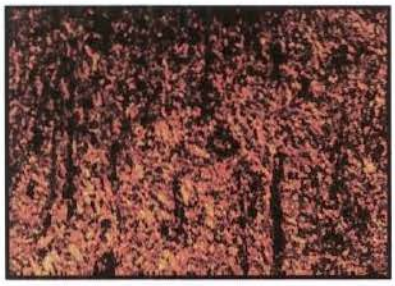

FIGURA 3.6- GFI 7 dias

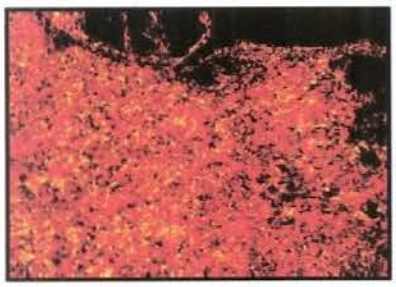

FIGURA 3.7- GC 11 dias

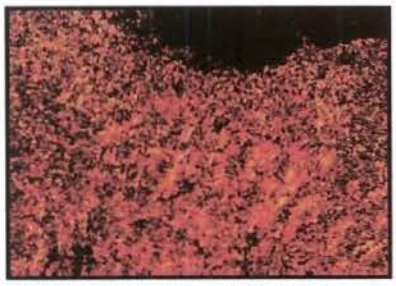

FIGURA 3.8- GFI 11 dias

EXAME DA BIRREFRINGÊNCIA

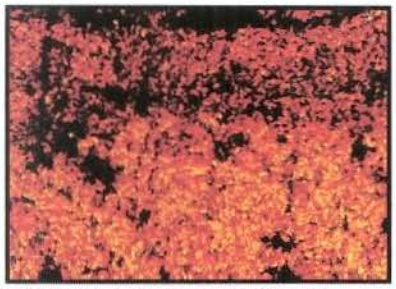

FIGURA 3.9- GC 14 dias

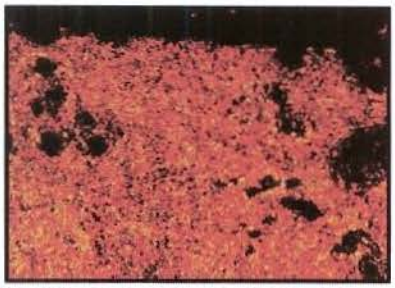

FIGURA 3.10- GFI 14 dias

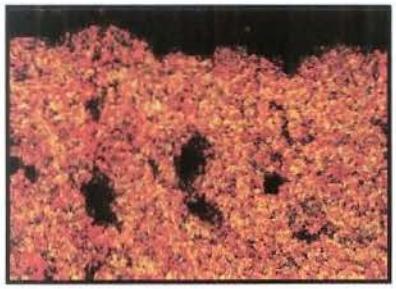

FIGURA 3.11- GC 17 dias

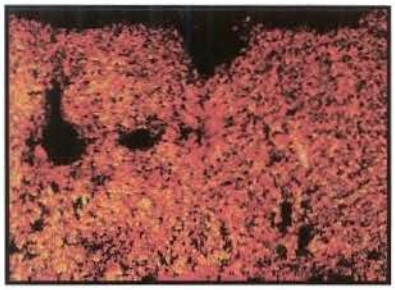

FIGURA 3.12- GFI 17 dias

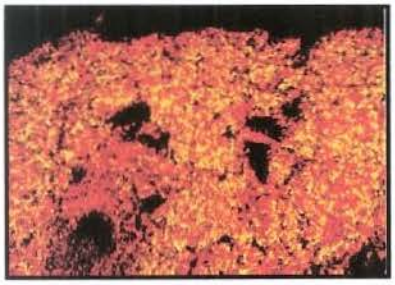

FIGURA 3.13- GC 21 dias

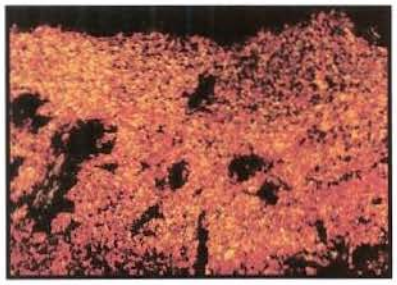

FIGURA 3.14- GFI 21 dias

EXAME DA BIRREFRINGÊNCIA

FIGURA 3.15- GC 5 dias

FIGURA 3.16- GTGI 5 dias

FIGURA 3.17- GC 7 dias

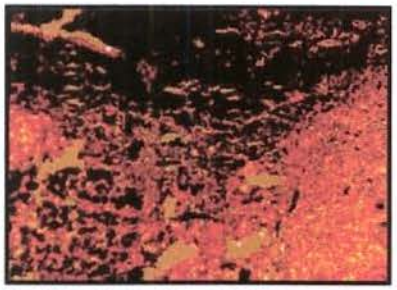

FIGURA 3.18- GTGI 7 dias

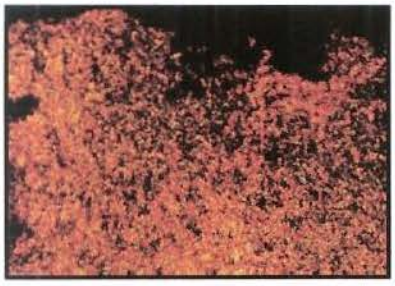

FIGURA 3.19- GC 10 dias

FIGURA 3.20- GTGI 10 dias

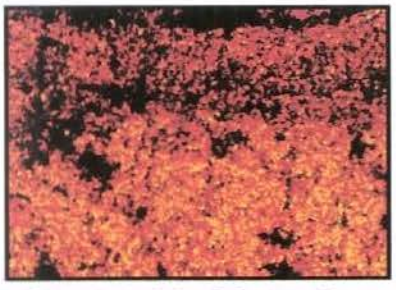

FIGURA 3.21- GC 14 dias

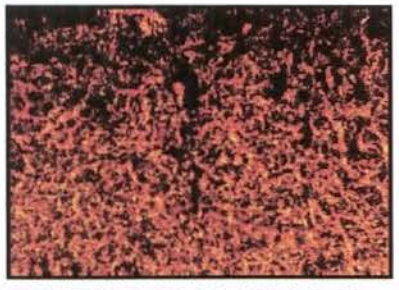

FIGURA 3.22-GTGI 14 dias

EXAME DA BIRREFRINGÊNCIA

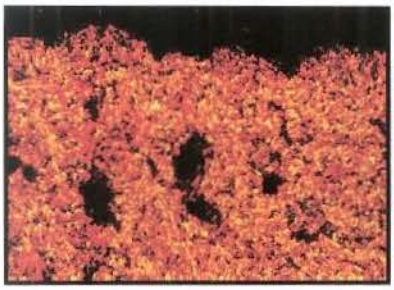

FIGURA 3.23- GC 17 dias

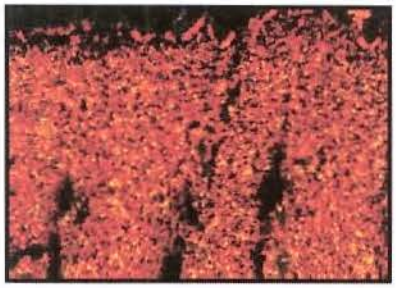

FIGURA 3.24- GTGI 17 dias

FIGURA 3.25- GC 20 dias

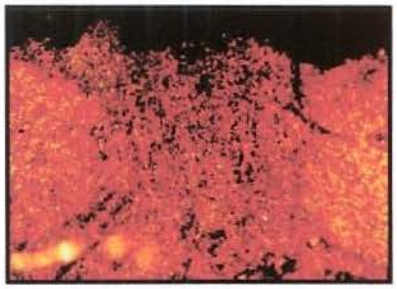

FIGURA 3.26- GTGI 20 dias

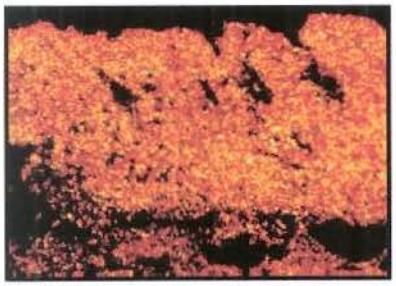

FIGURA 3.27- GC 24 dias

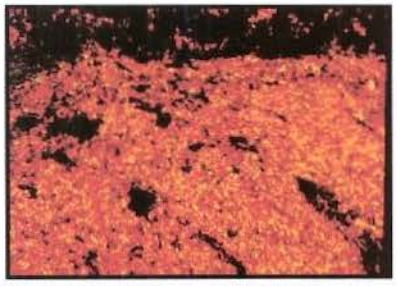

FIGURA 3.28- GTGI 24 dias

DICROÍSMO LINEAR

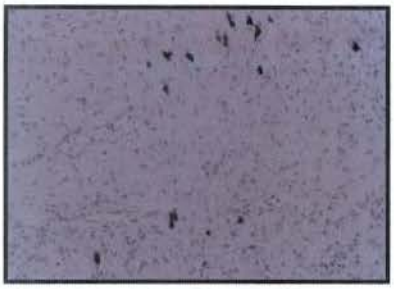

FIGURA 4.1- GC 7 dias

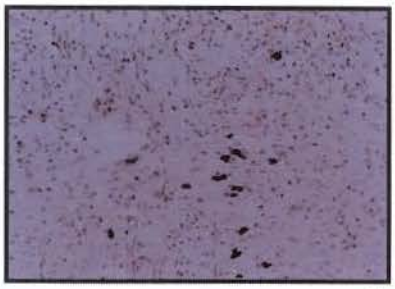

FIGURA 4.2- GC 7 dias

FIGURA 4.3- GC 11 dias

FIGURA 4.4- GC 11 dias

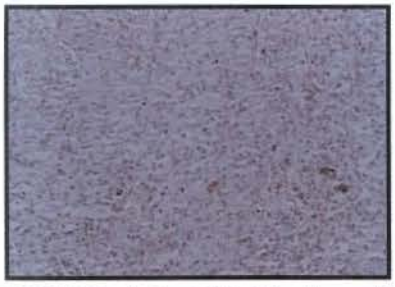

FIGURA 4.5- GFI 11 dias

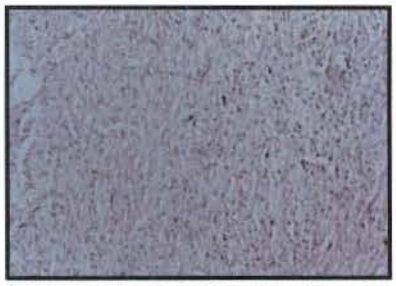

FIGURA 4.6- GFI 11 dias

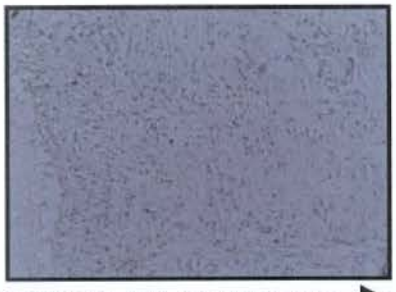

FIGURA 4.7-GFI 14 dias

FIGURA 4.8- GFI 17 dias

DICROÍSMO LINEAR

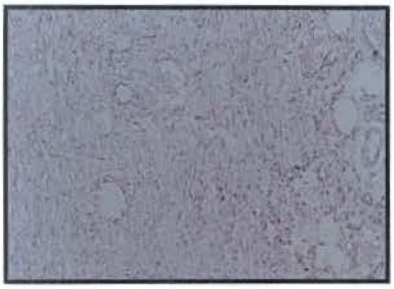

FIGURA 4.9-GTGI 14 dias

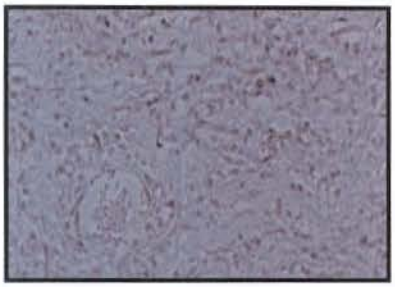

FIGURA 4.10-GTGI 14 dias

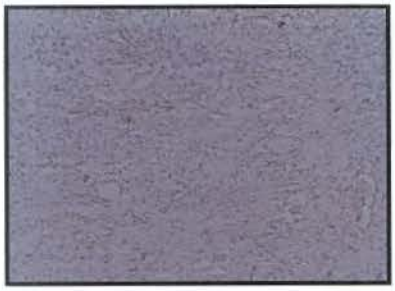

FIGURA 4.11-GTGI 17 dias

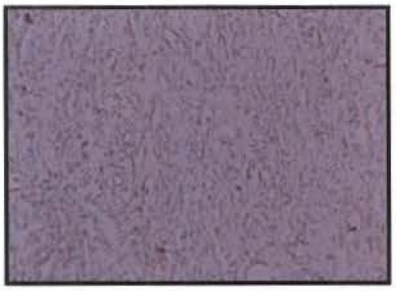

FIGURA 4.12- GTGI 17 dias

COLORAÇÃO HEMATOXILINA-EOSINA

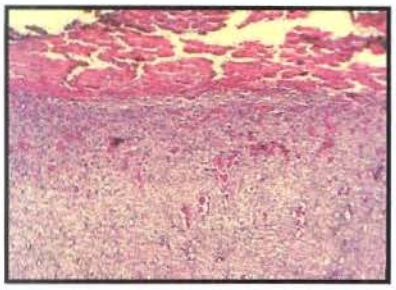

FIGURA 5.1- GFI- 7 dias

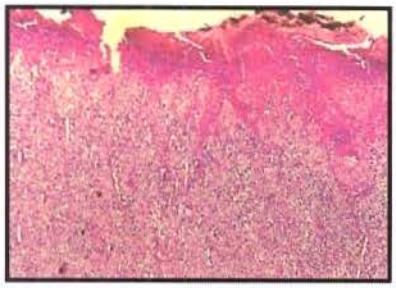

FIGURA 5.2- GTGI- 7 dias

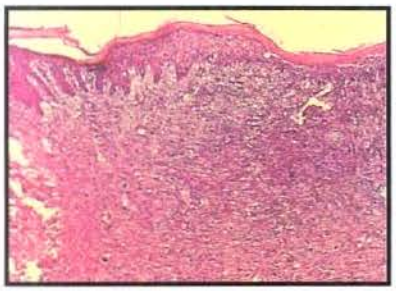

FIGURA 5.3- GFI- 14 dias

FIGURA 5.4- GTGI- 14 dias

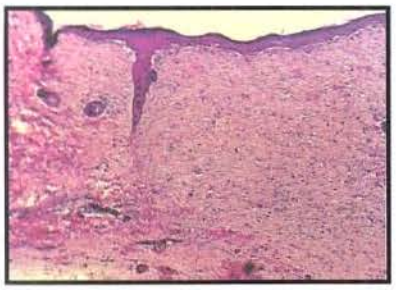

FIGURA 5.5- GFI 17 dias

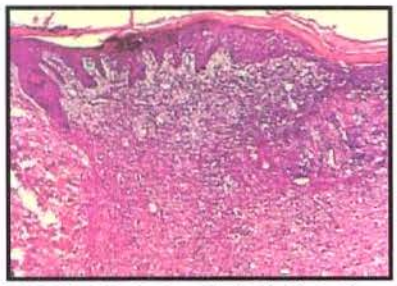

FIGURA 5.6- GTGI 17 dias

EXAME DA BIRREFRINGÊNCIA

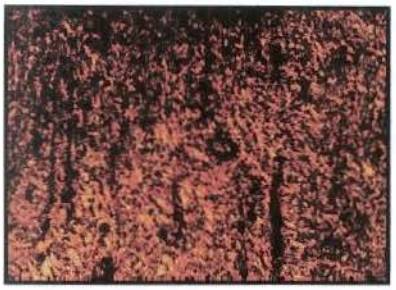

FIGURA 6.1- GFI 7 dias

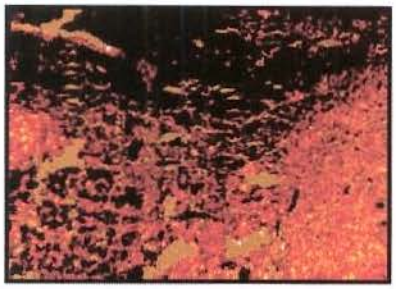

FIGURA 6.2- GTGI 7 dias

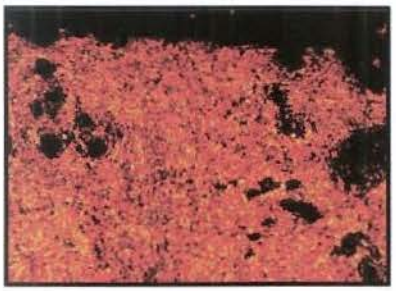

FIGURA 6.3- GFI 14 dias

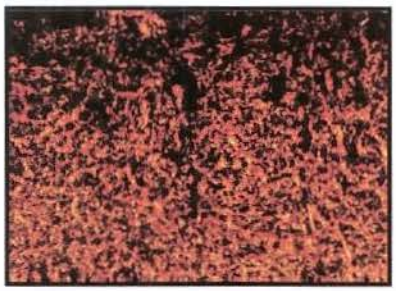

FIGURA 6.4- GTGI 14 dias

FIGURA 6.5- GFI 17 dias

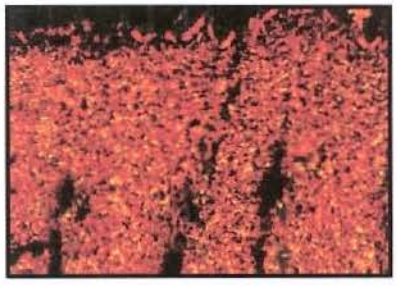

FIGURA 6.6- GTGI 17 dias

DISCUSSÃO

Para irradiação das feridas, o feixe de elétrons foi a radiação de eleição nesta pesquisa, por permitir previsão na deposição da dose no tecido, e avaliação da ação local da radiação ionizante, poupando as células derivadas da medula óssea e tecidos adjacentes como citam MOORE (1984) e BERNSTEIN *et al.*, em 1993.

Durante todo experimento foi observada a mesma ordem na ocorrência dos eventos do processo de reparação, tanto para os tecidos irradiados como para aqueles que não foram submetidos à ação das partículas ionizantes, variando

apenas o tempo de aparecimento e duração das fases da reparação nas feridas excisionais de ratos.

A escolha do modelo experimental, feridas excisionais em ratos, foi baseada na facilidade de obtenção destes animais, em seu pequeno porte, o que facilita o manuseio e acomodação e, pelas observações de HOWES & HARVEY (1935), ROSS & ODLAND (1968) dentre os animais de laboratório, são os que mostram similaridade nas respostas inflamatórias e na fibrogênese àquelas apresentadas pelo homem.

As feridas foram deixadas em aberto para melhor observação dos eventos, pois, na opinião de BERNSTEIN *et al.* (1994), apresentam tendência a repararem-se pela combinação da formação de colágeno novo e contração; aliado a estes fatos, durante a reparação de feridas, os fibroblastos danificados são induzidos a iniciarem o processo de proliferação e tornarem-se metabólicamente mais ativos, resultando na expressão fenotípica dos danos tardios, ainda na fase aguda.

Os elétrons, por serem pouco ionizantes, provocam ionização indiretamente, causando efeitos biológico semelhantes aos causados pelos fótons. Para a dose absorvida de 1 Gy, usada neste experimento, e possuindo os elétrons um fator de peso da radiação (W_R) 1, a eficácia biológica para a dose de 1 Gy de elétrons corresponde à dose equivalente de 1 Sv nos tecidos de reparação. Esta forma de irradiação foi anteriormente usada por MUSTOE *et al.*, em 1989, e CROMACK *et al.*, em 1993, para, pesquisarem a eficácia de substâncias tópicas na reparação de feridas irradiadas.

A dose de 1 Gy foi usada neste experimento por ser considerada baixa dose e por ser dose bastante estudada para verificação dos fenômenos de radioresistência adquirida (JOINER, em 1994, e SALONE *et al.*, em 1996) e verificação da sensibilidade de fibroblastos à radiação em pacientes necessitando radioterapia (WEST em 1995, SALONE *et al.* em 1996, NACHTRAB *et al.* em 1998), para melhor individualização do tratamento, quanto à dose de radiação.

Por cálculos prévios, a dose administrada de 1 Gy, tendo o feixe a energia de 6 MeV, atingiu a profundidade máxima de 1 cm. Segundo a revisão da literatura, realizada por BERNSTEIN *et al.* em 1993, a dose de entrada é relativamente alta

para um feixe com 6 MeV de energia (80% a 90%), quando comparada a fótons de energia similar, poupando tecidos subjacentes.

A avaliação do processo de reparação, nas lâminas coradas pelo método HE, foi baseada nos aspectos histológicos característicos do tecido de granulação: proliferação de pequeno vasos sangüíneos neo-formados, migração de fibroblastos e formação de fibras colágenas.

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

Pudemos observar que o GC, a partir do 7° dia, mostrava disposição ordenada de vasos, coincidentemente aos achados de VIZIOLI (1971), WATANABE *et al.* (1994) e ALMEIDA (1997). O retardo na formação, organização e disposição de vasos, bem como a permanência destes por maior tempo, ficaram patentes, nesta pesquisa, nos tecidos irradiados, denotando atraso em relação ao GC. No 11° dia, quando o GC já apresentava diminuição dos vasos sangüíneos, o grupo GFI ainda mostrava presença de vasos néo- formados, sendo ainda bastante vascularizados no 14° dia. No GTGI, o atraso vascular tornou-se mais evidente pela néo- formação observada ainda no 14° dia e presença de grande número vasos no 17° dia. A maior sensibilidade de GTGI em relação ao grupo GFI, concorda com a opinião de BAKER & KROCHAK (1989) que encontraram menor radiosensibilidade do tecido de granulação antes da total vascularização e no grupo GFI a irradiação ocorreu antes do aparecimento dos vasos no local, e a irradiação no GTGI ocorreu durante o período em que os vasos do local proliferavam.

SUMI *et al.*, em 1983, pelo emprego de microangiografia, observaram coincidência entre o tempo de maior vascularização e o de maior radiosensibilidade, e afirmaram que encontraram ser maior o prejuízo no tecido vascular quando o tecido foi irradiado no 4° dia, quando comparado aos grupos irradiados no 2° dia. Nossos resultados também mostraram maior radiosensibilidade vascular relacionada ao aumento da vascularização.

Em nossos grupos experimentais, pudemos observar maior atraso na angiogênese no grupo GTGI, concordando com os achados de DOTTO *et al.* (1970), que estudaram os efeitos da administração da irradiação imediatamente, 3 e 6 dias após a cirurgia e observaram a menor formação de vasos quando a irradiação ocorreu no 3° dia, quando comparado ao grupo irradiado imediatamente após a cirurgia.

A revista da literatura apontou efeitos discordantes entre os diversos autores, metodologias diferentes; além disso, o emprego de doses diferentes que causam efeitos que delas dependem. BRENK em 1959, com a dose de 4 Gy de raios X ou γ administrados de 7 a 10 dias após a introdução de câmaras, com a finalidade de provocarem a formação de granulomas, não observou alterações vasculares relacionadas ao tipo de radiação. GRILLO & POTSAID (1961), pela técnica de perfusão no sistema vascular, observaram inibição na proliferação de capilares em tecidos irradiados com 7,5 Gy de raios X em feridas excisionais. WANG *et al.* (1996) observaram que os microvasos de leitos pré- irradiados podem sofrer danos radioinduzidos com o uso da dose de 10 Gy.

A transitoriedade das alterações vasculares, por nós observadas, nos tecidos irradiados, foram estudadas quantitativamente por DOTTO *et al.* (1970) e GUIDUGLI NETO (1987), que também encontraram não haver diferenças significativas entre tecidos irradiados ou não, ao tempo final do tempo experimental; apesar dos autores terem utilizado doses bastante superiores a por nós empregada.

O atraso na néo- vascularização, observado nesta pesquisa, quando os tecidos foram irradiados por elétrons, concorda com a observação de DOYLE *et al.*, em 1996, em tecidos irradiados por elétrons de mesma energia e na dose de 9 Gy e por ALMEIDA (1997), com feixes de mesma energia e dose como as usadas neste experimento.

Apesar de não ter seu mecanismo esclarecido, outro fator que pode ter concorrido para as alterações verificadas nos grupos irradiados é o extravasamento prolongado tardio, i.e. aumento da permeabilidade nos capilares e vênulas que se inicia-se de 2 a 12 horas após a agressão por radiações ionizantes e perdura por várias horas ou dias, segundo a opinião de CONTRAN *et al.*, em 1996 e

JOVANOVIC, em 1974, encontrou alterações vasculares devido ao aumento da permeabilidade da membrana basal da túnica adventícia. BAKER & KROCHAK (1989) acrescentaram que o aumento da permeabilidade ocorre devido à despolimerização da substância cimentante de mucopolissacarídeos e liberação de aminas vasoativas.

Nas altas doses as conseqüências da diminuição do suprimento sangüíneo refletem-se nas complicações no processo de reparação, como relatado por SUMI *et al.* (1983), LUCE[3] (1984), MOORE[34] (1984), RUDOLPH *et al.*[46] (1988), MILLER & RUDOLPH[33] (1990), AITASALO *et al.* (1992). Dentre os vários danos causados ao tecido vaso- conjuntivo pela irradiação, LUCE (1984) atribuiu às alterações vasculares, resultantes das altas doses, os maiores prejuízos causados aos tecidos.

DOTTO *et al.* (1970) puderam observar a diminuição vascular associada à redução da atividade da fosfatase alcalina, sugerindo que os eventos observados podem estar relacionados à depressão dos fibroblastos. A atividade desta enzima foi também estudada por VIZIOLI, em 1975, o qual observou aumento relacionado à síntese de colágeno e GAGs e queda de sua atividade após a organização do granuloma.

Apesar de termos observado atraso concomitante da vascularização e das sínteses de colágeno e GAGs, RUDOLPH *et al.*, em 1988, e YANASE *et al.*, em 1993, por seus experimentos, consideraram tratar-se de eventos independentes, pois em seus experimentos a nutrição foi fornecida por meio de cultura, e não dependia da vascularização.

No GC, o aumento da fibrogênese e diminuição dos fibroblastos aconteceu por volta do 11° dia; no GFI, embora tenham sido observados os mesmos eventos, os fibroblastos continuavam em número maior e a fibrogênese no período correspondente ao mesmo tempo do GC, ainda em estágio incipiente; quando a irradiação foi ministrada no 3° dia de formação do blastema de reparação, encontramos tecido bastante celular ainda no 17° dia, tempo no qual os feixes de fibras colágenas iniciavam a formação.

A redução na proliferação de fibroblastos em feridas irradiadas foi encontrado por GRILLO & POTSAID (1961), GRILLO (1963), DOTTO *et al.* (1970), BLYTHE *et*

al. (1975), RUDOLPH *et al.* [46] (1988). CROMACK *et al.* (1993) observaram que apesar do uso de substância aceleradora da reparação tecidual, havia prejuízo na reparação de peles previamente irradiadas,.

Pela microscopia eletrônica foi possível a ROSS & BENDITT (1961) identificarem a presença de fibroblastos 24 horas após a ferida, e pela impregnação pela prata, verificaram que no 5° dia, quando as fibras já apresentavam o fenômeno da birrefringência, também apresentavam a periodicidade peculiar às fibras colágenas. Pelo exame da birrefringência, o aparecimento de fibras argirófilas foi observado em GC, ocorrendo por volta do 4° ou 5° dia, concordando com os achados de ROSS & BENDITT (1961), VIZIOLI (1971), WATANABE *et al.* (1994), ALMEIDA (1997).

Os cortes histológicos submetidos à impregnação pela prata e analisados sob luz polarizada mostraram maior brilho no GC denotando maior quantidade de colágeno e maior grau de orientação macromolecular nos tempos correspondentes aos grupos irradiados. Entre os grupos irradiados, o GFI mostrou maior brilho e portanto maior maturidade tecidual em relação ao GTGI, demonstraram, desta forma que, quando a irradiação ocorre 72 horas após o início da reparação é mais danosa a fibrogênese comparada aos efeitos da irradiação ministrada logo após a realização da ferida.

Nossos achados em relação à questão do tempo transcorrido entre cirurgia e irradiação são bastante concordantes com os achados da literatura, embora os tempos utilizados nos vários trabalhos sejam bastante variados. Ficou patente em nosso experimento que, após a migração, quando as células já estão presentes no local a ser irradiado, os efeitos danosos são mais evidentes. Outro fator que pode ter concorrido para os efeitos mais proeminentes no grupo GTGI foi a presença dos vasos no local permitindo maior oxigenação tornando as células mais sensíveis aos efeitos da radiação. HALL (1994) e BAKER & KROCHACK (1989) destacaram a diminuição da radiosensibilidade devida à hipóxia de alguns tumores.

No tempo 24 horas após a perda tecidual, pela microscopia eletrônica, SHILLING *et al.* (1953) e ROSS & BENDITT (1961) encontraram presença de fibroblastos no local a ser restaurado; por estas observações, podemos sugerir que

quando a irradiação é administrada e os fibroblastos estão presentes no local e as células são atingidas diretamente pela radiação existe maior prejuízo tecidual.

BLYTHE *et al.* (1975), em estudo no qual os tempos transcorridos entre a cirurgia e irradiação foram coincidentes com os nossos, também encontraram maior depressão na atividade dos fibroblastos no grupo irradiado aos 3 dias quando comparado ao irradiado imediatamente após a cirurgia. MOORE (1984) encontrou ser a radiação menos danosa à reparação antes de significativa proliferação celular e que a radiação ministrada 1 dia após a perda tecidual pode provocar maior atraso do que quando ministrada imediatamente após a cirurgia, sendo o mesmo verificado por POHLE *et al.* (1931) com a dose de radiação X de 10 Gy.

As diferenças no tempo de formação dos feixes de colágeno, entre os 2 grupos experimentais (GFI e GTGI) quando comparados ao GC, foram também observadas por autores que trabalharam anteriormente com elétrons como WANG *et al.* (1994) com a dose de 9,6 Gy e ALMEIDA (1997), irradiando a periferia de feridas com a dose de 1 Gy observou maior prejuízo das feridas irradiadas 72 horas após a realização das feridas quando comparadas às feridas irradiadas imediatamente após a perda tecidual.

WATANABE *et al.* (1994), quando comparando grupos que receberam dose única àqueles que receberam dose fracionada, encontraram maior atraso onde a mesma dose foi dada de forma fracionada, atingindo desta forma células em período de intensa proliferação nas 24 e 48 horas após a realização das feridas.

O efeito de depressão causado pela radiação ionizante sobre os fibroblastos da derme também foi observado por ARCHER *et al.* (1970) pela detecção de menor taxa de hidroxilação da prolina C^{14} do colágeno nascente após uma única dose de irradiação, sendo o grau e duração da inibição dose- dependentes. MUSTOE *et al.* (1989) e CROMACK *et al.* (1993), utilizando elétrons com 6 MeV de energia em doses superiores às por nós utilizadas, também confirmam que a radiação ionizante produz depressão na formação do colágeno.

BRENK (1959) considerou, no final do tempo experimental, a reparação bem sucedida, apesar de uma menor quantidade volumétrica do tecido formado. Considerou, ainda, que a reparação exuberante, quando são utilizadas altas doses, é

prejudicial à restauração dos tecidos, como acontece nos quelóides e cicatrizes hipertróficas.

A depressão na formação do colágeno, devido à ação de elétrons, tem sido comprovada por vários pesquisadores e utilizada como recurso terapêutico em pacientes que apresentam tendência à formação de cicatrizes exuberantes. As doses recomendadas por autores como LO *et al.* (1990) em caso de cicatrizes exuberantes são superiores às utilizadas nesta pesquisa, e o efeito evidenciado e observado macroscopicamente.

O atraso na reparação tecidual, embora tenha se mostrado transitório nos grupos irradiados, levam-nos a discordar de autores para os quais os efeitos só começam ser evidentes com doses superiores às utilizadas nesta pesquisa. MOORE (1984) e DRAKE & OISHI (1995) encontraram, na literatura, que a dose de até 3 Gy não afeta significativamente a reparação, tendo inclusive efeito estimulante. Em nossa pesquisa não encontramos evidências de estimulação da reparação nos tecidos irradiados. Sugerimos que MOORE (1984) e DRAKE & OISHI (1995) tenham considerado a fase final do processo e não os eventos que ocorreram durante a evolução do tecido de reparação.

O atraso dos grupos irradiados aponta também em direção contrária à opinião de RODEMANN & BAMBERG (1995). Para os quais as doses compreendidas entre 1 a 10 Gy de radiação ionizante, induzem a uma diferenciação terminal precoce do sistema de células fibroblastos dentro de 2 ou 3 semanas, levando às severas alterações na homeostasia do tecido, resultando no fenótipo fibrótico de vários tecidos como pulmonar, renal e pele de várias espécies de mamíferos inclusive o homem.

Em culturas de fibroblastos de úlceras humanas em locais préviamente irradiados, RUDOLPH *et al.* (1988) verificaram atraso nas culturas dos fibroblastos oriundos das adjacências das úlceras quando comparados aos fibroblastos obtidos de locais não irradiados, concordando com os nossos achados em relação ao atraso provocado pela irradiação na proliferação celular.

O atraso temporário na multiplicação celular observada em nosso experimento foi também relatado nos trabalhos de POHLE *et al.* (1931), POHLE *et al.* (1949)

atribuída à aproximação das feridas pelos autores, HARRINGTON (1960) em culturas celulares, WANG *et al.* (1994), WATANABE *et al.* (1994) e ALMEIDA (1997). O achado de POHLE *et al.* (1949) não foi confirmado por LOURENÇO em 1998.

Em 1956, PUCK & MARCUS concluíram que o atraso provocado pela radiação expressa-se na 5ª ou 6ª geração, mas WHITMORE & TILL (1964) em revista a literatura, encontraram que o atraso geralmente ocorre na primeira geração após a irradiação e afeta todas as células. Em populações assincrônicas, a resposta final de todo processo, na opinião de ELKIND *et al.* (1961) e relatada por WHITMORE & TILL (1964), seria a soma dos efeitos de reparação do dano sub-letal. Ao mesmo tempo em que algumas células apresentam um estado de resposta aumentada à radiação, outras apresentam resposta reduzida, restaurando o dano e progredindo em direção à próxima divisão, e a progressão seria em direção ao estado de resposta à radiação diminuída.

A dose de 1 Gy mostrou-se suficiente para causar extensão da fase G2 e reduzir o índice mitótico no trabalho de SALONE *et al.* (1996). JOINER (1994) questiona se a localização do reparo do dano reside no controle do ciclo celular ou em outro processo.

A irradiação no 3º dia da gênese tecidual mostrou-se mais prejudicial em outros aspectos além daqueles por nós estudados; ARCHER *et al.* (1970) verificaram diminuição da resistência à força de tensão; AITASALO *et al.*,em 1992, em leitos pré- irradiados por elétrons com 20 Gy, teceram as mesmas considerações. Esta adversidade causada aos tecidos irradiados, para MUSTOE *et al.* (1989), parece ser minimizada pelo uso do fator de crescimento derivado de plaquetas PDGF-BB. BLYTHE *et al.* (1975) encontraram não haver diferença significante entre os grupos irradiados ou não, mas verificaram menor resistência no 8º dia, em feridas irradiadas com 10 Gy no 3º dia após a produção da ferida.

Por termos deixado as feridas se repararem por 2ª intenção, pudemos observar o fenômeno de contração, e embora não tenhamos realizado mensurações, pudemos observar que nas feridas controles a contração foi mais efetiva quando comparadas às feridas irradiadas. GRILLO *et al.*, em 1958, e WATTS *et al.* (1958) estudaram o fenômeno da contração, em feridas que se curam por 2ª intenção pela

mensuração das áreas, sendo que WATTS *et al.*[63] (1958) concluíram que a maior parte da contração situa-se nas margens das feridas. GRILLO & POTSAID (1961), medindo as áreas, observaram efeitos danosos mais pronunciados na contração quando os tecidos foram irradiados 36 horas após a ferida. YANASE *et al.* (1993) relataram inibição temporária na contração com dose de 2 a 10 Gy e havendo retomada do fenômeno na 2ª ou 8ª semanas.

A irradiação parece também interferir com a qualidade do tecido formado durante a reparação. SIEBERT *et al.* (1990) relacionaram a qualidade do tecido formado, após a perda tecidual, ao teor de GAGs e que a ocorrência de regeneração ou reparação seria determinada pelo teor de GAGs. WANG et al. (1994) verificaram que a retomada em direção à força de tensão normal reflete a taxa de formação de colágeno e a sua organização tecidual. ALMEIDA (1997), quantificou o teor de GAGs em tecidos de reparação irradiados ou não; entre os grupos irradiados encontrou maior teor de GAGs nos tecidos irradiados imediatamente após a cirurgia do que quando irradiado no 3º dia de formação, mas a maior quantidade de GAGs foi encontrada nos tecidos não irradiados, sugerindo melhor qualidade do tecido de reparação quando não exposto ao feixe de elétrons.

No tocante à origem dos fibroblastos no processo de reparação tecidual, ainda hoje a literatura não apresenta total concordância. Alguns autores defendem a hipótese da origem local de células quiescentes residentes na periferia da ferida, enquanto outros aceitam a hipótese hematógena. GRILLO (1964), em sua revisão de trabalhos anteriores, encontrou que as discordâncias na literatura, quanto à origem dos fibroblastos ser local ou hematógena , são devidas aos métodos empregados sendo impossível dissociar as respostas proliferativas dos capilares e fibroblastos.

Concordam com a origem local dos fibroblastos, autores que empregaram metodologias, doses, fontes de radiação, células diferentes, como MACDONALD, em 1959, que pelo uso de marcadores radioativos, concluiu serem os fibroblastos no tecido de reparação oriundos do tecido conjuntivo fixo que sofrem posterior divisão para formarem novos fibroblastos. Concordam, também, com estes achados: GRILLO & POSTSAID (1961), GRILLO (1963), TOTO & ABATI (1963) que pela marcação radioativa, os fibroblastos mostraram ser originados somente de células

indiferenciadas do tecido conjuntivo frouxo de reserva da derme e da camada sub-muscular; ROSS & ODLAND (1968) em feridas humanas e com base no desenvolvimento do retículo endoplasmático rugoso; ROSS *et al.* (1970) colocam em animais parabióticos e marcação radioativa; STEWART *et al.* (1981) usando marcação pelo cromossomo sexual em humanos.

O dano dos fibroblastos residentes nas circunjacências da ferida e atingidas pela irradiação foi demonstrado por ALMEIDA (1997), trabalhando com a fonte de radiação e dose, iguais às utilizadas nesta pesquisa; a autora encontrou depressão na formação de colágeno em feridas cujas periferias foram expostas à irradiação.

Acreditamos que sendo elétrons a fonte de radiação por nós utilizada, com deposição da dose máxima a 1 cm da superfície irradiada, e por haverem sido poupadas as adjacências das lesões pela proteção da lâmina de chumbo, sugerimos que a depressão de colágeno nos grupos irradiados se deva ao maior tempo necessário para a remoção do material necrótico dos tecidos irradiados, com conseqüente atraso na migração fibroblástica. Os danos mais evidentes do grupo GTGI são devidos a presença dos vasos e células, principalmente fibroblastos, no local, sendo diretamente atingidos pela radiação e produzindo maior quantidade de material necrótico.

Além de responsáveis pela formação das fibras colágenas, atualmente é atribuída aos fibroblastos, a função de degradação do colágeno nos processos de reparação, sendo eles responsáveis pela remodelação do tecido em formação como registrado na literatura pelos trabalhos de TEN- CATE & FREEMAN (1974), BLYTHE *et al.* (1975), UZUNIAN (1979).

Os fibroblastos, responsáveis pela produção das moléculas de tropocolágeno, e também responsáveis pela síntese das glicosaminoglicanas (GAGs), como relatado por VIZIOLI em 1971 e por ele estudado pelo aparecimento do dicroísmo por meio da reação histoquímica pela metacromasia, indicaram ser o período compreendido entre o 7° e 10° dias, aquele de organização tecidual. Em nosso trabalho, encontramos que, em relação a este fenômeno, ele ocorreu no 7° dia, concordando com o resultado encontrado por VIZIOLI (1971). Pudemos observar atraso na maturação dos grupos irradiados, uma vez que no grupo GFI o fenômeno do dicroísmo

apareceu a partir do 11^0 dia e no grupo GTGI a partir do 14^0 dia demonstrando com isto considerável atraso no tocante à orientação macromolecular dos tecidos irradiados. O atraso sofrido pelos grupos irradiados fica patente, também, quando comparamos nossos controles aos resultados de VIZIOLI, em 1975, que observou ser o 15^0 dia o tempo no qual ocorreu diminuição da capacidade reativa do tecido à coloração metacromática indicando a ligação substância fundamental – colágeno; no GTGI o fenômeno da metacromasia passou apresentar-se de forma inicial somente no 14^0 dia, indicando que até então havia presença de radicais ainda livres nas moléculas das GAGs para reagirem com o corante.

A desorganização da arquitetura em tecidos de reparação irradiados também foi observada por BLYTHE *et al.* (1975) e AITASALO *et al.* (1992) em leitos pré-irradiados e que posteriormente receberiam enxertos.

No aspecto epitelial, a proliferação teve início no 7^0 dia no GC e no 11^0 dia recobria totalmente a ferida, enquanto que, aos 7 dias, o grupo GFI ainda não apresentava evidências de cobertura epitelial. Os quadros apresentados pelos grupos GFI e GTGI mostraram atraso maior, pois o epitélio recobria as superfícies no 17^0 dia, mas ainda mostravam maior espessura e menor maturação. Provavelmente isto tenha ocorrido pelo fato de o epitélio depender inteiramente das condições que o tecido conjuntivo lhe proporciona, em têrmos de nutrição principalmente. Assim, ele só se assenta sobre a ferida quando o tecido subjacente tem condições de fornecer-lhe nutrição

Em relação à cobertura epitelial, chamou-nos a atenção o fato de que em GC ela ocorria no momento em que o número de células e vasos sofriam diminuição e havia um relativo aumento da fibrogênese (11^0 dia), já nos grupos irradiados, a cobertura epitelial do tecido de granulação se deu quando o tecido subjacente ainda apresentava-se bastante celular e com muitos vasos (GFI no 14^0 dia e GTGI no 17^0 dia); estes resultados não concordam com POHLE *et al.* (1949) que concluíram não haver diferença neste aspecto entre os grupos irradiados ou não. Observamos, também, que a cobertura epitelial antecedeu o fenômeno de contração da ferida em todos os nossos grupos; esta seqüência de eventos foi observada macroscopicamente por GRILLO *et al.* (1958) na maioria dos casos, quando a

mensuração da área de feridas foi o critério escolhido. MOORE[34] (1984) chamou atenção para o fato de que as alterações epiteliais, nos casos de radioterapia, mascaram os efeitos da radiação no tecido conjuntivo em se considerando as altas doses terapêuticas. O atraso na migração epitelial em tecidos irradiados foi observado por WANG *et al.* (1994) e WANG *et al.* (1996) com o uso de alta dose e ALMEIDA em 1992 com baixa dose de elétrons. LOURENÇO (1998) observou que o atraso na migração epitelial, em feridas irradiadas com 7,4R, independe da presença de sutura.

Os estudos sobre o dano causado pela radiação têm demonstrado grande preocupação com relação ao DNA, pela importância na reprodução celular, pela localização e tamanho da molécula. Enquanto as altas doses causam danos letais e impedem a reprodução celular, nas baixas doses os danos são sub-letais permitindo recuperação da função de reprodução, intimamente ligada a radiosensibilidade do DNA, reconhecida e referida como alvo chave por BERNSTEIN *et al.* em 1993.

A dose de 1 Gy de elétrons no processo de reparação do tecido conjuntivo mostrou provocar danos sub- letais, pois ao final os grupos irradiados apresentaram características semelhantes ao grupo não irradiado. Ao contrário dos autores anteriores, PUCK & MARCUS (1956), trabalhando com células HeLa, verificaram danos letais com a dose de 1Gy, mas chamaram a atenção para o alto grau de sensibilidade dessas células à radiação.

Uma possível explicação para o atraso na reparação verificado em nossos grupos irradiados resida nos genes *checkpoint* molecular, que têm por função controlar o ciclo celular, assegurando a ordem correta dos eventos após pequenas doses de radiação, como relatado por HALL (1994). O atraso verificado nos grupos irradiados sugere que um período de tempo tenha sido gasto na reparação dos danos da irradiação, antes que a mitose tenha sido empreendida, já que no final do tempo experimental os resultados de todos os grupos mostraram-se bastante semelhantes – reparo do dano subletal.

As evidências em populações sincrônicas, i.e. todas as células encontram-se na mesma fase do ciclo celular em um determinado momento, apontam que o bloqueio celular tende a ocorrer nas fases G2 e M do ciclo, por serem estas as fases

mais radiosensíveis. YAMADA & PUCK (1961), trabalhando com dose próxima àquela por nós utilizada (1,35 Gy), encontraram que o bloqueio no ciclo celular ocorre na fase tardia de G2, sendo seguida por um excesso transitório na taxa de entrada de células na mitose ou divisão; TILL (1961) com as doses de 20Gy a 50Gy, WHITMORE & TILL (1964) sugeriram que imediatamente antes da mitose (final de G2) ocorre o acúmulo de células; BACCHETTI & SINCLAIR (1971) confirmam achados anteriores sobre o atraso em G2 e acrescentaram observações sobre o aumento no tamanho das células devido ao acúmulo de RNA e outras proteínas. A dose de 1 Gy mostrou-se suficiente para causar extensão da fase G2 e reduzir o índice mitótico no trabalho de SALONE *et al.* (1996). JOINER (1994) acha questionável a localização do reparo do dano, se no controle do ciclo celular ou em outro processo.

O atraso, mas o não impedimento do processo de reparação, quando utilizada a dose de 1 Gy de elétrons, quer seja em ferida ou em tecido de granulação com 3 dias de formação é visto por MAITY *et al.* (1994) como sendo de importância, pois a sua ausência está ligada a diminuição da sobrevida das células.

Ao final do período experimental, quando os grupos irradiados apresentavam-se semelhantes aos controles, fomos levados a crer na ocorrência de mecanismos compensatórios eficientes, para repararem os danos causados pela irradiação.

CONCLUSÕES

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

1. A irradiação por elétrons produziu danos ao processo de reparo dos tecidos;

2. Esses danos traduziram-se em inibição parcial e conseqüente atraso no desenvolvimento dos tecidos de granulação dos grupos experimentais;

3. Os tecidos de granulação irradiados 3 dias após a cirurgia mostraram-se mais sensíveis à irradiação do que os correspondentes irradiados imediatamente após a cirurgia;

4. O atraso no desenvolvimento dos tecidos de granulação irradiados não impediu a evolução dos tecidos em direção à cicatrização final das feridas, em ambos os grupos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

1. AITASALO K. *et al* Healing of microvascular free skin flaps in irradiated recipient tissue beds. **Am J Surg**, New York, v.164, p.662-666, Dec 1992.

2. ALMEIDA, S. M. **Efeito da radiação de elétrons na reparação tecidual** Piracicaba,1997. 103p. Tese (Doutorado)- Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas.

* De acordo com a norma NBR 6.023, de 1989, da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT). Abreviatura dos periódicos em conformidade com medline/ Lilacs.

3. ARCHER R.R. *et al.* Irradiation effects on wound healing in rats. **Rad Res**, New York, v. 41, p.104-112, 1970.

4. BACCHETTI S., SINCLAIR W.K. The Effects of x-ray on the synthesis of DNA, RNA, and proteins in synchronized Chinese Hamster Cells. **Rad Res**, New York, v.45, p.598-612, 1971.

5. BAKER, D.G., KROCHAK, R.J. The response of the microvascular system to radiation: a review. **Cancer Invest,** New York, v.7 n.3 p.287-294, 1989.

6. BERNSTEIN E.F. *et al.* Biology of chronic radiation effect on tissue and wound healing. **Clin Plastic Surg,** Philadelphia, v.20, n.3, p.435- 453, July 1993.

7. _____. *Et al* Healing impairment of open wounds by skin irradiation. **J Dermatol Surg Oncol**, New York, v.20, n. 11, p. 757- 760, 1994.

8. BLYTHE J.G., BUCHSBAUM H.J., ALLEN T.J. The effect of delaying radiation on wound healing. **Gynecol Oncol**, New York, v.3, p.210-214, 1975.

9. CASARET G. in **Celular basis and aetiology of late somatic effects of ionizing radiations.** New York, Academic Press 1963 apud HALL, E.J. **Radiobiology for the radiologist**. 4 ed. Philadelphia: J.B. Lippincott Co., p.69 1994.

10. CONTRAN R. S. *et al.* Inflamação e Reparação. In: **Robbins patologia estrutural e funcional**. 5ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan. 1996. Cap. 3, p.45-83.

11. CROMACK et al Acceleration of tissue repair by transforming growth factor ß1: Identification of in vivo mechanism of action with radiotherapy- induced specific healing deficits. **Surgery,** Saint Louis, v.113, n.1, p.36- 42, Jan 1993.

12. **DORLAND'S illustrated medical dictionary.** 28. ed. Philadelphia: W.B. Saunders Co., 1994. 1940 p. passim

13. DOTTO C. A. *et al.* Quantitative study of vascular response in irradiated wounds. **Surg Gynecol Obstet,** Chicago, v.130, n.5, p.875-878, May 1970.

14. DOYLE J.W. *et al.* The effects of irradiation on neovascularization in a rat model. **Plast Reconstr Surg**, Baltimore, v.98, n.1, p.129- 135, July 1996.

15. DRAKE D.B., OISHI S.N. Wound healing considerations in chemotherapy and Radiation therapy. **Clin Plast Surg**, Philadelphia, v.22, n.1, p.31-37, Jan. 1995.

16. ELKIND, M.M.; SUTTON, H.; MOSES W.B. **J. Cellular Comp. Physiol**., v.58, Suppl.1, p.113-134. Apud WHITMORE G.F., TILL J.E. Op. cit. Ref.64.

17. GRILLO, H.C. Derivation of fibroblasts in the healing wounds. **Arch Surg**, Chicago, v.88, p.218-224, Feb.1964.

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

19. _____., POTSAID M.S. Studies in wound healing IV- Retardation of contraction by local x- irradiation, and observations relating to the origin of fibroblasts in repair. **Ann Surg**, Philadelphia, v. 154, n.5, p. 741-750, Nov. 1961.

20. _____.,WATTS G.T., GROSS J. Studies in wound healing: I . Contraction and the wounds contents. **Ann Surg**, Philadelphia v. 148, n.2, p. 145-152, Aug. 1958.

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

22. HALL, E.J. **Radiobiology for the radiologist**. 4th ed. Philadelphia: J.B. Lippincott Co., 1994. 478 p. passim.

23. HARRINGTON H. Effect of irradiation on cell division and nucleic acid synthesis in strain U-12 fibroblasts. **Biochim Biophys Acta**, Amsterdam, v.41, p. 461-469, 1960.

24. HOWES E.L., HARVEY S.C. The clinical significance of experimental studies in wound healing. **Ann Surg**, Philadelphia,v.102, n.5, p.941-946, Nov. 1935.

25. JOINER M. C. Evidence for induced radioresistance from survival and others end points: An introduction **Rad Res**, New York, n.138 p.s5-s8, 1994.

26. JOVANOVIC D. The influence of radiation on blood vessels and circulation. chapter V- Non cellular factors. **Curr Top Radiat Res Q**, Amsterdam v.10, p. 75-84, 1974.

27. LISON, L. **Histochimie et citochemie animales: principes et méthodes**. Paris, Gauthier-villais,1960. v.1 p.280.

28. LO, T.C.M. *et al.* Single-dose electron beam irradiation in treatment and prevention of keloids and hipertrophic scars. **Radiother Oncol**, Limerick, v.19, n.3, p.267-72, Nov 1990.

29. LOURENÇO, R.M. **Efeito de baixas doses de radiação X em feridas suturadas e não suturadas**. Piracicaba, 1998. 103p. Tese (Mestrado) – Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas.

30. LUCE E. A. The irradiated wound. **Surg Clinf N Am,** Philadelphia, v. 64, n.4 p. 821-829 Aug. 1984

31. MACDONALD R.A. Origin of fibroblasts in experimental healing wounds: auto-radiographic studies using tritiated thyamidine. **Surgery**, Saint Louis, v.46, n.2, p.376-382, Aug. 1959.

32. MAITY, A.; McKENNA, W.G.; MUSCHEL, R.J. The molecular basis for cell cicle delays following ionizing radiation: a review **Radiother Oncol,** Limerick, v.31 p.1-13 1994.

33. MILLER, S.H., RUDOLPH, R. Healing in the irradiated wound. **Clin Plast Surg**, Philadelphia, v.17 n.3 p.503-508, July 1990.

34. MOORE M. J. The effect of radiation on connective tissue. **Otolaryngol Clin N Am**, v.17, n.2, p.389-398, May 1984.

35. MUSTOE, T. A. *et al* Reversal of impared wound healing in irradiated rats by Platelet- Derived Growth Factor –BB **Am. J Surg**, New York, v.158 p. 345-350 Oct. 1989.

36. NACHTRAB U. *et al* Radiation-induced micronucleus formation in human skin fibroblasts of patients showing severe and normal tissue damage after radiotherapy. **Int J Radiat Biol**, London, v.73, n.3, p.279-287, 1998.

37. PEACOCK J.H.,NAHUM A.C., STEEL G.G. Normal-tissue effects in radiotherapy: physics meets biology. Report on a workshop held at Hartsfied Manor, Betchworth, Surrey, UK, 14-16 July 1997. **Int J Radiat Biol**, London, v.73 n.3 341-344, 1998.

38. POHLE E.A., RITCHIE G., MOIR W. W. Studies of the effect of Roentgen rays on healing of wounds III- Histological changes in skin wounds in rats following postoperative irradiation with very small and moderate doses. **Radiology**, Easton, v.52, p.707- 713, May 1949.

39._____., _____., WRIGHT C. S. Studies of the effect of Roentgen rays on the healing of wounds I –The behavior of skin wounds in rats under pre- or post- operative irradiation. **Radiology,** Easton, v.16, p.445-460,1931.

40. PUCK T.T. & MARCUS P. Action of X-rays on mammalian cells. **J Exp Med**, New York, v.103 p.653-666, 1956.

41. RODEMANN, H.P., BAMBERG M. Cellular basis of radiation-induced fibrosis **Radioth. Oncol.** Limerick, v.35 p.83- 90 1995

42. ROSS R. & BENDITT E. P. Wound healing and collagen I- Sequential changes in components of guinea pig skin wounds observed in the electron microscope **J Biophys Biochem Cytol**, New York, v.11 p.677 -700, 1961.

43. _____, ODLAND G. Human wound repair II. Inflammatory cells, epithelial-mesenchymal interrelations, and fibrogenesis. **J Cell Biol**, New York, v.39, p.152-168, 1968.

44. _____., EVERETT B., TYLER R. Wound healing and collagen formation VI- The origin of the wound fibroblast studied in parabiosis. **J of Cell Biol**, New York, v.44, n.3, p.645-654, March 1970.

45. ROSSI H.H. Correlation of radiation quality and biological effect. **Ann N Y Acad Sci**, New York, v..114, p.4-15 Mar., 1964.

46. RUDOLPH R., *et al* Slowed Growth of cultured fibroblasts from human radiation wounds. **Plas. Reconstr Surg**, Baltimore, v.82, n.4, p.669-675, Oct. 1988.

47. SALONE B. *et al* Interaction of low-dose irradiation with subsequent mutagenic treatment: role of mitotic delay. **Mutat Res**, Amsterdam, v.358, p.155- 160, 1996.

48. SCHILLING J. A., FAVATA B. V., RADAKOVICH M. Studies of fibroplasia in wound healing. **Surg Gynec Obst**, Chicago, v. 96, p.143-149, 1953.

49. SIEBERT J. W. *et al* Fetal wound healing: A biochemical study of scarless healing. **Plast Reconst Surg**, Baltimore, v.85, n.4, p.495- 502, Apr. 1990.

50. STEWART, R.J. *et al.* The wound fibroblast and macrophage. II: Their origin studied in a human after bone marrow transplantation. **Br J Surg**, Guilgford, v.68 p. 129-131 1981.

51. STORER J. B. Recovery from radiation injury in mammals. **Ann N Y Acad Sci,** New York, v..114, p.126-137, Mar. 1964.

52. SUMI Y. *et al* Effects of irradiation on grafted skin **J Oral Maxillofac Surg**, Orlando, v.41 p 586- 591, 1983.

53. TEN-CATE A. R., FREEMAN E. Collagen remodelling by fibroblasts in wound repair. Preliminary observations. **Anat Rec**, New York, v.179, p.543-546,1974.

54. TILL J.E. Radiation effects on the division cycle of mammalian cells in vitro. **Ann N Y Acad Sci**, New York, v.95, p.911-919, 1961.

55. TOTO, P. D., ABATI A. The histogenesis of granulation tissue. **Oral Surg, Oral Med Oral Pathol**, Saint Louis, v.16, n.2, p.218-227, Feb. 1963.

56. UZUNIAN A. Electron microscopy of collagen resorption by fibroblasts in wound repair of the albino rat skin. **Rev Bras Pesq Méd Biol**, São Paulo, v.12, n.4-5, p.347-350, 1979.

57. VAN DER BRENK H. A. S The effect of ionizing radiations on capilary sprouting and vascular remodelling in the regenerating repair blastema observed in the rabbit ear chamber. **Am J Roentgenol**, Springfied, v.81, n.5, p.859-884, May 1959.

58. VIZIOLI M.R. Macromolecular organization of rat sponge-induced granulation tissue as reveled by dichroism. **Acta Anat**, Basel, v.80, p.73-80, 1971.

59. _____. "Noções de microscopia de polarização" e seu emprego em biologia. **Bol Fac Odont Piracicaba.** n.72, p.1-25,1973.

60. _____. **Relação entre fosfomonoesterases e a síntese de colágeno e mucopolissacarídeos ácidos no tecido de granulação**. Piracicaba: 1975. 61p. Tese (Livre Docência) – Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas.

61. WANG Q., DICKSON G.R., CARR K. E. The effect of graft-bed irradiation on the healing of rat skin grafts. **J Invest Dermatol**, New York, v.106, n.5, 1053-1057, 1996.

62. _____, *et al.* Electron irradiation slows down wound repair in rat skin: A morphological investigation. **Br J Dermatol**, Oxford, v.130, p.551-560, 1994.

63. WATANABE P. C. A. *et al.* Efeitos de baixas doses de radiação sobre a gênese e evolução do tecido de granulação. **Rev Odontol Univ S Paulo,** São Paulo, v.8 n.2 p.137-143, abr./jun. 1994.

64. WATTS, G.T., GRILLO H. C., GROSS, J. Studies in wound healing: II. The role of granulation tissue in contraction. **Ann Surg**, Philadelphia, v.148, n.2, p.153-160, Aug 1958.

65. WEST, C.M.L. Invited review: Intrinsic radiosensitivity as a predictor of patient response to radiotherapy **Br J of Radiol,** London, v.68 n.812 p.827-837 Aug.1995

66. WHITMORE G.F., TILL J.E. Quantitation of cellular radiobiological responses **Ann Rev Nucl Sci,** Stanford, v.14, p. 347-374, 1964.

67. YAMADA, M. & PUCK, T.T. Action of radiation on mammalian cells. IV Reversible mitotic lag in the S3 HeLa cell produced by low doses of x-rays. **Proc Natl Acad Sci,** Washington, v.47 p.1181-1191, 1961.

68. YANASE A., *et al* Irradiation effects on wound contraction using a connective tissue model. **Ann Plast Surg**, Boston, v.30, n.5 p.435-440, May 1993.

GLOSSÁRIO

BIRREFRINGÊNCIA DE FORMA – é o tipo de anisotropia encontrada em corpos mistos, onde as partículas assimétricas de um dado índice de refração são dispersos de uma maneira preferencialmente orientada em um meio de diferente índice de refração.

CÉLULAS HELA – células oriundas de um carcinoma ginecológico. Muito utilizadas em culturas celulares.

CICATRIZES HIPERTRÓFICAS E QUELÓIDES – lesões tumorais benígnas de tecido mole que histopatológicamente apresentam produção excessiva de colágeno pelos fibroblastosativos durante a reparação e desordem das fibras colágenas.

CICLO CELULAR – Pode ser dividido em quatro fases: mitose (fase M) período de divisão celular, seguida pela fase aparentemente inativa G1 , seguida pela fase de síntese do DNA (fase S) que é seguida pela fase aparentemente inativa G2, e novamente fase de mitose fase M.

DICROÍSMO (PLEOCROÍSMO) – Fornece indicações sobre a orientação macromolecular da substância examinada a luz da microscopia de polarização.

DOSE "BUILD-UP" ou de construção–dose fornecida a região anterior àquela de deposição da dose máxima.

ESTROMA – tecido suporte ou matriz de um órgão.

FENÔMENO DE SUPER-REGENERAÇÃO – competência intrínseca do endotélio irradiado, de permanecer intacto apesar do crescimento cessar no blastema.

KEV – unidade de energia possuída pelo elétron acelerado por 1.000 volts .

LET – indica a quantidade de energia transferida pelo feixe de radiação por unidade de comprimento da trajetória.

LUZ POLARIZADA – feixe de luz onde são removidos todos os componentes vibratórios, deixando apenas o componente que indica a direção de propagação. Vibra em dois planos (vertical e horizontal) mas em uma única direção.

MICRONÚCLEOS – são formados por fragmentos de cromatina e de cromossomos completos (mal distribuídos) após a mitose e visíveis na interfase.

PARÊNQUIMA – elementos essenciais ou funcionais de um órgão.

R- unidade de exposição relacionada a capacidade dos raios X ionizarem o ar.

RBE – energia absorvida por unidade de massa do tecido.

RESPOSTA ADAPTATIVA – Resposta reduzida das células a altas doses de irradiação quando precedida por irradiação a baixas doses.

SHAM IRRADIADO – simulação perfeita das condições impostas ao grupo irradiado.

SUBSTÂNCIA ANISÓTROPA (OU ANISOTRÓPICA) – possui mais que um índice de refração para uma dada freqüência sendo então denominada de birrefringentes ou substância de dupla refração.

W_R – fator usado com o propósito de radioproteção que leva em conta as diferenças na efetividade entre radiações diferentes.