



ROSANA ARAMAKI TANAKA
Cirurgiã-Dentista

**AVALIAÇÃO DO EFEITO RADIOPROTETOR DA
CARNOSINA (β - ALANIL 1- HISTIDINA) NA
REPARAÇÃO TECIDUAL EM RATOS**

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



PIRACICABA
-2002-



ROSANA ARAMAKI TANAKA
Cirurgiã-Dentista

AVALIAÇÃO DO EFEITO RADIOPROTETOR DA
CARNOSINA (β - ALANIL 1- HISTIDINA) NA
REPARAÇÃO TECIDUAL EM RATOS

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

Orientador: Prof. Frab Norberto Bóscolo

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Luiz Carlos Pardini

Prof. Dr. Mário Roberto Vizioli

Prof. Dr. Frab Norberto Bóscolo

PIRACICABA
-2002-

Dedico este trabalho

Aos meus pais **Girou e Terezinha**, por não medirem esforços para proporcionar a mim e aos meus irmãos a oportunidade de estudar e alcançar uma profissão e pela capacidade constante em ensinar e transmitir, amor, respeito, honestidade, dedicação e simplicidade. São essas demonstrações que me fazem acreditar que a família é o alicerce para uma vida feliz!

Ao **Fábio**, meu marido, que sempre incentivou para que eu fizesse o mestrado e depois teve que se conformar, com saudade, com a minha ausência semanal. Foi muito difícil, principalmente no início, mas a meta de realizar este trabalho fez com que amadurecêssemos, tornando nossa união ainda mais forte!

Ao meu irmão **Edson**, pois sinto sua presença silenciosa acompanhando a minha caminhada e sei que está orgulhoso pela minha conquista!

E aos meus irmãos **Sandra e Oscar**, pelo apoio, amizade, carinho e incentivo para a realização deste trabalho.

Agradecimentos Especiais

A **Deus**, pela presença constante, sempre protegendo e iluminando meus caminhos.

Ao Prof. Dr. **Frab Norberto Bóscolo** por ter acreditado em mim, mesmo sem me conhecer, demonstrou que a justiça e a verdade sempre aparecem. Muito obrigado pela forma com que sempre me orientou e transmitiu seus conhecimentos.

Ao Prof. Dr. **Mário Roberto Vizioli**, pois além de auxiliar e enriquecer este trabalho, mostrou-me como a arte de ensinar torna-se simples e prazerosa quando se tem como aliados a humildade e a paciência. Muito obrigado pelo convívio, pois relatos de sua experiência e sabedoria são incentivos para cada vez mais buscar o conhecimento!

Ao meu sogro **Jorge** e a minha sogra **Alice** pelo incentivo e torcida constantes nas minhas conquistas!

Aos professores da Radiologia Odontológica da FOP-UNICAMP: Prof. Dr. **Agenor Montebello Filho**, Prof. Dr. **Francisco Haiter Neto** e Prof^{fa}. Dra. **Solange Maria de Almeida**, pelos valiosos conhecimentos transmitidos no decorrer do curso.

A minha amiga **Patrícia Maria Usberti Vizioli**, muito obrigado pelo companheirismo, amizade e cumplicidade. “As nossas experiências, não ficaram restritas apenas aos Laboratórios de Fisiologia, Histologia e Biotério, resultaram em uma verdadeira amizade”.

A minha amiga **Deborah Queiroz de Freitas** muito obrigado pela paciência, dedicação e pelas conversas sempre incentivando a realização deste trabalho!

As minhas amigas do curso de pós-graduação: **Janaína, Karina e Maria Luíza**, muito obrigado pelo carinho, atenção e momentos tão descontraídos que passamos juntas!

Aos colegas do curso de pós-graduação: **Ana Isabel, Andréa, André, Flávio, Laura, Mauro, Márcia, Nilson, Raphael e Sérgio**. Muito obrigado por participarem desta etapa tão importante da minha vida!

Aos funcionários da Radiologia Odontológica: **Antônio, Bruna, Giselda, Gislaine, Raquel e Waldeck** pelo convívio harmonioso e atenção em sempre atender as minhas solicitações.

Às funcionárias do Laboratório de Histologia: **Eliene Romani, Maria Aparecida Varella e Ivani Odas Demétrio** pelo carinho e atenção no auxílio da preparação das peças para esta pesquisa.

Às bibliotecárias **Marilene Girello e Heloísa Maria Ceccoti** pela atenção em corrigir e paciência em orientar como formatar este trabalho.

Ao bioterista **Wanderlei Francisco Vieira** e ao **Carlos Alberto Aparecido Feliciano** pela dedicação e paciência em ensinar como cuidar dos animais e pelo incentivo constante para a realização deste trabalho.

Às disciplinas de **Fisiologia, Histologia e Patologia da FOP-UNICAMP**, por gentilmente cederem seus laboratórios permitindo a realização deste trabalho.

À Dona **Marlene Rasera** por proporcionar um ambiente tão familiar, amenizando a saudade de minha casa. Muito obrigado pelo carinho e dedicação!

As minhas amigas da pensão: **Isa, Sabrina, Belkys** e em especial à **Daniela** pelo companheirismo e amizade cultivados durante minha estadia em Piracicaba.

Aos amigos da Fisiologia: **Dany, Franco** e novamente à **Daniela** por ensinarem com muita paciência como manusear os animais, contribuindo gentilmente para o meu aprendizado, e ao **Flávio Manzi**, pelo auxílio na realização deste trabalho.

À **Universidade Paranaense-UNIPAR**, e em especial à Diretora Profª **Marina Gimenes** e Coordenadores do Curso de Odontologia, Prof. Dr. **Márcio Grama Hoeppe** e Prof. Dr. **Laerte Luiz Bremm**, pelo apoio e incentivo para a concretização deste trabalho.

À Profª Dra. **Gláucia Maria Bovi Ambrosano** pelo auxílio na elaboração da estatística desta pesquisa.

À Instituição **CAPES** pela concessão da bolsa de estudo.

A **todos** que de alguma maneira contribuíram para realização deste trabalho.

Meus sinceros agradecimentos!

SUMÁRIO

Lista de Figuras.....	1
Lista de Tabelas.....	4
Lista de Gráficos.....	5
Resumo.....	6
Abstract.....	7
1- Introdução.....	8
2- Revisão da Literatura.....	11
2.1. Reparação tecidual e radiação ionizante.....	11
2.2. Carnosina.....	31
3- Proposição.....	41
4- Material e Métodos.....	42
4.1. Material.....	42
4.2. Métodos.....	45
5- Resultados.....	52
5.1. Descrição morfológica: Coloração Hematoxilina e Eosina.....	52
5.2. Avaliação quantitativa dos fibroblastos.....	62
5.3. Descrição morfológica: Método de Mallory.....	63
5.4. Avaliação qualitativa da birrefringência de fibras colágenas.....	65
5.5. Avaliação quantitativa da birrefringência das fibras colágenas.....	69
5.6. Avaliação do Dicroísmo Linear	71
6- Discussão.....	74
7- Conclusões.....	80
Referências Bibliográficas.....	81
Anexo.....	88

LISTA DE FIGURAS

Coloração por Hematoxilina e Eosina

Figura 1: Grupo Controle – Aumento original de 6.3x1.25x10.....	53
Figura 2: Grupo Controle – Aumento original de 16x1.25x10.....	53
Figura 3: Grupo Irradiado - Aumento original de 6.3x1.25x10.....	54
Figura 4: Grupo Irradiado - Aumento original de 16x1.25x10.....	54
Figura 5: Grupo Carnosina Irradiado - Aumento original de 6.3x1.25x10.....	54
Figura 6: Grupo Carnosina Irradiado - Aumento original de 16x1.25x10.....	54
Figura 7: Grupo Carnosina - Aumento original de 6.3x1.25x10.....	54
Figura 8: Grupo Carnosina - Aumento original de 16x1.25x10.....	54
Figura 9: Grupo Controle – Aumento original de 6.3x1.25x10.....	56
Figura 10: Grupo Controle - Aumento original de 16x1.25x10.....	56
Figura 11: Grupo Controle - Aumento original de 16x1.25x10.....	57
Figura 12: Grupo Irradiado - Aumento original de 6.3x1.25x10.....	57
Figura 13: Grupo Irradiado - Aumento original de 16x1.25x10.....	57
Figura 14: Grupo Carnosina Irradiado – Aumento original de 6.3x1.25x10.....	57
Figura 15: Grupo Carnosina Irradiado – Aumento original de 16x1.25x10.....	57
Figura 16: Grupo Carnosina Irradiado – Aumento original de 16x1.25x10.....	58
Figura 17: Grupo Carnosina - Aumento original de 6.3x1.25x10.....	58
Figura 18: Grupo Carnosina - Aumento original de 16x1.25x10.....	58
Figura 19: Grupo Controle - Aumento original de 6.3x1.25x10.....	60
Figura 20: Grupo Irradiado - Aumento original de 6.3x1.25x10.....	60
Figura 21: Grupo Carnosina Irradiado – Aumento original de 6.3x1.25x10.....	60
Figura 22: Grupo Carnosina - Aumento original de 6.3x1.25x10.....	60
Figura 23: Grupo Controle - Aumento original de 6.3x1.25x10.....	61

Figura 24: Grupo Irradiado - Aumento original de 6.3x1.25x10.....	61
Figura 25: Grupo Carnosina Irradiado – Aumento original de 6.3x1.25x10.....	61
Figura 26: Grupo Carnosina - Aumento original de 6.3x1.25x10.....	61

Coloração pelo método de Mallory

Figura 27: Grupo Controle - Aumento original de 40x1.25x10.....	64
Figura 28: Grupo Irradiado - Aumento original de 40x1.25x10.....	64
Figura 29: Grupo Carnosina Irradiado – Aumento original de 40x1.25x10.....	65
Figura 30: Grupo Carnosina - Aumento original de 40x1.25x10.....	65

Coloração pelo Picrosírius

Figura 31: Grupo Controle - Aumento original de 6.3x1.25x10.....	66
Figura 32: Grupo Irradiado - Aumento original de 6.3x1.25x10.....	66
Figura 33: Grupo Carnosina Irradiado - Aumento original de 6.3x1.25x10.....	66
Figura 34: Grupo Carnosina - Aumento original de 6.3x1.25x10.....	66
Figura 35: Grupo Irradiado - Aumento original de 6.3x1.25x10.....	67
Figura 36: Grupo Controle - Aumento original de 6.3x1.25x10.....	67
Figura 37: Grupo Carnosina Irradiado - Aumento original de 6.3x1.25x10.....	67
Figura 38: Grupo Carnosina - Aumento original de 6.3x1.25x10.....	67
Figura 39: Grupo Irradiado 14º dia - Aumento original de 6.3x1.25x10.....	68
Figura 40: Grupo Irradiado 21º dia - Aumento 6.3x1.25x10.....	68
Figura 41: Grupo Controle 14º dia - Aumento 6.3x1.25x10.....	68
Figura 42: Grupo Controle 21º dia - Aumento 6.3x1.25x10.....	68
Figura 43: Grupo Carnosina Irradiado 14º dia - Aumento 6.3x1.25x10.....	68
Figura 44: Grupo Carnosina Irradiado 21º dia - Aumento 6.3x1.25x10.....	68
Figura 45: Grupo Carnosina 14º dia - Aumento 6.3x1.25x10.....	69
Figura 46: Grupo Carnosina 21º dia - Aumento 6.3x1.25x10.....	69

Reação do Azul de Toluidina pH 4

Figura 47: Grupo Controle 7º dia – Aumento original de 16x1.25x10.....	72
Figura 48: Grupo Controle 7º dia – Aumento original de 16x1.25x10.....	72
Figura 49: Grupo Irradiado 7º dia – Aumento original de 16x1.25x10.....	72
Figura 50: Grupo Irradiado 7º dia – Aumento original de 16x1.25x10.....	72
Figura 51: Grupo Carnosina Irradiado 7º dia – Aumento original de 16x1.25x10.....	72
Figura 52: Grupo Carnosina Irradiado 7º dia – Aumento original de 16x1.25x10.....	72
Figura 53: Grupo Carnosina 7º dia – Aumento original de 16x1.25x10.....	73
Figura 54: Grupo Carnosina 7º dia – Aumento original de 16x1.25x10.....	73
Figura 55: Grupo Irradiado 14º dia – Aumento original de 16x1.25x10.....	73
Figura 56: Grupo Irradiado 14º dia – Aumento original de 16x1.25x10.....	73

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Médias e desvios padrão da morfometria dos fibroblastos no 4º dia de reparação tecidual.....	62
Tabela 2- Médias e desvios padrão da morfometria dos fibroblastos no 7º dia de reparação tecidual.....	63
Tabela 3- Médias e desvios padrão da birrefringência das fibras colágenas (μm^2) no 4º dia de reparação tecidual.....	69
Tabela 4- Médias e desvios padrão da birrefringência das fibras colágenas (μm^2) no 7º dia de reparação tecidual.....	70

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1- Médias e desvios padrão da morfometria dos fibroblastos no 4º dia de reparação tecidual.....	62
Gráfico 2- Médias e desvios padrão da morfometria dos fibroblastos no 7º dia de reparação tecidual.....	63
Gráfico 3- Médias e desvios padrão da birrefringência das fibras colágenas (μm^2) no 4º dia de reparação tecidual.....	70
Gráfico 4- Médias e desvios padrão da birrefringência das fibras colágenas (μm^2) no 7º dia de reparação tecidual.....	71

RESUMO

A finalidade deste estudo foi avaliar o efeito radioprotetor da carnosina (β -alanil 1-histidina) na reparação tecidual em ratos. Para tanto foram utilizados 48 ratos machos, que foram submetidos ao procedimento cirúrgico para confecção de uma ferida retangular (2,0 x 1,0cm) na região dorsal anterior. Os animais foram divididos aleatoriamente em 4 grupos experimentais: grupo controle - animais submetidos somente ao procedimento cirúrgico; grupo irradiado - animais que receberam dose única de 6Gy de irradiação gama, de corpo total, 72 horas após a cirurgia; grupo carnosina irradiado - animais que além do procedimento cirúrgico e da irradiação, receberam duas doses de carnosina, sendo a primeira administrada 48 horas após a cirurgia e a segunda, 1 hora e 30 minutos antes da irradiação e grupo carnosina - animais que receberam todos os procedimentos do grupo anterior, com exceção da irradiação. O processo de reparação tecidual foi avaliado aos 4, 7, 14 e 21 dias após a realização da ferida, por métodos morfológicos, histoquímico e histofísicos. De acordo com as condições experimentais empregadas, pôde-se observar que os animais do grupo carnosina irradiado apresentaram uma evolução do processo de reparo semelhante ao grupo controle, o que permitiu concluir que a carnosina é efetiva como substância radioprotetora.

ABSTRACT

The purpose of this study was to evaluate the radioprotector effect of carnosine (β -alanil 1-histidine) in the tissue repair in rats. Therefore, 48 male rats were submitted to a surgical procedure so as to make a rectangular (2,0 x 1,0cm) wound in the anterior-dorsal region of their bodies. The animals were divided in 4 experimental groups at random: control group: animals that were subjected only to the surgical procedure; irradiated group: animals that were exposed to one dose (6Gy) of gamma irradiation, in whole body, 72 hours after the surgery; irradiated carnosine group: animals which that received, besides the surgical procedure and the irradiation, two doses of carnosine aqueous solution, being the first one injected 48 hours after the surgery, and the second one 1 hour and 30 minutes before the irradiation and carnosine group: animals that were subjected to all the procedures from the previous groups, except for the irradiation. The process of tissue repairing was evaluated on 4, 7, 14, and 21 days after the wound had been produced by morphological, histochemical and histophysical methods. According to the experimental conditions used, it could be observed that the animals from the irradiated carnosine group presented a pattern of wound repairing which was similar to the control group and it was possible to conclude that the carnosine is an effective radioprotector substance.

1 INTRODUÇÃO

A descoberta dos raios X pelo físico alemão Wilhelm Conrad Röntgen, em novembro de 1895, possibilitou avaliar, por meio das imagens radiográficas, as estruturas internas dos organismos vivos, fornecendo detalhes da constituição e estrutura anatômicas as quais, até então, somente eram visualizadas pela dissecação em cadáveres. As radiações ionizantes são freqüentemente utilizadas com finalidade terapêutica e de diagnóstico médico-odontológico. A possibilidade do uso da radiação X provocar efeitos deletérios nos organismos vivos foi observada logo após a sua descoberta, quando Emil H. Grubbé, fabricante de tubos a vácuo apresentou, em 1896, uma dermatite localizada em sua mão, a qual foi considerada como sendo causada pela excessiva exposição aos raios X.

As radiações são chamadas de ionizantes porque têm a propriedade de remover elétrons das órbitas dos átomos; esses elétrons podem incorporar-se a outros átomos, tornando-os instáveis. O mecanismo de ação das radiações ionizantes pode ser direto e indireto. Direto, quando a energia liberada pela radiação atinge diretamente as macromoléculas (ácidos nucleicos e proteínas) das células e de maneira indireta, quando a energia atinge a molécula da água, ocasionando a radiólise, formando radicais livres altamente reativos que, além de reagirem entre si, podem em presença de oxigênio, provocar interações com enzimas, proteínas, lipídios, carboidratos e ácidos nucleicos. Isso resulta em

alterações bioquímicas e metabólicas, dando origem aos efeitos biológicos que podem ser somáticos e/ou genéticos.

A interação da radiação com a matéria, o seu poder de penetração e a sua velocidade fazem com que as radiações ionizantes sejam classificadas em corpusculares e eletromagnéticas. As radiações corpusculares ou de partículas são originárias de desintegrações nucleares ou então produzidas artificialmente e se caracterizam por possuírem massa e carga elétrica. As radiações eletromagnéticas são desprovidas de massa, sendo a emissão e transmissão de sua energia em forma de ondas através do espaço e da matéria. Um tipo de radiação eletromagnética muito utilizado em radioterapia é a radiação gama, altamente energética, com alto poder de penetração, podendo ser gerado pelo isótopo radioativo de cobalto, sendo utilizado o termo cobaltoterapia.

A Radiobiologia, que estuda os fenômenos decorrentes da interação das radiações com os sistemas biológicos, tem sido muito pesquisada, na tentativa de se explicar o mecanismo de interação da radiação com a matéria viva, para minimizar os indesejáveis efeitos biológicos. Os radioprotetores têm a propriedade de proteger o tecido vivo ou, pelo menos, diminuir os danos a ele causados pela radiação. O mecanismo de ação destas substâncias ainda não está claro, porém alguns autores, sugerem que a ação é decorrente da ligação química entre o radioprotetor e os radicais livres produzidos pela radiação, possibilitando certa proteção aos tecidos vivos ou pelo menos diminuindo os danos causados pela radiação.

A carnosina é um dipeptídeo que foi descoberto em 1900 por Gulewitch & Amiradzib de um extrato da carne e sua estrutura química foi determinada como β -alanil 1-histidina por Vigneaud. Pesquisas têm revelado que a carnosina estimula o processo de reparação dos tecidos vivos e tem capacidade de proteger a peroxidase e lisozimas de serem inativadas pelos radicais livres. Além disso, diversos autores afirmam que a carnosina previne a peroxidação do sistema de membranas, atuando como antioxidante solúvel em água, protegendo a membrana celular do efeito da oxidação.

Tendo em vista as propriedades atribuídas à carnosina, achou-se oportuno avaliar o seu efeito radioprotetor no processo de reparação tecidual em ratos.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 REPARAÇÃO TECIDUAL E RADIAÇÃO IONIZANTE

A reparação tecidual é um processo através do qual o organismo vivo restaura o tecido lesado, promovendo a substituição das células mortas por células saudáveis. Dependendo da capacidade regenerativa dos diferentes grupos celulares que compõem o tecido, têm-se basicamente dois processos de reparação tecidual:

-Regeneração: processo em que as células lesadas são substituídas por células do parênquima, do mesmo tipo, algumas vezes não deixando qualquer resíduo da lesão inicial.

-Cicatrização: processo em que o tecido lesado é substituído por células especializadas do tecido conjuntivo fibroso, diminuindo a capacidade funcional do órgão ou tecido afetado, resultando em cicatriz.

O processo de reparo inicia-se precocemente com uma inflamação, em que ocorre logo após a produção da ferida, sendo caracterizada pela hemostase capilar, com presença de plaquetas e formação de fibrina. Há liberação de mediadores químicos que induzem a migração de leucócitos, principalmente neutrófilos polimorfonucleares. Os monócitos também estão presentes no local da injúria e mais tarde se diferenciarão em macrófagos. Após a remoção dos detritos necróticos e do exsudato, torna-se possível o crescimento do tecido de

granulação, iniciando a fase proliferativa. Esta fase é caracterizada inicialmente pela neoformação de vasos sanguíneos, através do processo chamado angiogênese ou neovascularização, pelo qual as células endoteliais secretam proteases que degradam a matriz celular, depois migram nos espaços perivasculares, proliferam e se alinham para formar novos vasos, seguido pela proliferação acentuada de fibroblastos, que têm a importante função de produzir fibras e sintetizar proteoglicanos que compõem a matriz extracelular. A proliferação dos fibroblastos e das células endoteliais forma o tecido de granulação, que possui um aspecto róseo e granular frouxo. A última fase corresponde à maturação, em que se tem a formação do tecido conjuntivo fibroso, conhecido como cicatriz. Portanto, a cicatriz é constituída de tecido conjuntivo, com presença de fibras, predominantemente fibras colágenas, e uma matriz extracelular de proteoglicanos, cuja principal molécula é um glicosaminoglicano (GAG).

A formação do tecido de granulação é fundamental para o processo de reparo. Vários fatores têm sido relatados como prejudiciais ao processo de reparação tecidual, como a radiação ionizante.

A fim de observar o efeito da radiação aplicada antes e após o procedimento operatório na cicatrização de feridas na pele de ratos, POHLE *et al.*, em 1931, realizaram um estudo que de forma secundária observou a influência do comprimento de onda na reação biológica. Foram realizadas feridas de 6cm no dorso de cada animal, sendo metade irradiada e a outra parte servindo como

controle. Os resultados mostraram que a irradiação pré-operatória, com feixes de raios X de 100 e 140Kv (quilovoltagem), com dose de 1000R (Röntgen) e utilizando um filtro de alumínio de 2,0mm, não interferiu no processo de cicatrização. No entanto, quando a irradiação foi pós-cirúrgica (24 e 48 horas), houve um retardo no processo de cicatrização, principalmente no grupo 24 horas.

RITCHIE, em 1933, relatou as alterações histomorfológicas provocadas pela irradiação pós-operatória na cicatrização das feridas do trabalho descrito anteriormente. A irradiação foi realizada em três tempos distintos; imediatamente após a incisão, 24 horas e 48 horas, sendo avaliados desde o 1º até o 9º dia. As principais características histológicas encontradas foram: retardo no crescimento dos fibroblastos, alteração no seu desenvolvimento, com produção de células atípicas e formação de rede de fibrina pobre em células, persistindo além do tempo normal.

O efeito da radiação gama do rádio foi pesquisado por NATHANSON, em 1934, em feridas pós-cirúrgicas, confeccionadas no dorso de cães. As feridas eram eqüidistantes da linha média, e apenas um lado foi irradiado, para o outro servir como controle. Foi observada aceleração da reparação nas feridas expostas a doses baixas (50 a 100 miligramas horas) imediatamente após a incisão. O retardo foi evidente em todos os grupos submetidos a altas doses (500 e 1000 miligramas horas) e no grupo em que a irradiação foi aplicada 24 horas após a confecção da ferida, todas as doses atrasaram a reparação provavelmente devido

ao efeito prejudicial no crescimento das fibras do tecido conjuntivo; no entanto, não houve interferência na formação da cicatriz.

Também POHLE *et al.*, em 1949, avaliaram o efeito de baixas doses de radiação X na reparação tecidual em ratos, sendo realizada uma incisão de 4cm no dorso de cada animal, tendo uma das metades da ferida protegida, servindo como controle. Os animais foram divididos em três grupos. No primeiro grupo, os animais receberam 150R, 350R e 700R imediatamente após a realização da ferida, e durante 14 dias foi observada a reparação macroscopicamente. No segundo grupo as doses foram as mesmas, porém a metade dos ratos de cada grupo foi irradiada imediatamente após a cirurgia e a outra metade após 24 horas, sendo sacrificados no 3º, 5º e 7º dia após incisão. O terceiro grupo recebeu 25R e 10R imediatamente ou após 24 horas da incisão, sendo sacrificados no 3º e 5º-dia após a cirurgia. Não houve diferença macroscópica no tempo de reparação entre a porção irradiada e a controle. Histologicamente, não foi observado estímulo de reparação, e quando se notou pequena diferença no processo de reparação favorecendo a porção irradiada, no caso de pequenas doses, foi devido à redução do exsudato, diminuindo a quantidade de fibrina a ser substituída pelo tecido de cicatrização.

STEIN *et al.*, em 1957, estudaram os efeitos da radiação na cicatrização de feridas de extrações dentais em ratos, considerando o desenvolvimento de osteorradionecrose em pacientes submetidos à radioterapia na região de cabeça e pescoço. A irradiação foi realizada pela colocação de uma

cápsula de radônio lateralmente à região do alvéolo livre, e os efeitos foram observados em intervalos variando de 1 a 20 dias após a cirurgia. Ao analisar os resultados, foi possível concluir que a cicatrização alveolar foi mais lenta e menos eficiente onde houve menor tempo transcorrido entre a extração dental e a colocação da cápsula de radônio.

A origem dos fibroblastos durante a formação do tecido de granulação foi pesquisada por GRILLO, em 1963, utilizando a timidina tritiada como forma de controlar as células em proliferação e os produtos destas divisões celulares. Foram utilizados um grupo de cobaias, que sofreu irradiação em tempos diferentes, e um grupo que não recebeu irradiação. A timidina tritiada incorpora-se ao DNA (Ácido Desoxirribonucléico) formado antes da divisão celular; os resultados da pesquisa demonstraram haver uma grande ligação entre a timidina tritiada com os fibroblastos do tecido de granulação, tanto no leito aberto da ferida como na sua área marginal. A principal conclusão do autor foi que os fibroblastos presentes no processo de reparo das feridas têm sua origem principalmente das células do tecido conjuntivo localmente, do que das células provenientes do sistema vascular.

ROSS *et al.*, em 1970, também com o objetivo em determinar a origem dos fibroblastos, estudaram a cicatrização de feridas em uma série de ratos parabióticos. O fêmur de um parabionte de cada par de animais foi protegido e recebeu 800R de uma bomba de cobalto 60. Três dias após a irradiação foram feitas incisões lineares no dorso de cada animal, sendo injetada a seguir timidina

tritiada, enquanto nos outros animais foram injetadas timidina não marcada. Os animais foram sacrificados após a cirurgia decorridos os períodos de 1, 2 e 6 dias, sendo a ferida preparada para a autorradiografia. Os autores puderam concluir que há evidências de que os fibroblastos não surgem de precursores hematogênicos e, portanto, devem surgir de células do tecido conjuntivo adjacente.

A organização macromolecular do tecido de granulação foi estudada por VIZIOLI, em 1971, através da indução por esponjas de PVC (policlorovinil) implantadas subcutaneamente em ratos. Posteriormente à implantação das esponjas, os animais foram sacrificados após 3, 5, 10, 13, 16, 21 e 28 dias. A maturação do tecido de granulação ocorre após a formação de colágeno, o qual necessita que haja deposição de glicosaminoglicanos (GAGs) no espaço extracelular, que são sintetizadas pelos fibroblastos. Quando as moléculas de GAGs associam-se ao colágeno, são orientadas em direção característica, tornando-se possível determinar o momento dessa associação através do dicroísmo, com a reação histoquímica do azul de toluidina pH (potencial hidrogeniônico) 4. Desta maneira, foi possível revelar que a associação macromolecular entre os GAGs e o colágeno iniciou-se por volta do 7º dia de desenvolvimento, ocorrendo assim a organização macromolecular do tecido de granulação.

REINHOLD & BUISMAN, em 1973, avaliaram o efeito da radiação X no endotélio capilar de ratas. Para tanto utilizaram dose única de 500rad (*radiation*

absorbed dose) e dose de 500rad aplicada duas vezes no mesmo animal com intervalo de 24 horas. Após a irradiação, foi induzida a proliferação capilar. Observaram que nos animais não irradiados, o tecido cutâneo mostrou-se repleto de capilares e nos animais irradiados houve redução na quantidade de vasos neoformados, sendo essa redução maior com a dose total de 1000rad.

A radioproteção química contra os efeitos de dose única de radiação ionizante, aplicada em corpo todo de rato foi avaliada por MAISIN *et al.* (1977). Utilizaram radiação X variando de 100 a 2000R e pesquisaram a ação dos seguintes compostos químicos que foram avaliados individualmente ou misturados; a glutatona, cisteína, sulfato de serotonina-creatina e 2-β aminoetilisotiourônio, sendo aplicados entre 5 a 25 minutos antes da irradiação, os animais foram acompanhados durante 30 dias para, então, calcularem a longevidade. A mistura dos radioprotetores aumentou o grau de proteção quando comparado a cada substância separadamente e, ambas, protegeram os animais contra a indução pela radiação na diminuição do tempo de vida.

DRÓZDZ *et al.*, em 1981, avaliaram o efeito da dose única de radiação gama na deposição de GAGs. Para tanto, utilizaram ratos (*Wistar*), com peso de aproximadamente 150 gramas, que foram divididos em dois grupos: um controle e um grupo experimental que recebeu uma dose única de 500R no corpo todo, totalizando 10 animais para cada grupo. A quantidade de GAGs foi avaliada na pele, fígado, pulmão, soro sanguíneo e urina dos ratos irradiados, e revelou que a

irradiação produz distúrbios severos no metabolismo; no entanto, o mecanismo ainda é desconhecido.

As alterações na reparação de feridas produzidas em pele irradiada foram abordadas por LUCE, em 1984, citando que as alterações mais significativas são devidas à diminuição do suprimento sangüíneo pela obliteração dos vasos, sendo que este fator sobrepõe a outras adversidades, como má nutrição e contaminação dos tecidos, sugerindo conduta terapêutica para as úlceras provocadas pela radiação, tais como correções de deficiências sistêmicas, adequada excisão da ferida necrótica, e fornecimento permanente de cobertura celular vascularizada.

Os efeitos das doses radioterápicas na reparação tecidual foram relatados por MOORE, em 1984, ressaltando que em feridas abertas ocorre a diminuição da espessura do tecido de granulação que se torna menos celularizado, com arquitetura anormal, atrasando a formação e maturação do colágeno. Como o efeito é dose-dependente, quanto maior a dose, maior a depleção dos fibroblastos e capilares e maior é o atraso. Doses únicas menores que 300rad não causam atraso e o período de maior severidade no atraso da cicatrização é de poucos dias após a cirurgia, período em que o conjuntivo está em intensa proliferação.

O processo biológico da reparação tecidual foi descrito por CARRICO *et al.*, também em 1984, discutindo alguns fatores que influenciam o reparo.

Concluíram que a reparação de feridas é um mecanismo de interação complexo, com várias etapas fisiológicas e bioquímicas e afirmaram que uma alteração em qualquer processo intrínseco inevitavelmente conduzirá a um processo prolongado de reparo ou a um reparo anormal, freqüentemente com efeitos devastadores. No que diz respeito a tecidos irradiados, as alterações bioquímicas e estruturais não estão bem definidas. A maioria dos pesquisadores acredita que o problema na cicatrização é devido à hipóxia tecidual secundária.

O efeito da radiação X no tecido muscular de coelhos foi pesquisado por KRISHNAN *et al.*(1987), em doses de 2, 4, 6, 8, 10, 12, 15, 20, 25 e 30Gy (Gray). Foi feita avaliação da permeabilidade vascular no momento da irradiação através da injeção de albumina marcada. Notou-se que o extravasamento de albumina aumentou imediatamente após a irradiação com qualquer dose, aumentando conforme aumentava a dose. Em doses equivalentes e maiores que 15Gy foram observadas alterações histológicas como hemorragia, edema intersticial, fibrose e espessamento da parede endotelial.

O efeito da dose única de 2000rad de radiação X na reparação tecidual em ratos, aplicada 6 dias após a confecção da ferida dorsal, foi avaliado por GUIDUGLI NETO, também em 1987. Foi realizada a análise morfométrica do tecido de granulação em tempos que variaram de 30 minutos a 30 dias após a irradiação, sendo observada uma diminuição da quantidade de vasos em todos os tempos analisados.

RUDOLPH *et al.*, em 1988, avaliaram o efeito da radiação na proliferação de fibroblastos, realizando culturas celulares com amostras obtidas da pele de quatro pacientes que sofreram tratamento radioterápico. Os tecidos foram obtidos de três áreas distintas: úlcera, tecido irradiado sem úlcera e área não irradiada, de outra região do corpo, para servir de controle. Os dados obtidos pelos autores sugeriram que um permanente efeito intrínseco da irradiação em fibroblastos resultava em diminuição na habilidade de replicação ou uma amputação seletiva do crescimento da subpopulação de fibroblastos, não sendo dependente somente do diminuído suprimento sangüíneo, mostrando ainda que os fibroblastos provenientes de pele irradiada, mas não ulcerada, apresentaram um crescimento significativamente lento em relação ao grupo controle.

BAKER & KROCHAK, em 1989, realizaram uma revisão sobre a resposta do sistema microvascular à irradiação. Encontraram que o sistema celular tem papel importante na patogênese do dano provocado pela radiação em tecidos sadios, pois com a irradiação há uma proliferação irregular de células endoteliais, dando origem a capilares com formato e diâmetro irregulares. Uma resposta imediata do tecido conjuntivo à irradiação é o aumento da permeabilidade, sendo demonstrado esta alteração na matriz subcutânea da pele após dose tão pequena quanto o equivalente a 10rad. O aumento da permeabilidade é transitório, causado pela despolimerização da substância mucopolissacarídea e liberação de enzimas vasoativas. Em relação ao tecido de granulação, os autores encontraram que fatores, como o baixo pH, hipóxia

tecidual antes da total vascularização e possíveis fatores neuroendócrinos têm a capacidade de reduzir a radiosensibilidade do tecido.

A influência da radiação X na cronologia do processo de reparo alveolar, foi pesquisado por RAVELI *et al.*, em 1990, utilizando as doses de 1.25 Sv (Sievert) e 1.75 Sv em 2 grupos de ratos, imediatamente após a exodontia dos incisivos superiores. Os animais foram sacrificados após 3, 7, 14 e 28 dias. Verificou-se atraso na proliferação epitelial da mucosa gengival dos animais submetidos à irradiação X, de forma semelhante, nos dois grupos irradiados e atraso na cronologia do processo de reparo, também nos dois grupos, sendo mais evidente nos animais que receberam 1.75 Sv.

MILLER & RUDOLPH, em 1990, teceram algumas considerações sobre as alterações macroscópicas ocorridas em locais que sofreram irradiação com finalidade terapêutica. Encontraram na literatura dúvidas se essas alterações seriam devidas aos problemas vasculares ou às alterações nos fibroblastos.

Um estudo histológico da gênese e evolução do tecido de granulação induzido pela implantação de esponja de PVC, sob efeitos de baixas doses de radiação X em ratos foi realizado por ABDALLA *et al.*, em 1991. Para tanto, os animais foram divididos nos seguintes grupos: Grupo I (controle)- 7 ratos, os quais foram submetidos à implantação da esponja, e sacrificados aos 4º, 7º, 14º, 21º e 28º dia após a cirurgia; Grupo II- 7 ratos nas mesmas condições do grupo controle, porém foram submetidos à 5,28R, em dose única no momento do

implante; Grupo III- 9 ratos nas mesmas condições do grupo controle, submetidos à dose de 5,28R a cada 2 dias após o implante, durante 14 dias, e a cada 4 dias, até completar 28 dias (58,08R no total). Após a análise dos resultados, concluíram que houve inibição parcial na evolução do tecido de granulação, tanto em se tratando de dose única como em doses alternadas, demonstrando que a radiação X interfere no processo de reparo.

BERNSTEIN *et al.*, em 1993, realizaram uma revisão de literatura sobre a ação da radiação ionizante na pele, com parâmetro à resistência da ferida ao rompimento. Os autores relataram que houve diminuição da síntese de colágeno nas feridas irradiadas, ressaltando que a radiação é prejudicial devido ao efeito tóxico nos fibroblastos, que são responsáveis pela deposição e maturação do colágeno na ferida.

Também em 1993, MUSTOE & PORRAS-REYES relataram as alterações do processo de cicatrização normal pela radiação, sendo que na fase inicial a terapia com radiação ionizante causa danos celulares e teciduais acompanhado de injúrias em vênulas, diminuindo gradativamente sua capacidade proliferativa. A radiação tem múltiplos efeitos negativos na reparação tecidual, incluindo diminuição da vascularização, hipóxia e diminuição da capacidade proliferativa dos tecidos locais, tornando-os menos capazes de responder ao estímulo inflamatório.

O efeito da radiação de elétrons no processo de reparação de feridas em pele de ratos foi pesquisado por WANG *et al.*, em 1994, utilizando um feixe de elétrons de 4MeV (milhão de elétrons volts), com profundidade de 3 mm, com uma dose única de 9,6Gy. Sete dias após a irradiação, foi realizada uma incisão de 20mm de comprimento, na área irradiada. O sacrifício dos animais foi após 1º, 3º, 7º e 14º dia da produção das incisões. As amostras foram analisadas por microscopia eletrônica de varredura e por microscopia de luz. Os autores observaram que até o 7º dia houve atraso na formação do tecido de granulação, que se restabeleceu por volta do 14º-dia.

WATANABE *et al.*, em 1994, avaliaram os efeitos de baixas doses de radiação X sobre a gênese e a evolução do tecido de granulação em feridas de 1cm² na região dorsal de ratos. Para tanto os animais foram divididos em 3 grupos, sendo grupo controle não irradiado, grupo dose única com irradiação de 7R, logo após a abertura da ferida e grupo dose dividida, totalizando 7R em três frações, sendo a primeira dose, após a abertura da ferida; a segunda e a terceira, respectivamente, 24 horas e 48 horas após a primeira irradiação. Foram estudados os tempos de 2, 4, 7, 11, 14, 21 e 28 dias a partir do início da abertura da ferida, permitindo concluir que sob as condições utilizadas no experimento, não foi possível avaliar a influência da radiação X na orientação macromolecular dos tecidos irradiados e não houve diferença significativa entre os grupos tratados.

Um modelo para o estudo de feridas irradiadas, em cobaias, com finalidade de determinar os efeitos da irradiação cutânea na contração das feridas

foi descrito por BERNSTEIN *et al.*, em 1994. Os animais foram protegidos por uma caixa de chumbo, que apresentava uma fenda, através da qual a radiação X de 18Gy atingia a pele, sendo aplicada 48 horas antes da realização das feridas circulares com 6cm de diâmetro. A avaliação foi feita levando-se em consideração a mensuração do tamanho da ferida, no 5º, 7º, 10º e 14º dia 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 a avaliação de substâncias tópicas e de fatores de crescimento, em feridas prejudicadas pela radiação.

GOLDSCHMIDT *et al.*, em 1994, fizeram uma revisão das bases físicas e biológicas da modalidade terapêutica da radiação ionizante em dermatologia no tratamento das neoplasias cutâneas e outras doenças de pele, salientando as principais fontes de injúria tecidual, a susceptibilidade das células nos processos patológicos, a curva de sobrevivência celular e a comparação entre a radiação de elétrons e radiação X.

O processo de reparação tecidual em pacientes tratados com radioterapia e quimioterapia também foi abordado por DRAKE & OISHI, em 1995, com preocupação maior na região de cabeça e pescoço, por serem mais freqüentes as complicações nesta região. Com relação às doses, encontraram que as doses de 300cGy (centésimo de Gray) ou menos, ministrada em dose única não afeta significativamente a reparação, mas a dose de 1000cGy, ou maior, causa retardo significativo na reparação. Para irradiação pós-cirúrgica encontraram

que o 5º e 7º dia são mais críticos, e a partir do 7º dia os efeitos mostraram-se menos severos. A análise microscópica revelou que a injúria causada pela radiação ocorre devido à oclusão de pequenos vasos sanguíneos e alterações funcionais dos fibroblastos, com produção de colágeno deficiente, que pode ser decorrente de uma produção insuficiente ou de um tempo de maturação mais longo.

Também em 1995, CARROLL *et al.*, avaliaram a eficácia de alguns agentes radioprotetores na prevenção de injúrias provocadas pela radiação gama em intestino de ratos. Para tanto, utilizaram 40Gy de irradiação no abdômen duas semanas antes dos animais serem submetidos à uma ressecção no intestino. Após uma semana da cirurgia as anastomoses foram avaliadas e a força necessária para rompê-las também foram determinadas. Os autores concluíram que as anastomoses do grupo controle tiveram maior resistência ao rompimento em relação aos grupos testados (ribose-cisteína, WR-2721, glutamina, vitamina E, MgCl₂/adenosina trifosfato, e a combinação de ribose-cisteína e glutamina). Quando comparadas às substâncias radioprotetoras, os melhores resultados foram com a ribose-cisteína, o WR-2721, a ribose-cisteína combinada com a glutamina e a vitamina E.

TIBBS, em 1997, fez uma revisão da literatura sobre a cicatrização de feridas após a radioterapia, pois injúria nos componentes locais do mecanismo de cicatrização de feridas persiste e resulta em diminuição da capacidade proliferativa. Diversas são as explicações sugeridas nas alterações dos

fibroblastos, podendo essas células serem afetadas pela radiação na sua habilidade de multiplicar-se, na sua deficiência em produzir colágeno ou na sua redução de resposta aos estímulos dos fatores de crescimento.

ALMEIDA, em 1997, avaliou o efeito de 1,0Gy de radiação de elétrons no processo de reparação tecidual em ratos e comparou os possíveis efeitos produzidos pela radiação, quando esta foi realizada imediatamente e três dias após a abertura da ferida, com processo de reparação tecidual normal. Para tanto, foi produzida uma ferida retangular, na região dorsal anterior dos animais. Somente 1,0cm correspondente a cada borda da ferida foram irradiadas, sendo o restante da ferida e o corpo do animal protegidos. A irradiação foi realizada, para um grupo de animais, imediatamente após a abertura da ferida e, para outro grupo, 3 dias após esse procedimento. O processo de reparação tecidual foi estudado nos tempos de 2, 4, 7, 11, 14, 17 e 21 dias após o procedimento cirúrgico para o primeiro grupo, enquanto para o segundo a avaliação foi aos 5, 7, 10, 14, 17, 20 e 24 dias após a abertura da ferida. Foi observado que 1,0Gy de radiação de elétrons com um feixe de 6MeV, causou retardo no processo de reparação tecidual, quando aplicado imediatamente e 3 dias após a abertura da ferida, sendo que quando comparados os dois grupos irradiados, para o 7º, 14º e 17º dia, o efeito na reparação tecidual foi mais acentuado no grupo que sofreu irradiação 3 dias após a abertura da ferida.

A fim de avaliar o desenvolvimento efetivo da radioproteção, MAISIN (1998) fez considerações sobre os radioprotetores químicos. O autor considera os

radioprotetores sulfidrílicos melhores, tendo apenas duas desvantagens: a toxicidade e o curto período de duração da sua atividade. Acredita-se que a combinação de drogas radioprotetoras, agindo por mecanismos diferentes, faz aumentar o grau de proteção e permite toxicidade aceitável; no entanto, como drogas são testadas em animais, com diferentes mecanismos de ação e com toxicidade mantida em níveis aceitáveis, a sua aplicação em humanos parece obscura.

Estudos histológico e morfométrico do processo de reparação com a utilização de radiação β do estrôncio-90 foram realizados por PEREIRA FILHO, em 1998, em feridas cutâneas de ratos. Vinte e quatro horas após a cirurgia uma placa de 1,5cm de diâmetro de estrôncio-90 foi utilizada para irradiação por 13,8 segundos, totalizando uma dose de 250cGy por sessão. Este procedimento foi realizado em dias alternados e analisado nos períodos de 3, 7, 14, e 21 dias após a cirurgia, com dose máxima de 2500cGy. Ao se analisar os resultados, foi possível concluir que a radiação β do estrôncio-90 provocou o aumento de leucócitos, reduziu o número de fibroblastos e não alterou o número de fibras colágenas.

MONTEIRO, em 1999, também analisou o efeito da radiação de elétrons no processo de reparação tecidual em ratos. A dose utilizada foi de 1,0Gy, com energia de 6MeV. Foram realizadas feridas excisionais medindo 2 x 1cm. O grupo ferida irradiada imediatamente após a cirurgia foi analisado nos tempos: 2, 4, 7, 11, 14, 17 e 21 dias. O grupo tecido de granulação, irradiado 3

dias após a remoção do tecido, foi analisado nos tempos 5, 7, 10, 14, 17, 20 e 24 dias. Ambos foram comparados aos respectivos controles. Houve atraso na reparação dos tecidos irradiados imediatamente após a cirurgia e no 3º dia da gênese tecidual, sobretudo naqueles irradiados no 3º dia de formação. Ao final do período experimental, a autora observou que todos os tecidos apresentavam características bastante semelhantes, indicando atraso transitório.

BÓSCOLO *et al.*, 2000, avaliaram o efeito de baixas doses de radiação X no processo de reparação tecidual em feridas suturadas em ratos. Para tanto, produziram uma ferida dorsal medindo 20 x 5mm, e dividiram os animais nos grupos controle sem sutura, irradiado sem sutura, controle com sutura e irradiado com sutura. Cada animal sofreu irradiação local totalizando 7,4rad. Os resultados mostraram que radiação, apesar de causar atraso, não impediu a reparação tecidual, sendo que o grupo que sofreu a irradiação e não foi suturado mostrou maior retardo, quando comparado aos outros grupos.

O efeito antioxidante da melatonina na proteção contra o dano celular causado pela radiação ionizante foi avaliado por KARBOWNIK & REITER, em 2000, pois a melatonina é um antioxidante que protege DNA, lípidos e proteínas do dano pelo radical livre. Estimou-se que cerca de 60 a 70% do dano celular de DNA produzido pela radiação ionizante seja causado pelo OH[•] (radical hidroxila), formado pela radiólise da água. A melatonina é um antioxidante altamente efetivo contra OH[•], e é distribuído no organismo em todos os compartimentos celulares e passa através de todas as membranas biológicas. A descoberta da melatonina

como antioxidante foi demonstrada tanto *in vivo* como *in vitro*, no qual a melatonina remove diretamente o $\text{OH}^\bullet$, que é altamente tóxico, formando 3-hidroxi-melatonina cíclica, que é um metabólito estável da melatonina. O efeito radioprotetor da melatonina contra o dano causado pelo estresse oxidativo e sua baixa toxicidade permite que ela seja um suplemento potencial no tratamento em situações onde se pretende minimizar os efeitos da radiação ionizante.

WEISS & LANDAUER, em 2000, fizeram considerações sobre o papel dos antioxidantes na redução dos efeitos deletérios provocados pela radiação ionizante. Nesta revisão, enfatizaram a eficiência radioprotetora e a toxicidade dos fosforotiatos, outros tióis e exemplos de radioprotetores antioxidantes de outra categoria, em ratos. Os autores sugerem que antioxidantes endógenos, como a superóxido desmutase podem ser úteis em protocolo específico para radioterapia.

MANZI, em 2001, avaliou o efeito radioprotetor da vitamina E na reparação tecidual em ratos. Para tanto, foram utilizados 160 ratos machos, que sofreram procedimento cirúrgico, constando de uma ferida na região dorsal anterior. Os animais foram divididos em 8 grupos: grupo C (controle) - realização da ferida, grupo VE60 - pré-tratamento com vitamina E (60 UI) e realização da ferida, grupo VE90 - pré-tratamento com vitamina E (90 UI) por via intraperitoneal e realização da ferida, grupo IRR - ferida e irradiação de suas bordas 3 dias após a cirurgia, grupo VE60IRR - pré tratamento com vitamina E (60 UI) e realização da ferida e irradiação de suas bordas 3 dias após a cirurgia, VE90IRR - pré tratamento com vitamina E (90 UI) e realização da ferida e irradiação de suas

bordas 3 dias após a cirurgia, grupo OOL- pré tratamento com óleo de oliva e realização da ferida e grupo OOLIRR- pré tratamento com óleo de oliva, realização da ferida e irradiação das bordas 3 dias após a cirurgia. Os dias de obtenção das peças para a análise foram 4º, 7º, 14º e 21º dia após a produção das feridas. A análise dos resultados obtidos mostrou que 6Gy de radiação de elétrons com um feixe de 6MeV, causaram um retardo no processo de reparação tecidual e a vitamina E foi efetiva como radioprotetora nas duas doses estudadas, apresentando resultados semelhantes aos animais do grupo controle.

Também em 2001, TUJI avaliou o efeito do selenito de sódio no processo de reparação tecidual através de estudo experimental em ratos. Os animais foram divididos em: Controle, onde foram feitos somente as feridas; Selênio, no qual foram administrados 2,0mg de selenito de sódio; Irrradiado, no qual foi realizada a irradiação e Selênio irradiado, no qual administrou-se o selênio 24 horas antes da exposição à radiação. As feridas foram irradiadas somente nas bordas com uma dose de 6Gy de radiação de elétrons, sendo o restante do corpo do animal e a ferida protegidos. Os animais foram sacrificados decorridos 4, 7, 13 e 21 dias da produção das feridas. O selenito de sódio mostrou ser um radioprotetor eficaz, visto que o grupo irradiado no qual ele foi administrado comportou-se histologicamente semelhante ao grupo controle.

HILL *et al.*, em 2001, revisaram a literatura sobre a radiobiologia do tecido normal, enfatizando os efeitos da radiação que induzem a produção de TGF- β 1 (fator de crescimento β 1) , responsável pela regulação dos eventos

celulares e bioquímicos e aumenta a diferenciação de fibroblastos progenitores em fibrócitos pós-mitóticos, aumentando, conseqüentemente, a produção de matriz extracelular, especialmente a do colágeno. Os autores sugerem que a síntese de TGF- β 1 e a diferenciação de fibroblastos progenitores são processos diretamente ligados, ocorrendo durante o início e a progressão da fibrose induzida pela radiação.

2.2 CARNOSINA

A carnosina é quimicamente definida como β -alanil 1- histidina, e está presente em concentrações milimolares nos mamíferos. A carnosina encontra-se distribuída em diferentes concentrações na musculatura esquelética e no cérebro, sendo a quantidade média presente no organismo vivo variável entre 150 a 200mg/Kg. Sua síntese e decomposição ocorrem no fígado e musculatura esquelética; no entanto, pode ser adquirida externamente pelo consumo de carne animal (NAGAI & SUGIYAMA, 1974; SUZUKI & NAGAI, 1974).

Os efeitos da carnosina na estimulação do processo de reparação de tecidos vivos foram apontados por vários autores, como MUKKADA *et al.* (1969); FUJI & COOK (1973); NAGAI & SUGIYAMA (1974); SUZUKI & NAGAI (1974), NAGAI (1975) e NAGAI (1978), citado por VIZIOLI *et al.* (1983).

VIZIOLI & ALMEIDA, em 1978, estudaram os efeitos da carnosina no tecido de granulação induzido por esponja em ratos, através de estudo morfológico e histofotométrico dos GAGs. A carnosina promoveu a estimulação da

taxa de crescimento desse tecido, que alcançou sua maturação final antes que o tecido de granulação dos animais não tratados. A biossíntese de GAGs do tecido de granulação tratado com carnosina alcançou a sua máxima atividade em um curto período de tempo, quando comparado ao grupo controle.

A relação da carnosina e histidina na cicatrização de feridas em ratos foi avaliada por FITZPATRICK & FISCHER (1982), através de dieta com aminoácidos. Neste trabalho, foram feitos dois experimentos avaliando a resistência do tecido de cicatrização ao rompimento e às concentrações de carnosina, anserina e histidina livre no tecido muscular do gastrocnêmio. Os ratos, pesando entre 30 a 40 gramas, foram divididos em dois grupos, que receberam dietas com 50% e 100% da histidina necessária para o crescimento. No dorso de cada animal foi realizada uma ferida com 3cm, fechada com 3 pontos contínuos. Após a cirurgia, os animais continuaram com suas dietas por mais sete dias, sendo então sacrificados para que parte da pele envolvendo a ferida fosse submetida ao teste de resistência. O músculo gastrocnêmio também foi removido para a dosagem das concentrações de carnosina, anserina e histidina livre. Um segundo experimento, semelhante ao descrito, foi realizado, com duas particularidades: colocou-se uma esponja no tecido subcutâneo para determinar a formação de colágeno e os animais, após a realização da ferida, foram subdivididos aleatoriamente em 3 grupos. Um grupo recebeu, durante sete dias após a cirurgia, a injeção intraperitoneal de solução salina (1ml); o outro recebeu injeção intraperitoneal de solução salina com 1mg/histidina/100 gramas de peso

corpóreo; e finalmente um terceiro, a injeção de carnosina (1mg/100gramas de peso corpóreo). Os resultados mostraram que os ratos com deficiência de histidina tinham menos concentrações de anserina, carnosina e histidina livre, quando comparados ao grupo 100%, e a força aplicada para romper o tecido foi de 67% a menos. Com relação à injeção intraperitoneal de histidina e carnosina, foram aumentadas as concentrações de histidina livre, deposição de colágeno e aplicação de força. Através desse estudo concluiu-se que a histidina é um aminoácido essencial para o crescimento e necessário na cicatrização de feridas, e que a carnosina pode ser hidrolizada nos seus aminoácidos constituintes pela enzima carnosinase, que está presente em quantidade significantes no soro, fígado e rins. A carnosina parece ser um reservatório de histidina para a síntese de histamina. Portanto, os casos de trauma, estresse e feridas nos quais aumenta a síntese de histamina, requerem uma maior quantidade de histidina.

VIZIOLI *et al.*, em 1983, avaliaram o efeito da carnosina no desenvolvimento de tecido de granulação induzido por esponjas através de observações histoautorradiográficas na biossíntese de colágeno. Os resultados indicaram que no tecido de granulação tratado com carnosina, os fibroblastos eram mais ativos nos 5 primeiros dias, acelerando a atividade da síntese, atingindo o máximo aos 10 primeiros dias de desenvolvimento, enquanto que no grupo controle esse pico só foi alcançado entre 15-20 dias. A quantidade de grãos de prata no citoplasma dos fibroblastos do tecido tratado com carnosina durante os 15 primeiros dias de desenvolvimento foi maior do que o controle, indicando

biossíntese aumentada. Portanto, a carnosina aumentou o ritmo de biossíntese de colágeno no tecido de granulação, bem como antecipou o período requerido pelo tecido para atingir sua maturação.

A ação da carnosina e β -alanina na cicatrização de feridas em ratos tratados com hidrocortisona foi pesquisada por NAGAI *et al.* (1986). A carnosina exógena foi degradada pela carnosinase tecidual em histidina e β -alanina. A histidina serve como um substrato para a produção de histamina pela hidrocortisona, estimulando rapidamente o primeiro processo de cicatrização e a β -alanina promove a síntese de colágeno acelerando a reparação tecidual. O exame de resistência tecidual também foi realizado. Observou-se que, em ratos tratados com a carnosina, a força aplicada foi significativamente mais alta do que em animais não tratados. Para a análise dos efeitos da β -alanina e da carnosina no tecido de granulação, utilizou-se o método de papel filtro-formalina (FFP). Foram utilizados ratos machos com seis semanas, pesando 170 gramas, com uma incisão média de 1,5 cm feita no dorso do animal, bilateralmente nas regiões escapulares, onde foram implantadas subcutaneamente duas peças de papel filtro, saturadas com 7% de formalina. A carnosina mostrou evoluir significativamente o tecido de granulação, pela estimulação de ácido nucléico e síntese de colágeno.

A afinidade da carnosina com o radical hidroxila foi demonstrada por ARUOMA *et al.* (1989), já com os radicais superóxido, peróxido de hidrogênio e ácido hipocloroso, as reações não foram biologicamente significantes. Os autores

sugerem que a habilidade da carnosina em inibir a peroxidação lipídica pode estar relacionada com outra função, como por exemplo, um efeito tampão.

Os dipeptídeos carnosina e anserina têm habilidade em interagir com os produtos da peroxidação de lipídeos, prevenindo o dano nas membranas celulares, segundo BOLDYREV & SEVERIN (1990). A significância biológica dos dipeptídeos que contém histidina podem ser relacionados com os efeitos tampão, antioxidante, estabilizador de membranas e atividade radioprotetora. A peroxidação de lipídeos expostos ao oxigênio é uma reação em cadeia com efeitos devastadores, pois é uma fonte de radicais livres podendo causar danos aos tecidos. Os antioxidantes são utilizados pela natureza para controlar e reduzir a lipoperoxidação seja reduzindo a velocidade de iniciação da cadeia ou quebrando-a e interferindo na sua propagação.

A atividade antioxidante da carnosina tem sido pesquisada por vários autores. SILAEVA *et al.*, em 1990, em experimentos *in vivo* e *in vitro*, estudaram as propriedades antioxidantes da carnosina, e revelaram a sua capacidade de reduzir os produtos intermediários da oxidação de radicais livres nos tecidos da ferida e no soro sanguíneo em formação.

PAVLOV *et al.*, em 1993, pela técnica radiólise de pulso, avaliou com registro espectrofotométrico de absorvância a atividade anti-radical e a estabilidade de radiação da carnosina em solução aquosa. Os resultados permitiram evidenciar que a carnosina em presença de oxigênio comporta-se

como um antioxidante multifuncional. Mesmo em baixas concentrações, o dipeptídeo forma um complexo de carga de transferência com o radical superóxido, alterando a reatividade. Os autores sugerem que a carnosina, devido à hidrofiliabilidade, em contraste com antioxidante solúvel lipídico natural, previne o desenvolvimento do primeiro processo de oxidação de todos os meios em água, considerando sua interação não específica com radicais livres intermediários. A carnosina possui habilidade de formar quelatos com íons metálicos de transição; portanto, pode prevenir o processo de geração de partículas ativas in vivo. A habilidade da carnosina de neutralizar os produtos oxidativos pré-existentes são sensíveis ao pH do meio.

Uma breve revisão do desempenho da atividade antioxidante da carnosina foi realizada por BOLDYREV (1993), que analisou o comportamento da mesma em diferentes modelos de reações de cadeia de radicais livres. A carnosina mostrou ser um antioxidante hidrofílico potente, de ação não enzimática direta e possuir uma alta capacidade de interação com radicais hidroxila. Entretanto, o efeito biológico da carnosina não pode ser explicado somente pelas suas propriedades antioxidantes.

A ação da carnosina no atraso do envelhecimento das culturas de células dos fibroblastos diplóides humanos foi avaliada por McFARLAND & HOLLIDAY, em 1994, e concluíram que ela é um antioxidante, mas é provável que preserve a integridade celular através de interações no metabolismo protéico,

pois, *in vitro*, esta substância previne o início do envelhecimento morfológico celular e pode rejuvenescer células que já iniciaram o envelhecimento.

KANSCI *et al.*, em 1997, pesquisaram a atividade antioxidante da carnosina e suas conseqüências nos compostos voláteis produzidos durante a oxidação lipídica induzida. Concluíram que a carnosina possui uma atividade antioxidante multifuncional, interferindo na fase inicial da oxidação, diminuindo a quantidade de peróxidos pré-formados, reagindo com produtos secundários e também produzindo efeito tamponante.

O efeito protetor da carnosina foi avaliado por HIPKISS *et al.* (1997), em culturas de células endoteliais de cérebro de ratos, sendo a toxicidade celular induzida pelo malondialdeído, que é um produto final deletério da peroxidação lipídica. Os resultados mostraram que a carnosina pode proteger as células endoteliais e inibindo o malondialdeído da ação de induzir a modificação da proteína, de formarem átomos e grupos carbonílicos.

HIPKISS *et al.*, em 1998, fizeram a relação da carnosina como um protetor, um peptídeo antienvelhecimento, devido às comprovadas funções antioxidantes e removedoras de radicais livres e sua capacidade de promover a divisão celular de culturas de fibroblastos humanos, convertendo as células maduras em fenótipos jovens. O envelhecimento está associado aos radicais livres oxigênicos que induzem dano macromolecular; e ao acúmulo de proteína desnaturalizada. A respeito da sua função biológica, os autores comentam que

pouco é conhecido sobre a carnosina e o seu metabolismo, mas que ela pode regular a glicólise, contração muscular e fosforilação oxidativa, além de estimular o sistema imunológico, ligando-se ao cobre, zinco, cálcio e purinas, sugerindo o envolvimento potencial na regulação do gene ou sinais de transdução. Além destas considerações, o autor cita as possíveis aplicações terapêuticas da carnosina, sendo elas: complicações secundárias da diabete, como a catarata, arteriosclerose, falência renal, autoimunidade, neuropatias periféricas, doença de Alzheimer, câncer, doenças inflamatórias e cirrose hepática.

O desempenho antioxidante da carnosina, foi investigado por TAMBA & TORREGGIANNI (1998), através da sua interação com radicais produzidos por radiação. Foi utilizado um acelerador linear de elétrons (LINAC), com 12MeV em solução aquosa de carnosina em diferentes pHs. Através deste estudo, os autores concluíram que a carnosina é um bom removedor de radicais hidroxilas, produzindo um composto intermediário estável completo, o qual deve ser menos reativo para outros componentes biológicos do que a hidroxila.

Os efeitos benéficos da carnosina na cultura de fibroblastos humanos foram pesquisados por HOLLIDAY & McFARLAND, em 2000. Esses autores que relataram que em concentrações fisiológicas no meio padrão, ela prolonga o tempo de vida e reduz as características do envelhecimento, e que ao transferir uma célula do meio normal para um meio contendo carnosina, as células rejuvenescem, e voltam a envelhecer quando são retiradas deste meio.

GARIBALLA & SINCLAIR, em 2000, pesquisaram a síntese e o metabolismo da carnosina, bem como suas propriedades fisiológicas, como ação antioxidante, capacidade tampão e protetora de membranas, relacionando com algumas possíveis aplicações terapêuticas, tais como antienvelhecimento, modulador das complicações diabéticas, auxiliar na reparação tecidual, doença de Alzheimer e arteriosclerose.

O efeito protetor da carnosina contra isquemia global em ratos, foi pesquisada por STVOLINSKY & DOBROTA em 2000. Foram utilizados ratos machos, adultos *Wistar*, pesando 200 a 250g, e a isquemia global foi provocada por meio da oclusão das carótidas durante 45 minutos. No grupo tratado, a carnosina foi administrada intraperitonealmente, em dose única de 150 mg/kg de peso corpóreo, dissolvida em solução fisiológica, 30 minutos antes da oclusão das carótidas. A isquemia provocou 67% de mortalidade no grupo controle, enquanto que no grupo tratado com carnosina foi de somente 30%. Os autores concluíram que a carnosina protege o cérebro contra isquemia global, sendo este efeito, em nível celular, produzido tanto pela ação enzimática quanto pela proteção das membranas contra radicais livres oxigênicos. Em estudos anteriores foi comprovado que a carnosina penetra no sangue e fica acumulada entre os tecidos cerebrais por 30 a 120 minutos após a injeção.

BOGARDUS & BOISSONNEAULT, em 2000, propuseram a avaliação da carnosina como inibidor de oxidação de lipoproteína de baixa densidade (LDL), pois o acúmulo de lipídeos entre os macrófagos resulta na geração de espuma

celular e aparência de pontos gordurosos, que são precursores de placas arterioescleróticas. O estímulo utilizado para a oxidação foi o cobre e aminopropano hidrocloreto. Os níveis de carnosina utilizados neste estudo, são semelhantes aos presentes nos espaços intravasculares, sendo as concentrações musculares nos humanos de 2 a 20mM. Nestes dois sistemas, a carnosina mostrou-se efetiva na prevenção da oxidação da LDL, e em cada método houve a produção de diferentes espécies de radicais livres, sugerindo mecanismos múltiplos por meio do qual a carnosina pode inibir a oxidação lipídica.

HIPKISS *et al.*, em 2001, afirmaram que as atividades antioxidante e a remoção de radicais livres e de íons metálicos da carnosina não são suficientes para explicar o papel fisiológico do dipeptídeo em combater o envelhecimento e rejuvenescer culturas de fibroblastos humanos, e sugerem que a carnosina pode reagir com as proteínas de grupos carbonílicos, que são produzidas no envelhecimento, sendo este tipo de reação não enzimática. Este processo recebe o nome de carnosilação.

3 PROPOSIÇÃO

O presente trabalho propõe-se a avaliar o efeito radioprotetor da carnosina no processo de reparação tecidual em ratos, verificando-se o desenvolvimento do tecido de granulação por métodos morfológicos, histoquímico e histofísicos.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAL

Para a realização desta pesquisa foram utilizados 48 ratos machos de mesma linhagem (*rattus norvegicus, albinus, Wistar*), com idade entre 60 e 90 dias e peso variando entre 250 a 300 gramas, todos procedentes do Biotério Central da UNICAMP. Os animais foram mantidos em gaiolas apropriadas, em local com temperatura e umidade controladas. A alimentação constou de ração balanceada e água *ad libitum*. O período de adaptação dos animais ao Biotério da Faculdade de Odontologia de Piracicaba foi de um mês, para então serem iniciados os procedimentos experimentais.

Os procedimentos experimentais consistiram de seis fases distintas: Anestésica, Cirúrgica, Terapêutica, Irradiação, Obtenção das peças e Preparação de Lâminas para a Microscopia Óptica. Para a realização dessas fases foram necessários os seguintes materiais:

4.1.1 Fase Anestésica:

Solução pré-anestésica injetável de Rompun (Bayer);

Solução anestésica injetável de Dopalen (Agribbrands do Brasil Ltda.);

Seringas hipodérmicas para insulina com agulhas intradérmicas;

4.1.2 Fase Cirúrgica:

Mesa cirúrgica, contendo: tesoura de ponta fina, pinça reta, pinça dente de rato, cabo de bisturi, lâminas de bisturi nº 15, algodão hidrófilo e gaze esterilizados;

Gabarito de plástico para a demarcação da área a ser excisionada.

4.1.3 Fase Terapêutica:

L-Carnosine da Sigma-Aldrich (beta-Ala-His);

Solução injetável de cloreto de sódio a 0,9%;

Seringas descartáveis de 5 ml com agulhas intradérmicas;

4.1.4 Fase de Irradiação:

Aparelho de Cobaltoterapia Alcyon II;

4.1.5 Fase de Obtenção das peças:

Éter etílico PA;

Campânula;

Mesa cirúrgica: tesoura de ponta fina, pinça reta, pinça dente de rato, cabo de bisturi, lâminas de bisturi nº 15 e gaze estéril;

Solução de cloreto de sódio a 0,9%;

Recipientes de vidro para o armazenamento das peças (snap cap);

Fixador de Karnovsky modificado;

4.1.6 Fase de Preparação das Lâminas para a Microscopia Óptica:

Tampão PBS;

Álcool 70%;

Álcool 90%;

Álcool absoluto;

Solução de xilol;

Paraplast Plus;

Estufa;

Micrótomo;

Lâminas e lamínulas;

Hematoxilina e Eosina;

Picrosírius;

Azul de toluidina pH 4 e

Solução de Mallory.

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Grupos experimentais:

A amostra de 48 animais foi dividida, aleatoriamente, em 04 grupos experimentais, sendo classificados como: grupo controle (GC), grupo irradiado (GI), grupo carnosina irradiado (GCal) e grupo carnosina (GCa). Para cada período avaliado foram utilizados 03 animais de cada grupo.

GC: submetido somente ao procedimento cirúrgico, não sendo administrada nenhuma substância e também não sofrendo irradiação, servindo como parâmetro de um processo de reparação tecidual normal.

GI: submetido ao procedimento cirúrgico, e irradiado de corpo todo 72 horas após a produção da ferida. Não foi administrada nenhuma substância.

GCal: submetido ao procedimento cirúrgico, sendo que os animais receberam duas doses de solução aquosa de carnosina (150 mg/Kg de peso corpóreo) administradas intraperitonealmente, sendo a primeira dose 48 horas após a cirurgia e a segunda, 1 hora e 30 minutos antes da irradiação de corpo todo.

GCa: submetido ao procedimento cirúrgico, com os animais recebendo as duas doses de injeções de solução aquosa de carnosina, sendo administradas da mesma maneira e nos mesmos tempos como no GCal. Os animais não foram irradiados.

4.2.2 Anestesia e Tricotomia:

Na fase cirúrgica, os animais receberam medicação pré-anestésica injetável de cloridrato de tiazina (10mg/Kg de peso corpóreo), intramuscular, e após verificados os sinais de sedação, foram então anestesiados com solução anestésica injetável de cloridrato de ketamina (100mg/Kg de peso corpóreo), também via intramuscular.

A tricotomia foi realizada no dorso de cada animal, manualmente, a fim de evitar irritação na pele dos animais, tendo-se o cuidado em abranger uma área maior do que a necessária para produção da ferida, para que o crescimento dos pêlos não invadissem a área a ser removida para análise microscópica.

4.2.3 Produção da Ferida

Foram realizadas quatro incisões, que proporcionaram a retirada de tecido dérmico de 2,0cm x 1,0cm, na região dorsal anterior de cada animal, a uma distância de aproximadamente 1,0cm à direita da espinha dorsal, sendo as incisões de maiores extensões paralelas a esta. A profundidade de cada incisão atingia aproximadamente 0,2cm, tendo como referência a observação do tecido muscular na base da ferida e a presença da derme nas bordas da mesma. As feridas foram feitas sempre na mesma região, para conservação da uniformidade das amostras.

4.2.4 Irradiação

Os animais foram irradiados de corpo todo, 72 horas após a cirurgia, com um aparelho de Cobaltoterapia (Alcyon II). A irradiação foi realizada a uma distância alvo-fonte de 80cm, com dose única de 6Gy e tempo de aplicação de 4 minutos e 30 segundos, com profundidade máxima de 0,5cm.

4.2.5 Obtenção da Peças

Após decorridos os tempos de 4, 7, 14, e 21 dias após a cirurgia, previamente estabelecidos para o estudo da reparação tecidual, as peças foram removidas e os animais foram sacrificados. Cada peça foi constituída de uma porção de tecido, contendo a ferida ou a cicatriz no centro, circundado por tecido normal. As incisões para a remoção das peças foram realizadas sempre com a mesma profundidade daquelas para a produção das feridas. Após a remoção, as peças foram devidamente lavadas com solução fisiológica, secas em papel absorvente e colocadas nos recipientes com fixador de Karnovsky modificado. As peças foram mantidas nesta solução por, no máximo, de 6 horas; então foram lavadas três vezes em tampão PBS, mantidas nesta solução por mais 24 horas. Após esse período foram desidratadas em solução crescente de álcool, desde o álcool 70% até o álcool absoluto, e colocadas na solução de xilol, sendo realizadas as trocas necessárias até a completa diafanização, para serem incluídas em Paraplasty plus.

4.2.6 Métodos Histológicos

Após a inclusão, as peças foram levadas ao micrótomo para a obtenção de cortes de 5µm (micrômetros) de espessura a fim de serem realizadas as seguintes colorações:

Coloração por Hematoxilina e Eosina: este método teve por finalidade avaliar-se morfológicamente o tecido neoformado.

Coloração pelo método de Mallory para fibroglia: utilizada para a evidenciação da fibroglia presente no tecido de granulação dos diferentes grupos, pelo método do ácido fosfotungstico de Mallory, segundo EDWARDS (1967).

Coloração pelo Picrosírius: o objetivo desta técnica é observar a orientação das moléculas de colágeno, através da birrefringência, sob microscopia de luz polarizada.

A birrefringência (= dois índices de refração) é uma propriedade das substâncias que possuem anisotropia, ou seja, substâncias cujas moléculas possuem uma ordenação cristalina, orientada, dentro da sua estruturação. As fibras de colágeno, entre as substâncias biológicas, constituem um bom exemplo de material cuja estruturação é orientada.

Há substâncias naturalmente birrefringentes (diz-se substâncias com birrefringência “intrínseca”) e substâncias que se tornam birrefringentes pela adição de um corante específico (diz-se birrefringência “de forma”). Em biologia, é

muito comum a adição de um corante específico a uma substância birrefringente intrínseca para aumentar o brilho da sua birrefringência e assim facilitar o seu estudo. Neste trabalho, a coloração pelo Picrosírius do tecido de granulação (colágeno) foi realizada, a fim de obter-se uma melhor birrefringência do material. O exame da birrefringência tem que ser realizado através da microscopia de luz polarizada, com dois filtros polarizadores cruzados, ou seja, com os seus planos de polarização de luz formando ângulos retos. Nestas condições, o colágeno contido nos tecidos de granulação exibem brilho tanto mais intenso e colorido quanto maior for sua quantidade e orientação macromolecular.

4.2.7 Método Histoquímico

Reação do Azul de Toluidina pH 4: este método permite a avaliação do processo de organização do tecido de reparo, utilizando-se as observações através do dicroísmo linear em microscopia de polarização (BENNETT, 1967). O fenômeno de dicroísmo é fundamental para se detectar a presença ou ausência da orientação macromolecular do tecido em evolução. As moléculas do corante ligam-se as glicoproteínas adesivas (glicosaminoglicanos) produzidas pelos fibroblastos, que são ligadas orientadamente às moléculas do colágeno, para a formação do feixe de fibras. O tecido corado, ao ser analisado sob luz polarizada mostra coloração azul ortocromática quando as fibras estão paralelas ao plano de polarização da luz (PPL) por rotação da platina do microscópio em 90°, o tecido que se apresenta organizado mostra uma coloração rósea metacromática das

fibras colágenas. Este fenômeno do dicroísmo somente é evidenciado quando existe acentuado grau de orientação macromolecular. Caso contrário, os tecidos em qualquer PPL, permanecem com a cor azul ortocromática.

As observações em microscopia óptica e em microscopia de polarização foram realizadas através do fotomicroscópio “Zeiss- Pol 01”.

4.2.8 Métodos Histofísicos

Análise quantitativa da birrefringência das fibras colágenas

O microscópio Zeiss Axiolab foi acoplado a uma microcâmera (Sony CCD IRIS/RGB Color- Japão), responsável pela digitalização das imagens. As lâminas coradas com Picrosirius foram analisadas com lente objetiva em aumento de 10X. As medidas foram realizadas em cinco campos para cada lâmina, escolhidos aleatoriamente na região do tecido de granulação. Com o auxílio de um programa analisador de imagens histológicas (KS 400 2.0- Kontron Electronics, Munique, Alemanha) obteve-se a área medida em micrômetros², correspondente à coloração detectada pelo programa analisador da birrefringência das fibras colágenas. A observação foi realizada nos grupos de 4º e 7º dia e a partir da obtenção das medidas, foram obtidas as médias relativas a cada grupo, para então serem submetidas à análise estatística.

Análise morfométrica dos fibroblastos

O estudo morfométrico para a contagem dos fibroblastos foi realizada em microscópio óptico comum, ZEISS Germany, com aumento de 40/0.65, por meio de uma ocular contendo retículo, lente PK 8 x mn, fabricação ZEISS; West Germany. A contagem dos fibroblastos foi realizada nos grupos de 4º e 7º dia, sendo avaliados 10 campos em cada lâmina. A partir da obtenção das medidas, foram obtidas as médias relativas a cada grupo, para então serem submetidas à análise estatística.

5 RESULTADOS

5.1 DESCRIÇÃO MORFOLÓGICA: COLORAÇÃO POR HEMATOXILINA E EOSINA

4º dia de reparação tecidual

Grupo Controle: Observou-se a área da ferida bastante ampla, recoberta inteiramente por uma crosta necrótica, contendo restos celulares, fibrina e sangue coagulado, que tem a função de proteger o tecido subjacente, com infiltrado inflamatório composto principalmente por neutrófilos e linfócitos. Abaixo desta área, notava-se o tecido de granulação em desenvolvimento que se mostrou pouco evoluído, com vasos neoformados, fibroblastos e pequena quantidade de fibras colágenas neoformadas, caracterizando o estágio inicial da reparação tecidual (Fig. 1). O exame em aumento maior mostrou que as células redondas inflamatórias são na sua maioria linfócitos, e o tecido de granulação exibiu os fibroblastos como elemento celular preponderante (Fig. 2).

Grupo Irradiado: A área da ferida também se apresentava ampla, a crosta era mais espessa quando comparada ao GC, com maior quantidade de material necrótico acumulado. A região imediatamente inferior exibia um infiltrado inflamatório mais intenso que o grupo controle. O tecido de granulação apresentava-se pouco organizado, com poucos fibroblastos e com menor quantidade de vasos e fibras colágenas neoformados (Fig. 3). As observações em aumento maior mostraram que a zona inferior à crosta necrótica era constituída de neutrófilos, indicando inflamação aguda e poucos linfócitos. O número de

fibroblastos do tecido de granulação mostrou-se muito diminuído em comparação ao GC, e o tecido mostrou lacunas inexistentes no GC (Fig. 4).

Grupo Carnosina Irrradiado: O tecido analisado também se apresentava semelhante ao GC, com uma fina camada necrótica superficial e uma zona inflamada imediatamente inferior. O tecido de granulação exibiu-se em desenvolvimento incipiente, povoados com células em proliferação e neoformação vascular (Fig. 5). A microscopia de maior aumento comprovou que o infiltrado inflamatório não exibiu neutrófilos e sim linfócitos, não havendo, portanto, sinais de inflamação aguda. (Fig. 6).

Grupo Carnosina: Os aspectos deste grupo exibiram quadro semelhante ao GC, com presença de tecido necrótico recobrindo o tecido em formação, não aparentando alterações nem no aspecto geral do tecido nem no quadro celular (Fig. 7 e 8).

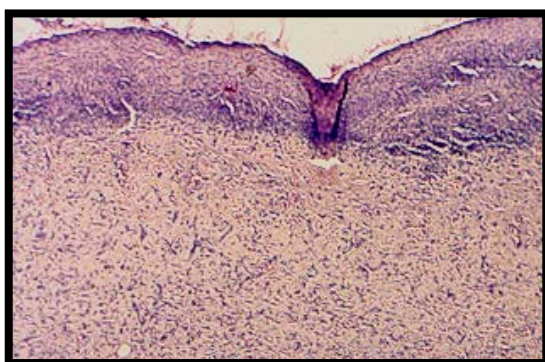


Fig.1: Grupo Controle
Aumento original de 6.3x1.25x10

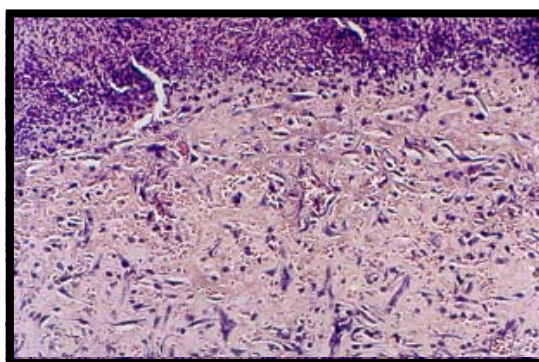


Fig.2: Grupo Controle
Aumento original de 16x1.25x10

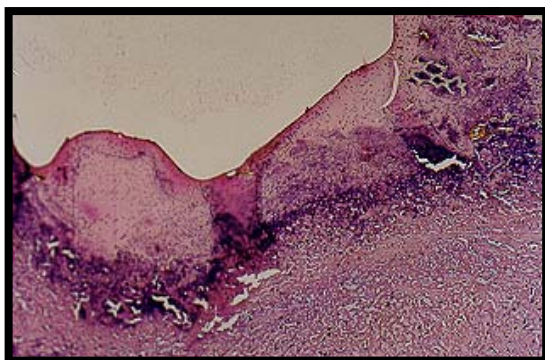


Fig.3: Grupo Irradiado
Aumento original de 6.3x1.25x10

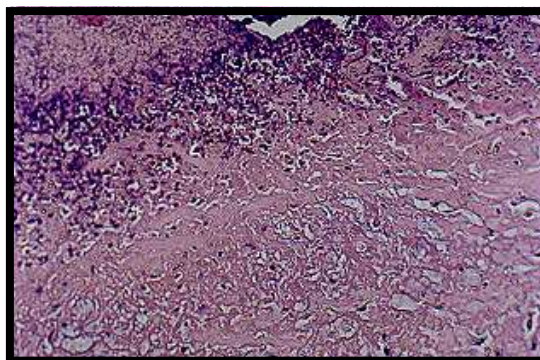


Fig.4: Grupo Irradiado
Aumento original de 16x1.25x10

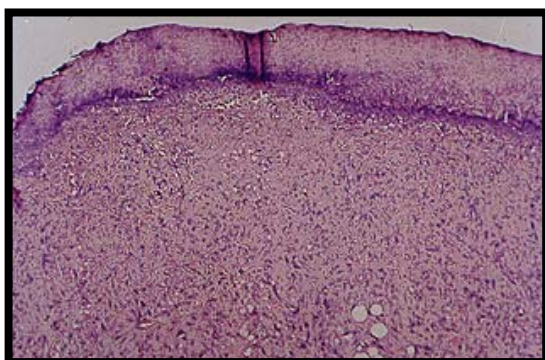


Fig.5: Grupo Carnosina Irradiado
Aumento original de 6.3x1.25x10

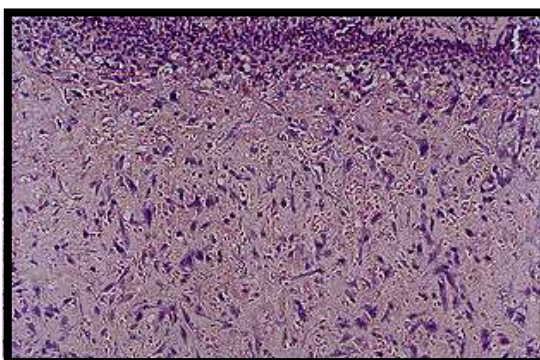


Fig.6: Grupo Carnosina Irradiado
Aumento original de 16x1.25x10

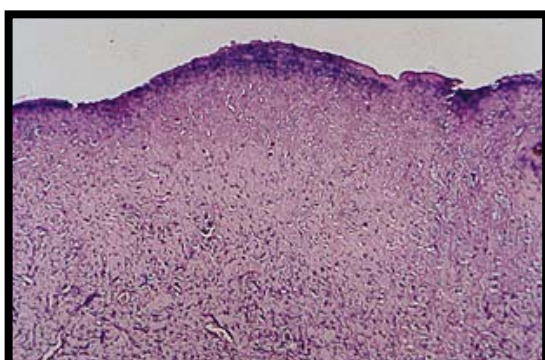


Fig.7: Grupo Carnosina
Aumento original de 6.3x1.25x10

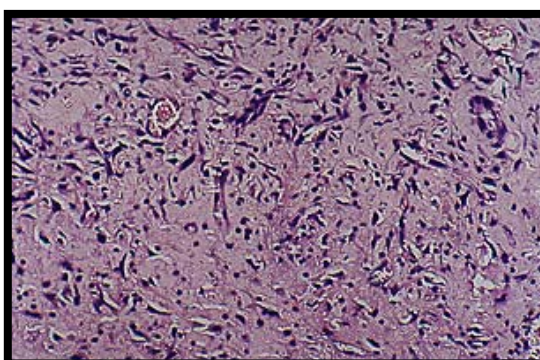


Fig.8: Grupo Carnosina
Aumento original de 16x1.25x10

7º dia de reparação tecidual

Grupo Controle: Observou-se a diminuição do tamanho da área da ferida, não mais apresentando crosta, que foi substituída por uma fina camada necrótica superficial, abaixo da qual há uma camada celular não inflamatória. O tecido de granulação apresentou-se em plena proliferação, muito celular e mostrando canais vasculares correspondentes à superfície, em número bastante grande (Fig.9). O exame em maior aumento mostrou que, a partir das bordas da ferida, o epitélio começou a proliferar e o número de fibroblastos aumentou (Fig. 10). A grande maioria dos capilares já eram funcionais (Fig. 11)

Grupo Irradiado: A área da ferida também se apresentava diminuída, porém a crosta necrótica ainda estava presente em toda sua extensão. Abaixo da crosta, permanecia um infiltrado de células inflamatórias ainda bastante evidente. O tecido de granulação exibia aspecto atrasado em relação ao GC, não tendo ainda organização de vasos capilares (Fig. 12). Em aumento maior, o exame do tecido comprovou que a camada celular abaixo da crosta constituía-se de neutrófilos e linfócitos em número equilibrado. O tecido de granulação revelava uma proliferação fibroblástica e vascular inferior à do GC. Não houve evidências de proliferação epitelial (Fig. 13).

Grupo Carnosina Irradiado: O tecido de granulação apresentava evidências de desenvolvimento maior que o GI, embora ligeiramente menor que o GC. Os capilares funcionais mostraram-se presentes com número e grau de

evolução semelhantes ao GC (Fig. 14). As observações em aumento maior mostraram que o epitélio já havia iniciado sua proliferação e não revelava mais evidência de camada de células inflamatórias (Fig. 15). Os fibroblastos apresentavam proliferação acentuada e os capilares funcionais já se organizaram perpendicularmente à superfície (Fig. 16).

Grupo Carnosina: O tecido analisado apresentou-se semelhante ao GC, tanto na evolução do tecido de granulação quanto na proliferação epitelial (Fig. 17 e 18).

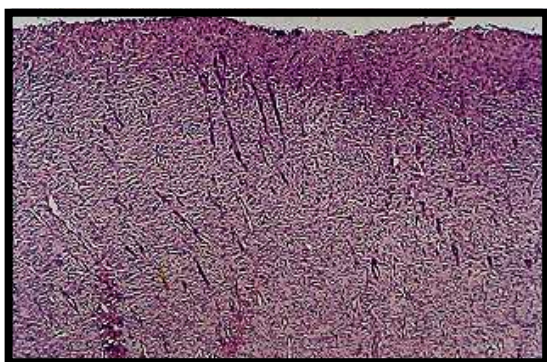


Fig.9: Grupo Controle
Aumento original de 6.3x1.25x10

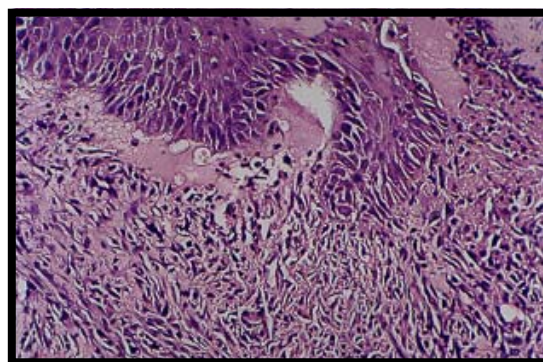


Fig.10: Grupo Controle
Aumento original de 16x1.25x10



Fig.11: Grupo Controle
Aumento original de 16x1.25x10

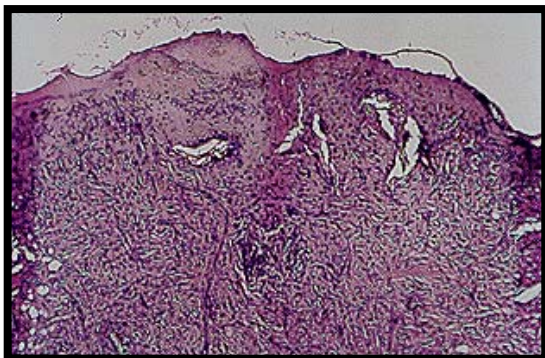


Fig.12: Grupo Irradiado
Aumento original de 6.3x1.25x10

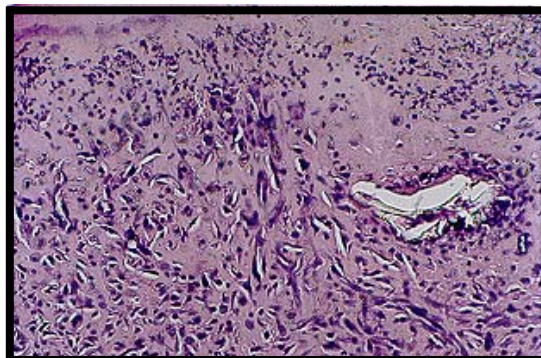


Fig.13: Grupo Irradiado
Aumento original de 16x1.25x10

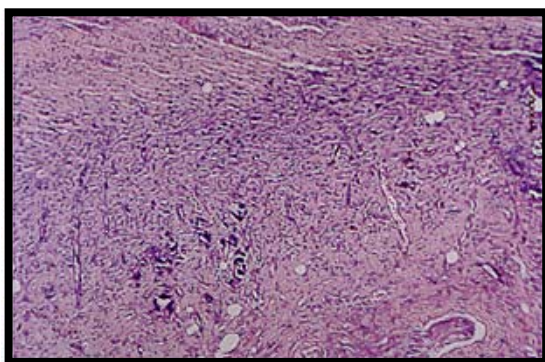


Fig.14: Grupo Carnosina Irradiado
Aumento original de 6.3x1.25x10

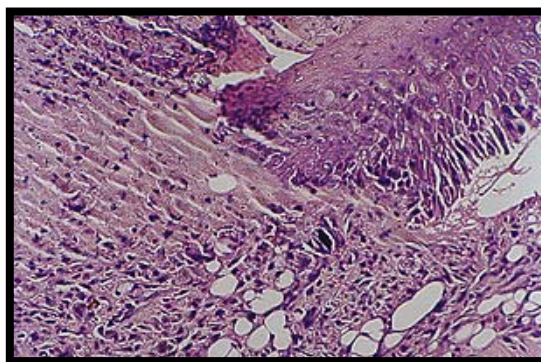


Fig.15: Grupo Carnosina Irradiado
Aumento original de 16x1.25x10

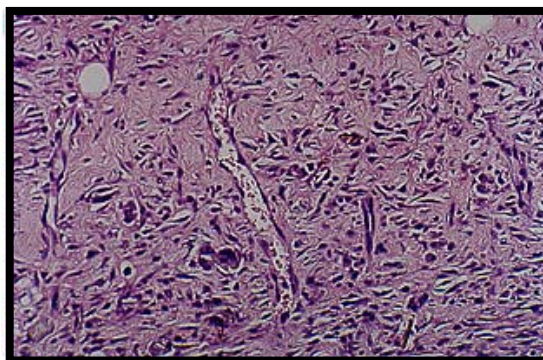


Fig.16: Grupo Carnosina Irrradiado
Aumento original de 16x1.25x10

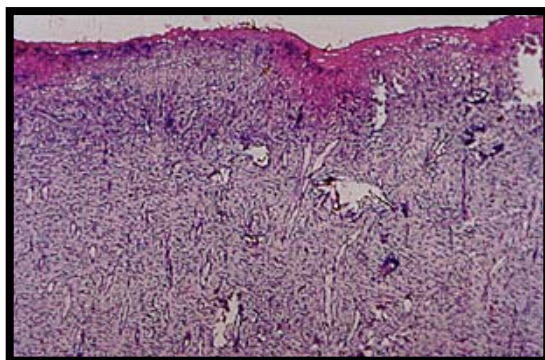


Fig.17: Grupo Carnosina
Aumento original de 6.3x1.25x10

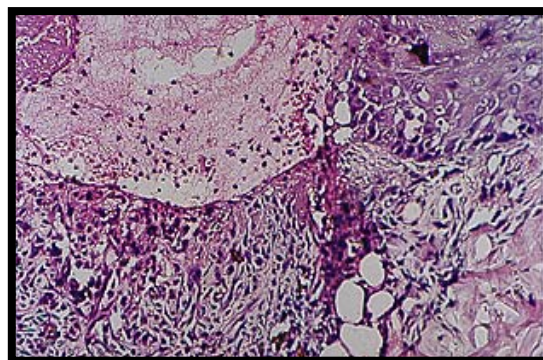


Fig.18: Grupo Carnosina
Aumento original de 16x1.25x10

14º dia de reparação tecidual

Grupo Controle: A região da ferida já se encontrava totalmente recoberta por epitélio, inclusive com a formação da camada de queratina, o que denuncia a maturação do tecido epitelial. O tecido de granulação mostrava poucas células fibroblásticas e capilares sangüíneos, tornando-se bastante fibroso. O processo de retração da ferida apresentou-se em franca atividade, tornando a área em reparação bem mais estreita. Estes aspectos podem ser observados na figura 19.

Grupo Irrradiado: O tecido de granulação apresentava-se evoluindo em direção à cicatrização, embora seu desenvolvimento estivesse muito atrasado em relação ao GC. Isto se evidenciou pela presença da crosta necrótica ainda

persistente e a falta de desenvolvimento e maturação completos do epitélio, que ainda não recobria totalmente a ferida. O tecido de granulação mostrou-se bastante celular e muito vascularizado e a retração da ferida ainda era incipiente (Fig. 20).

Grupo Carnosina Irrradiado: Observou-se que este grupo desenvolvia-se em ritmo um pouco inferior ao GC, mas bem acima do GI. As evidências morfológicas mostraram que, embora estivesse presente uma crosta necrótica em alguns locais, o epitélio já recobria completamente a área, e o tecido mostrou-se mais fibroso e menos celular, porém ainda bem vascularizado. A retração da ferida já era mais evidente (Fig. 21).

Grupo Carnosina: Este grupo mostrou aspectos bastante semelhantes ao GC, tanto na maturação dos tecidos epitelial e granulação, quanto ao ritmo de desenvolvimento (Fig. 22).

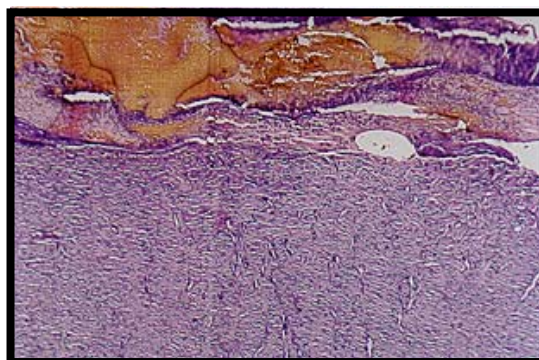
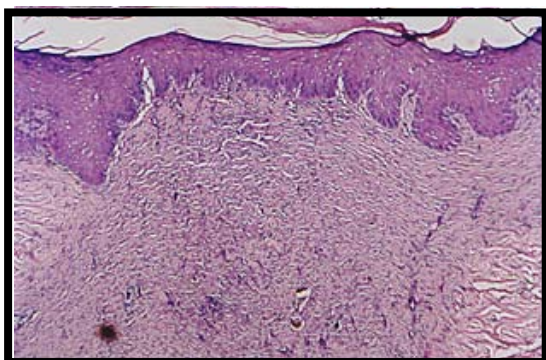


Fig.19: Grupo Controle
Aumento original de 6.3x1.25x10

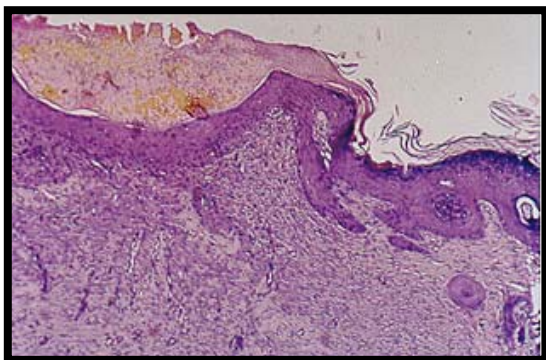


Fig.20: Grupo Irradiado
Aumento original de 6.3x1.25x10

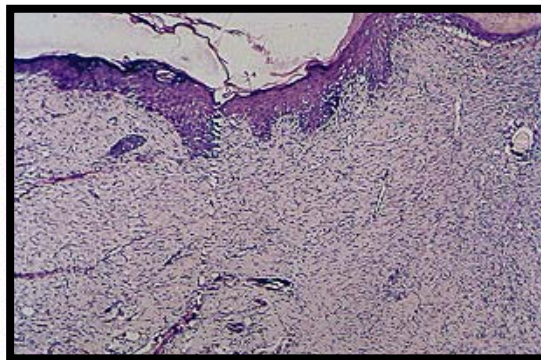


Fig.21: Grupo Carnosina Irradiado
Aumento original de 6.3x1.25x10

Fig.22: Grupo Carnosina
Aumento original de 6.3x1.25x10

21º dia de reparação tecidual

Grupo Controle: A ferida já se encontrava completamente cicatrizada, recoberta por epitélio funcional e bastante fibrosada, quase atingindo a aparência de tecido normal, inclusive com a presença de anexos da pele (Fig.23).

Grupo Irrradiado: Ainda bastante atrasado em relação a todos os grupos, com menor retração e menor fibrosamento (Fig.24).

Grupo Carnosina Irrradiado: O tecido analisado apresentava-se semelhante ao GC (Fig.25).

Grupo Carnosina: O tecido analisado também apresentava-se semelhante ao GC (Fig.26).

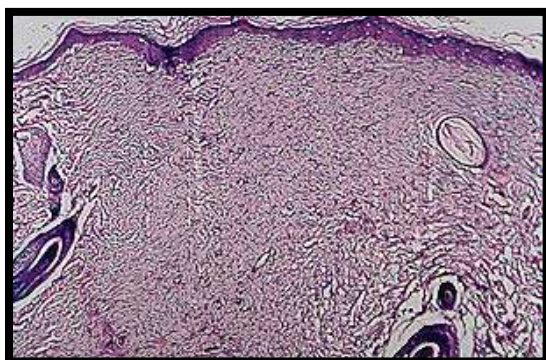


Fig.23: Grupo Controle
Aumento original de 6.3x1.25x10

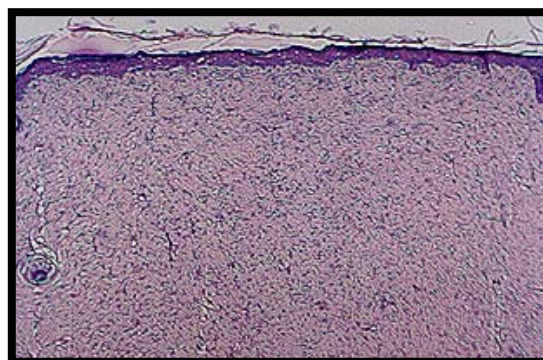


Fig.24: Grupo Irradiado
Aumento original de 6.3x1.25x10

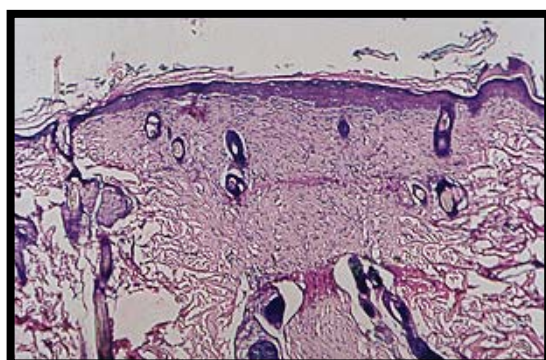


Fig.25: Grupo Carnosina Irradiado
Aumento original de 6.3x1.25x10

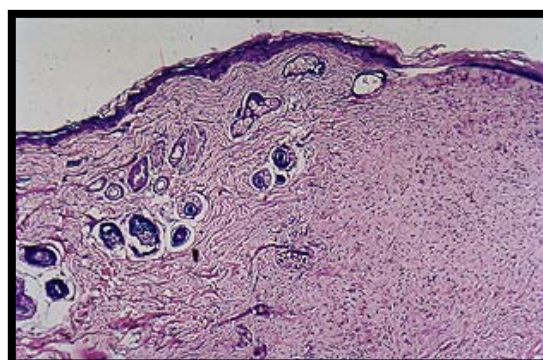


Fig.26: Grupo Carnosina
Aumento original de 6.3x1.25x10

5.2 Avaliação quantitativa dos fibroblastos

As médias relativas a cada grupo, após serem submetidas à análise estatística, exibiram os seguintes resultados:

Tabela 1

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

Grupos	Médias	Desvio Padrão
GC	27.16 A	1.85
GI	13.13 B	2.32
GCaI	28.66 A	0.55
GCa	27.00 A	3.37

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

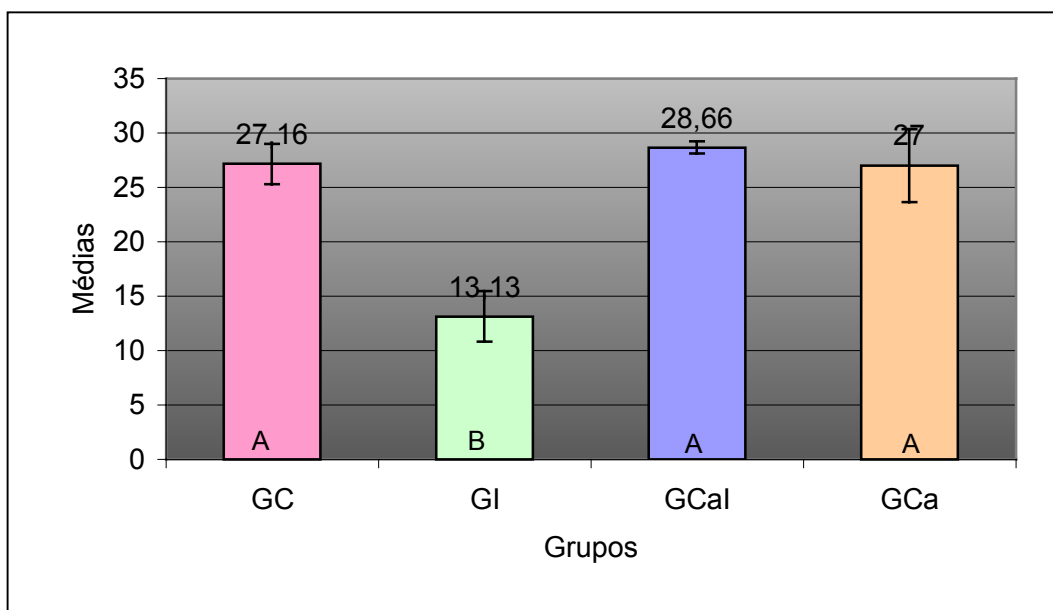


Gráfico 1- Médias e desvios padrão da morfometria dos fibroblastos no 4º dia de reparação tecidual.

Tabela 2

Médias e desvios padrão da morfometria dos fibroblastos no 7º dia de reparação tecidual

Grupos	Médias	Desvios Padrão
GC	65.23 A	1.45
GI	47.06 B	1.90
GCal	65.53 A	0.83
GCa	71.53 A	7.39

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

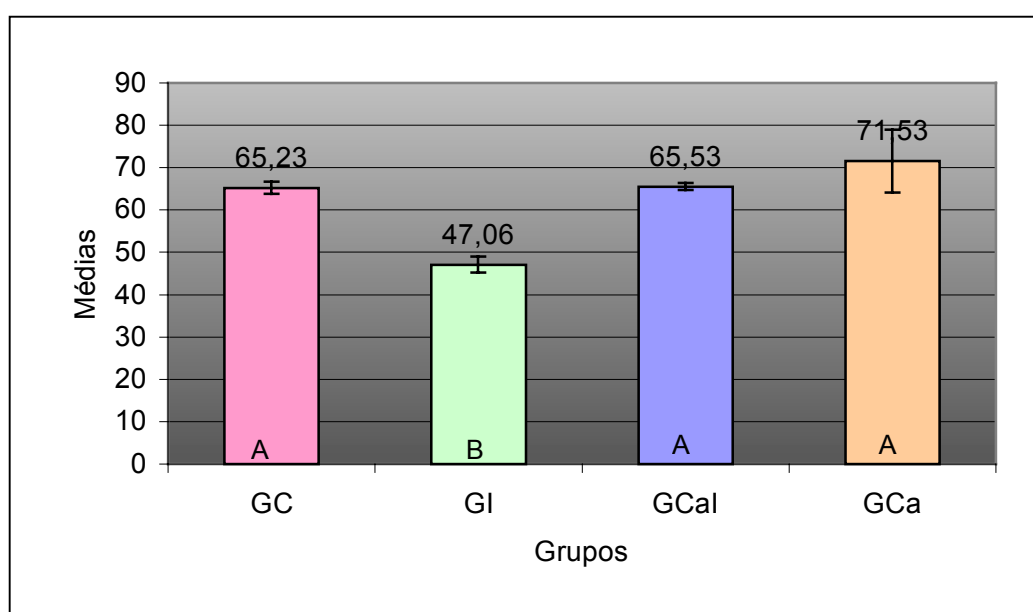


Gráfico 2- Médias e desvios padrão da morfometria dos fibroblastos no 7º dia de reparação tecidual.

5.3 DESCRIÇÃO MORFOLÓGICA: MÉTODO DE MALLORY PARA FIBROGLIA

A fibroglia é muito evidente em tecidos de granulação com elevado ritmo de proliferação, e antes de os mesmos tornarem-se fibrosos. Por este motivo aplicou-se este método apenas no 4º dia de reparação tecidual. Os resultados foram os seguintes:

Grupo Controle: A fibroglia mostrou-se em franca proliferação, apresentando-se como finos prolongamentos azuis em estreito contato com os fibroblastos do tecido de granulação (Fig.27).

Grupo Irrradiado: Este grupo exibiu uma quase completa ausência de desenvolvimento de fibroglia, conforme pode ser visto na figura 28.

Grupo Carnosina Irrradiado: A fibroglia mostrou-se alto ritmo de proliferação, semelhante ao GC (Fig.29).

Grupo Carnosina: Os resultados deste grupo foram semelhantes aos encontrados para os GC e GCal (Fig.30).

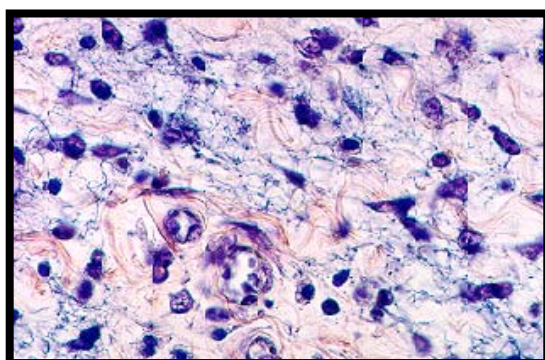


Fig 27: Grupo Controle

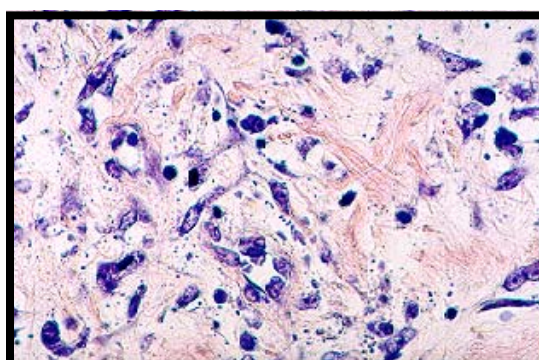


Fig 28: Grupo Irrradiado

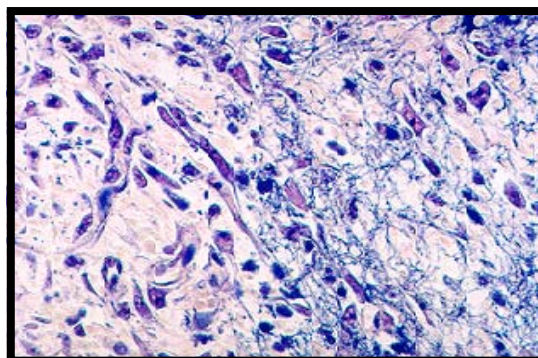
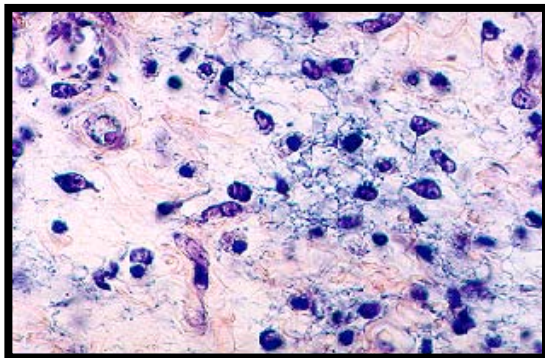


Fig.29: Grupo Carnosina Irradiado
Aumento original de 40x1.25x10

Fig.30: Grupo Carnosina
Aumento original de 40x1.25x10

5.4 AVALIAÇÃO QUALITATIVA DA BIRREFRINGÊNCIA DE FIBRAS COLÁGENAS- COLORAÇÃO PELO PICROSÍRIUS

4º dia de reparação tecidual

Grupo controle: Observou-se uma pequena quantidade de fibras colágenas birrefringentes, ainda delgadas e com brilho moderado (Fig. 31).

Grupo Irradiado: A quantidade de fibras colágenas mostrou-se muito menor que a do GC, e com ordenação ainda extremamente incipiente (Fig. 32).

Grupo Carnosina Irradiado: A birrefringência das fibras colágenas apresentou-se com brilho bastante àquela do GC, e muito mais intensa que à do GI (Fig. 33).

Grupo Carnosina: Os aspectos da birrefringência, neste grupo, foram idênticas aos do GC (Fig. 34).

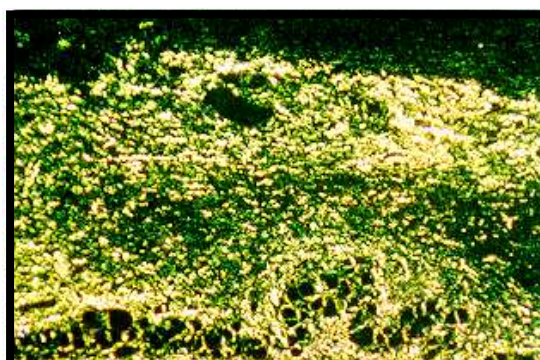
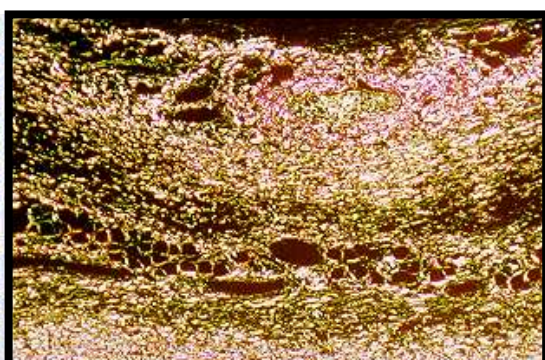


Fig. 31: Grupo Controle
Aumento 6.3x1.25x10

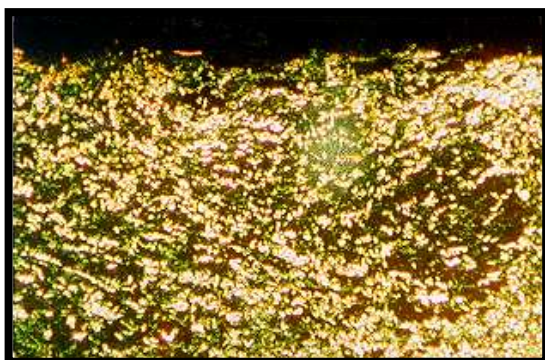


Fig. 32: Grupo Irradiado
Aumento 6.3x1.25x10

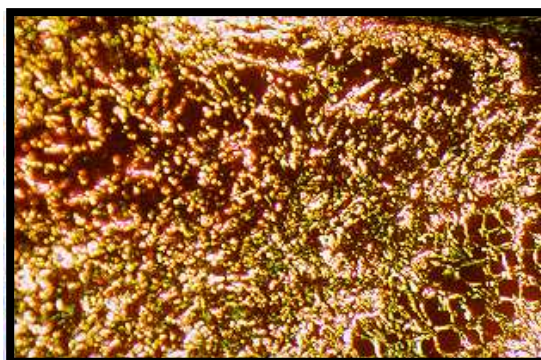


Fig. 33: Grupo Carnosina Irrradiado
Aumento 6.3x1.25x10

Fig. 34: Grupo Carnosina
Aumento 6.3x1.25x10

7º dia de reparação tecidual

Com exceção do GI, que contém menos fibras colágenas e brilho menos intenso (Fig. 35), todos os demais grupos mostraram aspectos semelhantes na sua birrefringência (Fig. 36, 37 e 38).

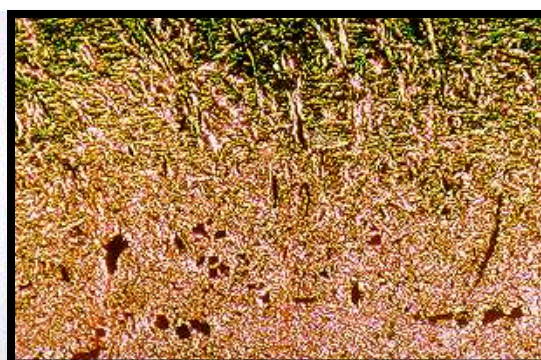
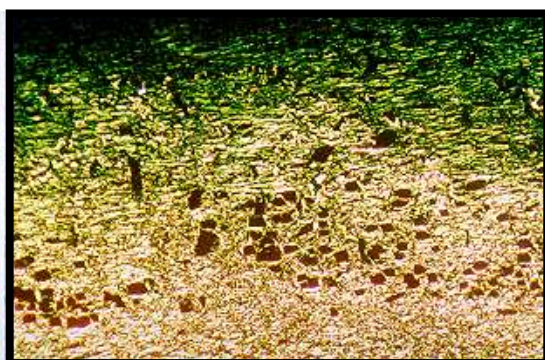


Fig. 35: Grupo Irrradiado
Aumento 6.3x1.25x10



Fig. 36: Grupo Controle
Aumento 6.3x1.25x10

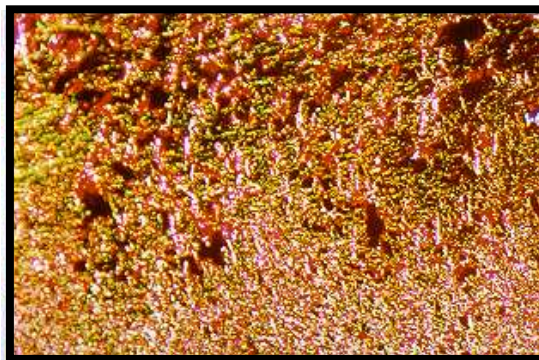


Fig. 37: Grupo Carnosina Irrradiado
Aumento 6.3x1.25x10

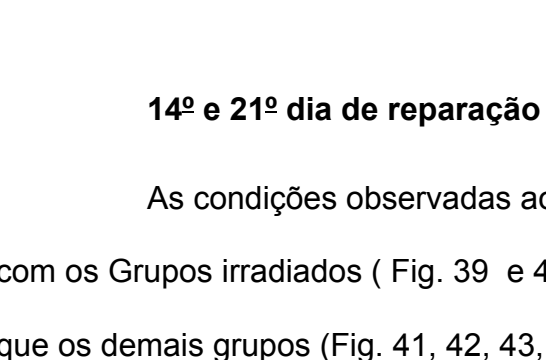
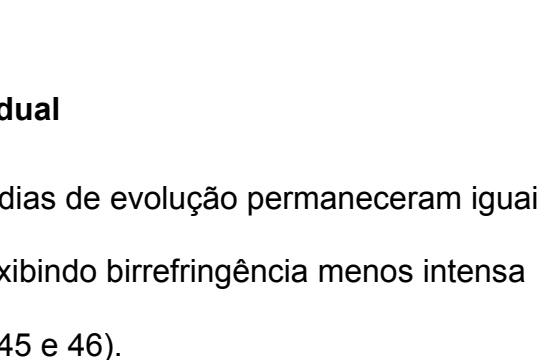


Fig. 38: Grupo Carnosina
Aumento 6.3x1.25x10



14º e 21º dia de reparação tecidual

As condições observadas aos 7 dias de evolução permaneceram iguais, com os Grupos irradiados (Fig. 39 e 40) exibindo birrefringência menos intensa que os demais grupos (Fig. 41, 42, 43, 44, 45 e 46).

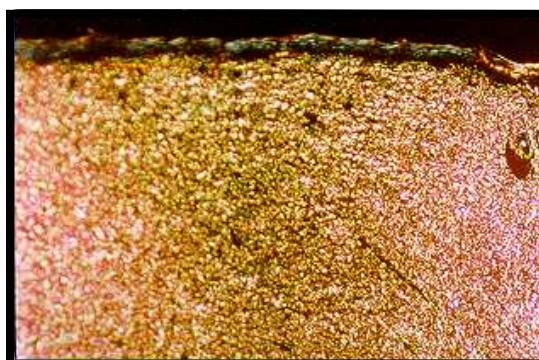
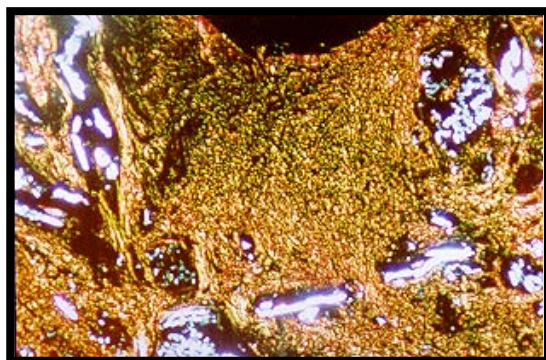


Fig. 39: Grupo Irradiado 14° dia
Aumento 6.3x1.25x10

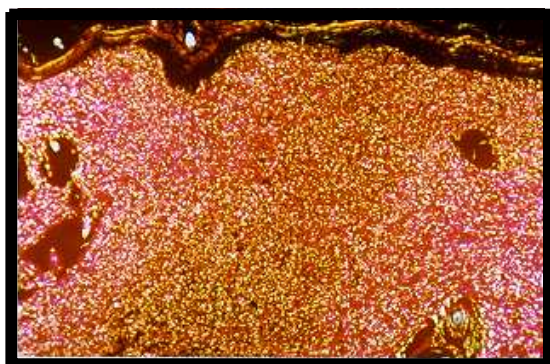


Fig. 40: Grupo Irradiado 21° dia
Aumento 6.3x1.25x10



Fig. 41: Grupo Controle 14° dia
Aumento 6.3x1.25x10

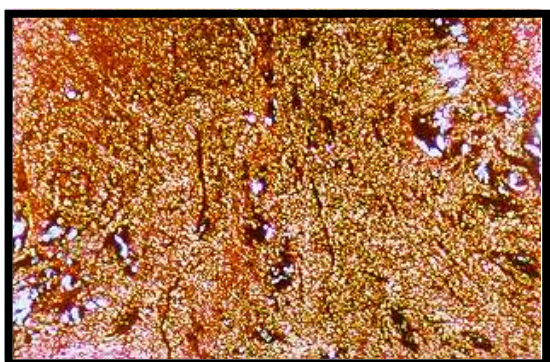


Fig. 42: Grupo Controle 21° dia
Aumento 6.3x1.25x10

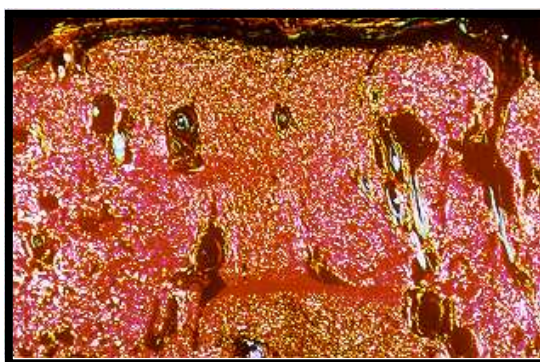


Fig. 43: Grupo Carnosina Irradiado 14° dia
Aumento 6.3x1.25x10

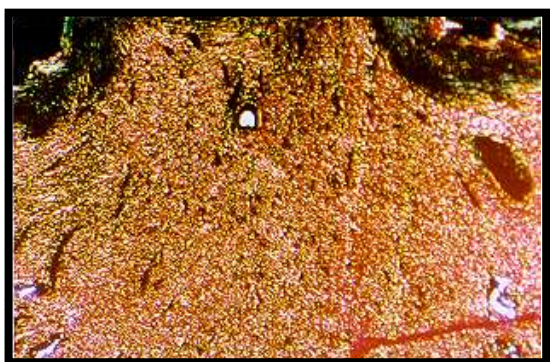


Fig. 44: Grupo Carnosina Irradiado 21° dia
Aumento 6.3x1.25x10

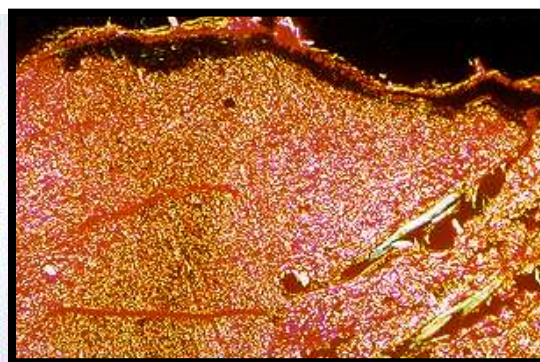


Fig. 45: Grupo Carnosina 14º dia
Aumento 6.3x1.25x10

Fig. 46: Grupo Carnosina 21º dia
Aumento 6.3x1.25x10

5.5 AVALIAÇÃO QUANTITATIVA DA BIRREFRINGÊNCIA DAS FIBRAS COLÁGENAS

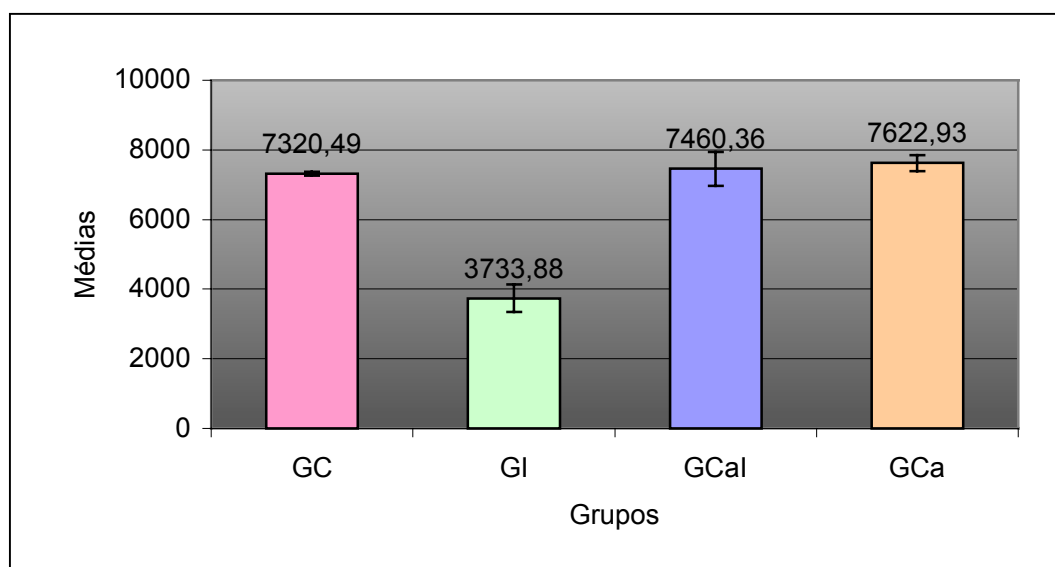
As médias relativas a cada grupo, após serem submetidas à análise estatística, exibiram os seguintes resultados:

Tabela 3

Médias e desvios padrão da birrefringência das fibras colágenas (μm^2) no 4º dia de reparação tecidual

Grupos	Médias	Desvios Padrão
GC	7320.49 A	51.92
GI	3733.88 B	393.39
GCal	7460.36 A	488.86
GCa	7622.93 A	225.18

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



A

B

A

A

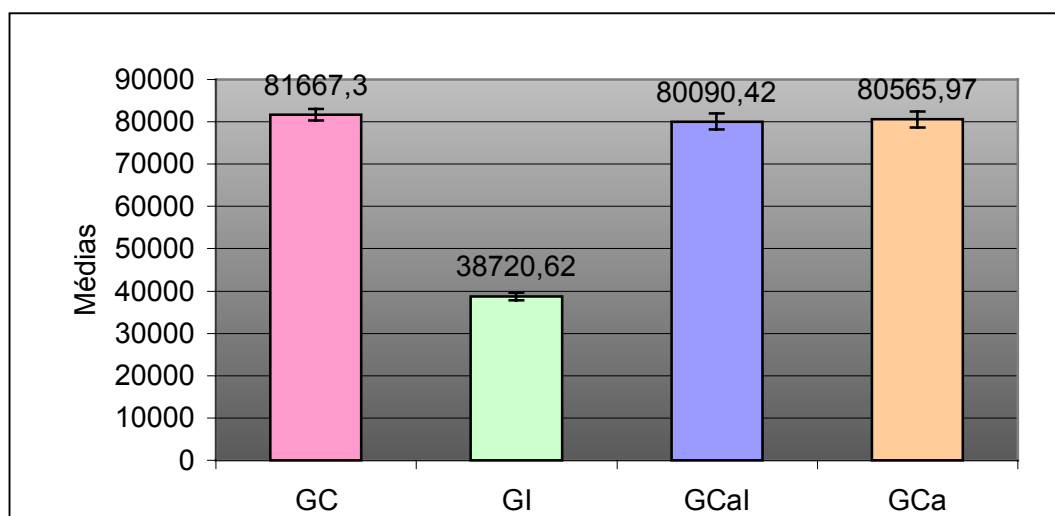
Gráfico 3- Médias e desvios padrão da birrefringência das fibras colágenas (μm^2) no 4º dia de reparação tecidual.

Tabela 4

Médias e desvios padrão da birrefringência das fibras colágenas (μm^2) no 7º dia de reparação tecidual

Grupos	Médias	Desvio Padrão
GC	81667.30 A	1350.00
GI	38720.62 B	952.52
GCal	80090.42 A	1853.54
GCa	80565.97 A	1840.97

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

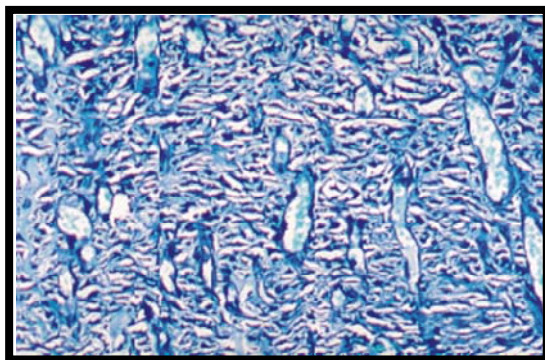


A B A A

Gráfico 4- Médias e desvios padrão da birrefringência das fibras colágenas (μm^2) no 7º dia de reparação tecidual.

5.6 AVALIAÇÃO DO DICROÍSMO LINEAR

No 4º dia de desenvolvimento nenhum dos grupos apresentou o dicroísmo, denotando que a esse tempo, ainda não há suficiente grau de orientação macromolecular para a indução do fenômeno. Quando analisou-se o 7º dia de desenvolvimento, os grupos controle, carnosina irradiado e carnosina apresentavam dicroísmo evidente, conforme pode-se observar pelo exame das figuras: 47, 48, 49, 50, 51e 52. O GI, contrariamente, não apresentou dicroísmo (Fig. 53 e 54), o que somente se tornou evidente, para este grupo, no 14º dia de desenvolvimento (Fig. 55 e 56).



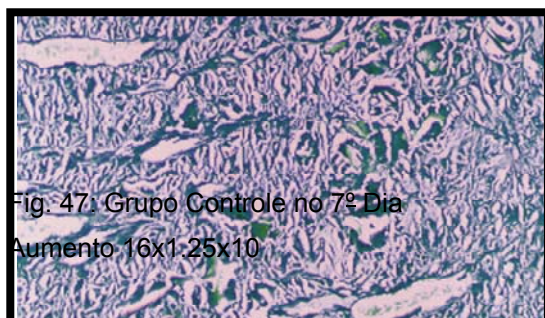


Fig. 47: Grupo Controle no 7º Dia
Aumento 16x1.25x10

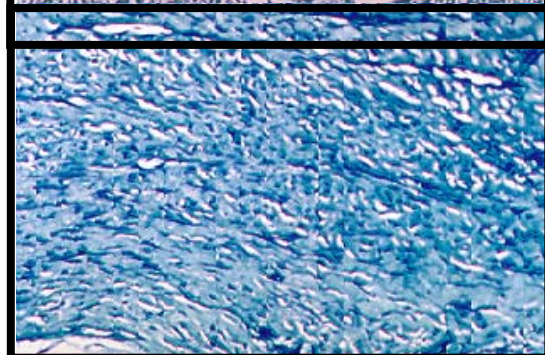


Fig. 49: Grupo Irradiado no 7º Dia
Aumento 16x1.25x10

Fig. 48: Grupo Controle no 7º Dia
Aumento 16x1.25x10

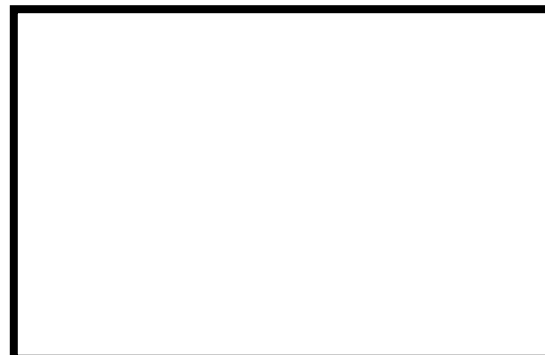


Fig. 50: Grupo Irradiado no 7º Dia
Aumento 16x1.25x10

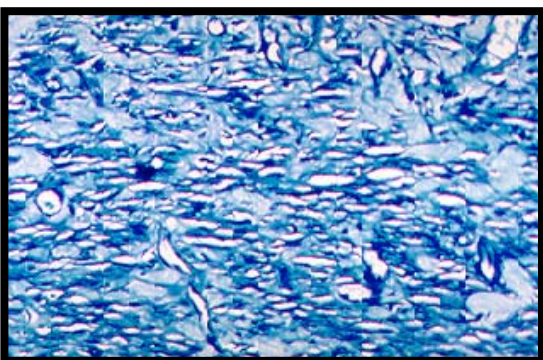


Fig. 51: Grupo Carnosina Irradiado no 7º Dia
Aumento 16x1.25x10

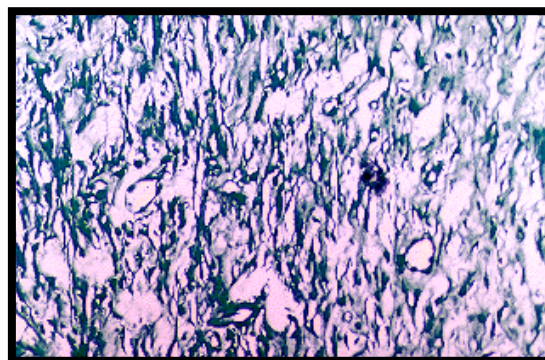


Fig.52: Grupo Carnosina Irradiado no 7º Dia
Aumento 16x1.25x10

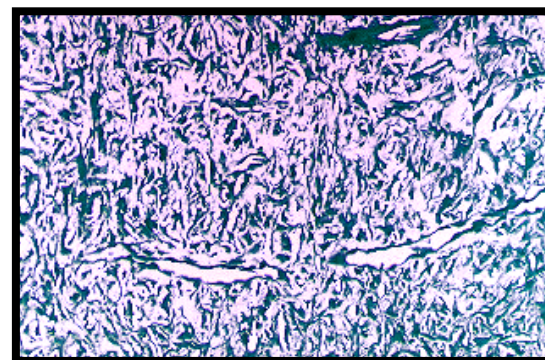
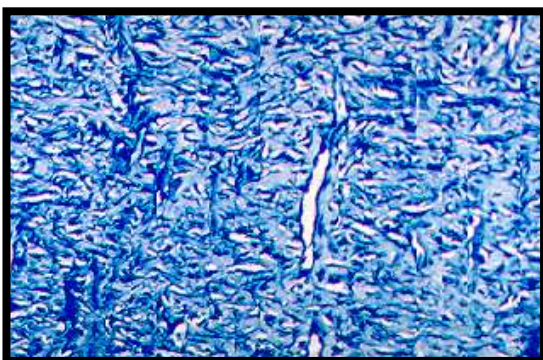


Fig. 53: Grupo Carnosina no 7º Dia
Aumento 16x1.25x10

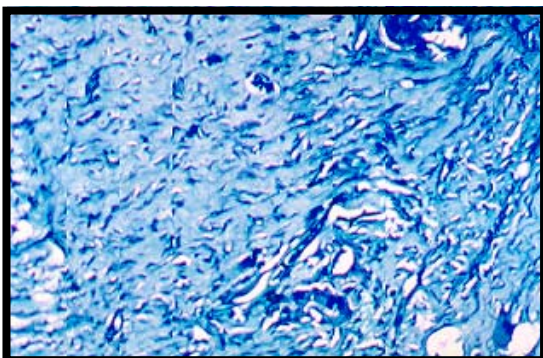


Fig. 54: Grupo Carnosina no 7º Dia
Aumento 16x1.25x10

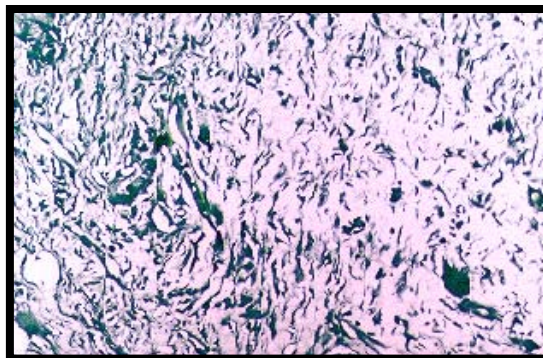


Fig. 55: Grupo Irradiado no 14º Dia
Aumento 16x1.25x10



Fig. 56: Grupo Irradiado no 14º Dia
Aumento 16x1.25x10



6 DISCUSSÃO

O efeito deletério da radiação ionizante no processo de reparação tecidual mostrou-se evidente quando se comparava o GC com GI, de acordo com os resultados encontrados por POHLE, *et al.* (1931); RITCHIE (1933); NATHANSON (1934); REINHOLD & BUISMAN (1973); DRÓZDZ *et al.* (1981); LUCE (1984); MOORE (1984); CARRICO *et al.* (1984); GUIDUGLI NETO (1987); RUDOLPH *et al.* (1988); MILLER & RUDOLPH (1990); ABDALLA (1991); BERNSTEIN *et al.* (1993); MUSTOE & PORRAS-REYES (1993); WANG *et al.* (1994); DRAKE & OISHI (1995); TIBBS (1997); ALMEIDA (1997); PEREIRA FILHO, *et al.* (1998); MONTEIRO (1999); BÓSCOLO *et al.* (2000); MANZI (2001) e TUJI (2001).

Existem na literatura várias explicações na tentativa de justificar o efeito deletério das radiações nos tecidos durante a cicatrização. O retardo no crescimento dos fibroblastos foi relatado por RITCHIE (1933); RUDOLPH *et al.* (1988). A redução da quantidade de vasos neoformados foi abordado por REINHOLD & BUISMAN (1973); LUCE (1984); CARRICO *et al.* (1984); GUIDUGLI NETO (1987) e MUSTOE & PORRA-REYES (1993). O prejuízo da radiação interferindo no metabolismo dos glicosaminoglicanos (GAGs) foi citado por DRÓZDZ (1981); o efeito prejudicial no crescimento das fibras do tecido conjuntivo foi considerado por NATHANSON (1934) e as alterações na formação do colágeno foi relatado por WANG *et al.* (1994).

Existem alguns autores que acreditam que o efeito prejudicial esteja relacionado tanto aos problemas vasculares quanto às alterações nos fibroblastos (MOORE 1984; RUDOLPH *et al.* 1988; MILLER & RUDOLPH 1990). As alterações funcionais dos fibroblastos influenciando na produção de colágeno deficiente, requerendo tempo de maturação mais longo também foram relatados por BERNSTEIN (1993); DRAKE & OISHI (1995) e TIBBS (1997).

Na presente pesquisa, ao ter sido realizada a morfometria dos fibroblastos durante o 4º e 7º dia de reparação tecidual, evidenciaram-se alterações significativas no número de fibroblastos presentes no tecido de granulação, quando comparado o GC com o GI; portanto, o efeito da radiação ionizante em prejudicar a reparação tecidual pode estar relacionada com a diminuição do número de fibroblastos.

Ao avaliar-se a fibroglia, evidente em tecido de granulação com elevado ritmo de proliferação, foi possível relacionar a ação da radiação atrasando também o ritmo de proliferação do tecido de granulação irradiado.

Por meio da avaliação da orientação das moléculas de colágeno pela coloração por Picrosírius, o GI mostrou-se ao exame da luz polarizada, com brilho menos intenso quando comparado ao GC, possibilitando-se relacionar o efeito deletério da radiação promovendo atraso na orientação das moléculas de colágeno.

Ao analisar-se o fenômeno do dicroísmo linear, observou-se que o GI no 7º dia de reparação tecidual, enquanto em todos os outros grupos avaliados já se detectava a presença de orientação macromolecular, nesse grupo ainda não havia nenhuma evidência do processo de organização tecidual. Portanto, a radiação também prejudica a ligação dos GAGs às moléculas do colágeno, atrasando conseqüentemente a formação dos feixes de fibras colágenas. De acordo com VIZIOLI (1971), MANZI (2001) e TUJI (2001), a organização macromolecular do tecido de granulação inicia-se por volta do 7º dia de reparação tecidual, portanto, com exceção do GI, todos os demais apresentaram a organização semelhante ao processo de reparação normal.

A irradiação utilizada nesta pesquisa foi aplicada no 3º dia de reparação tecidual, período relativo à fase proliferativa de cicatrização, caracterizada pelo surgimento dos fibroblastos e células endoteliais. A radiosensibilidade celular é diretamente proporcional à atividade mitótica e inversamente proporcional ao grau de diferenciação celular, princípio formulado por BERGONIÉ & TRIBONDEAU (1906). Estas considerações podem explicar as alterações provocadas pela radiação utilizada, interferindo na diminuição do número de fibroblastos no tecido de granulação, pois este tecido encontrava-se com grande capacidade reprodutora.

Os fibroblastos têm participação importantíssima durante o processo de cicatrização, pois são responsáveis pela síntese protéica, produzindo o colágeno. Pode-se estabelecer que a diminuição do número de fibroblastos reduz a síntese

do colágeno, atrasando a orientação das suas moléculas e a formação das fibras colágenas, e em decorrência, o atraso no processo de reparação.

Com a finalidade de avaliar o efeito radioprotetor da carnosina na reparação tecidual, utilizou-se neste experimento, duas aplicações de solução aquosa de carnosina anteriormente à irradiação. O GCal mostrou-se em todos os aspectos analisados semelhantes ao GC, portanto a carnosina ajudou na inibição dos efeitos deletérios provocados pela radiação gama. O mecanismo de ação desta substância pode estar relacionado principalmente pela sua ação antioxidante, pois através da radiólise da água são formados radicais hidroxilas e átomo de hidrogênio, e na presença de oxigênio pode resultar em peróxido de hidrogênio e superóxido. Diversos autores têm demonstrado a afinidade da carnosina pelos radicais livres, principalmente pelo radical hidroxila. Além disto, vários autores ressaltam a habilidade da carnosina em interagir com os produtos da peroxidação de lipídeos, reduzindo a velocidade de iniciação da cadeia ou interferindo na sua propagação, o que preveniria o dano nas membranas celulares (ARUOMA *et al.*, 1989; BOLDYREV & SEVERIN, 1990; SILAEVA, 1990; BOLDYREV, 1993; KANSCI, 1997; HIPKISS, 2001).

Um estudo *in vitro*, TAMBA & TORREGIANI (1998) comprovou que a carnosina é um ótimo removedor de radicais hidroxilas. Resultando em composto estável menos reativo, protege as estruturas biológicas, e supõe que a carnosina seja um antioxidante biológico. Além de ARUOMA *et al.* (1989), também demonstrarem *in vitro* a afinidade da carnosina com o radical hidroxila, sugerem

que suas propriedades antioxidantes não estão apenas relacionadas com a sua afinidade por alguns radicais livres, mas, por exemplo, por possuir um efeito tampão.

A carnosina é degradada pela carnosinase tecidual em β -alanina e histidina, e a histidina serve como substrato para a produção de histamina (NAGAI, 1986). Com a irradiação, a fase inflamatória da reparação tecidual encontrou-se prolongada como foi observado nos resultados deste trabalho. Considerando que a administração de carnosina possibilita maior produção de histamina, mediador químico responsável pelo aumento da permeabilidade vascular, o seu efeito radioprotetor neste modelo experimental, pode estar relacionado com a aceleração da fase inflamatória devido à maior quantidade deste mediador químico.

O GCa se comportou semelhante ao GC, apesar de diversos autores relatarem que a carnosina promove a estimulação do processo de reparação tecidual, acelerando o desenvolvimento do tecido de granulação (MUKKADA *et al.*, 1969; FUJI & COOK, 1973; NAGAI & SUGIYAMA, 1974; SUZUKI & NAGAI, 1974; NAGAI, 1975; NAGAI, 1978; VIZIOLI & ALMEIDA, 1978; FITZPATRICK & FISCHER, 1982; VIZIOLI *et al.*, 1983; NAGAI *et al.*, 1986). A carnosina não mostrou aceleração no processo de reparo neste modelo experimental, provavelmente devido à quantidade das doses administradas, e pelo fato de que, quando foram administradas, a reparação tecidual encontrava-se no final da fase inflamatória e início da fase proliferativa da reparação tecidual. Na maioria dos

estudos em que a carnosina acelerou o processo de cicatrização, esta foi administrada diariamente (NAGAI & SUGIYAMA, 1974; SUZUKI & NAGAI, 1974; NAGAI, 1975; NAGAI, 1978; VIZIOLI & ALMEIDA, 1978; FITZPATRICK & FISCHER, 1982; VIZIOLI *et al.*, 1983; NAGAI *et al.*, 1986).

O objetivo era disponibilizar a carnosina durante a irradiação, para que fosse feita a relação com o efeito radioprotetor, portanto não foram feitas aplicações durante todo o reparo. Desta forma, o GCa serviu como parâmetro para se avaliar o comportamento da carnosina neste modelo experimental.

Quando se quer utilizar qualquer medicamento, é essencial conhecer o seu mecanismo de ação e os seus efeitos colaterais detalhadamente. Em se tratando da carnosina, apesar de existirem diversas pesquisas, ainda não foi possível esclarecer completamente o seu mecanismo de ação biológico, portanto muitas investigações ainda são necessárias. Com relação a seus efeitos colaterais, pode-se considerar que por ser uma substância endógena, degradada pela carnosinase tecidual, mesmo se administrada em excesso, a toxicidade será mantida em níveis aceitáveis pelo organismo.

7 CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos e dentro das condições experimentais empregadas neste trabalho, pôde-se concluir que:

- a carnosina exerceu efeito radioprotetor efetivo, inibindo de forma acentuada a ação deletéria da radiação;
- no grupo que recebeu a carnosina sem ter sido irradiado, não houve nenhum efeito de ativação do processo de reparo, comportando-se este grupo como o grupo controle.

Referências Bibliográficas*

1. ABDALLA, C.M. *et al.* Estudo histológico da gênese e evolução do tecido de granulação sob efeitos de baixas doses de radiação X. **Rev Fac Odontol Univ São Paulo**, São Paulo, v.5, n.2, p.90-95, jul./dez. 1991.
2. ALMEIDA, S.M. **Efeito da radiação de elétrons na reparação tecidual**. Piracicaba, 1997. 130p. Tese (Doutorado em Radiologia) – Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas.
3. ARUOMA, O.I.; LAUGHTON, M.J.; HALLIWELL, B. Carnosine, homocarnosine and anserine: could they act as antioxidants *in vivo*? **Biochem J**, London, v.264, n.3, p.863-869, Dec. 1989.
4. BAKER, D.G.; KROCHAK, R.J. The response of microvascular system to radiation: a review. **Cancer Invest**, New York, v.7, n.3, p.287-294, 1989.
5. BENNET, H.S. The microscopical investigation of biological materials with polarized light. *In*: JONES, R.M. **Mc Clung's Handbook of Microscopical Technique**. New York: Hafner Publishing CO, 1967, cap.9, p.591-677.
6. BERNSTEIN, E.F. *et al.* Biology of chronic radiation effect on tissue and wound healing. **Clin Plast Surg**, Philadelphia, v.20, n.3, p.435-453, July 1993.
7. BERNSTEIN, E.F. *et al.* Healing impairment of open wounds by skin irradiation. **J Dermatol Surg Oncol**, New York, v.20, n.11, p.757-760, Nov. 1994.
8. BOGARDUS, S.L.; BOISSONNEAULT, G.A. Carnosine inhibits in vitro low-density lipoprotein oxidation. **Nutrition Res**, Tarrytown, v.20, n.7, p.967-976, 2000.
9. BOLDYREV, A.A. Does carnosine possess direct antioxidant activity. **Int J Biochem**, Elmsford, v.25, n.8, p.1101-1107, Aug. 1993.

*Baseada na NBR-6023 de ago. de 2000, da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT). Abreviatura dos títulos dos periódicos em conformidade com o MEDLINE.

10. BOLDYREV, A.A.; SEVERIN, S.E. The histidine-containing dipeptides, carnosine and anserine: distribution, properties and biological significance. **Adv Enzyme Regul**, Emsford, v.30, p.175-194, 1990.
11. BOLDYREV, A.A. *et al.* A comparative study of synthetic carnosine analogs as antioxidants. **Comp Biochem Physiol B**, Elmsford, v.94, n.2, p.237-240, 1989.
12. BÓSCOLO, F.N. *et al.* Efeito de baixas doses de radiação X em feridas suturadas e não suturadas- estudo experimental em ratos. **Pesqui Odontol Bras**, São Paulo, v.14, n.4, p.386-391, out./dez. 2000.
13. CARRICO, M.D. *et al.* Biology of wound healing. **Surg Clin N Am**, Philadelphia, v.64, n.4, p.721-733, Aug. 1984.
14. CARROLL, M.P. *et al.* Efficacy of radioprotective agents in preventing small and large bowel radiation injury. **Dis Colon Rectum**, Philadelphia, v.38, n.7, p.716-722, July 1995.
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. DRÓZDZ, M. *et al.* Effect of irradiation on glycosaminoglycans content in rat tissue. **Arch Immunol Ther Exp (Warsz)**, Warsz, v.29, n.4, p.515-519, 1981.
17. EDWARDS, J.E. Methods for the demonstration of intercellular substances of the connective tissues. *In*: JONES, R.M. **Mc Clung's Handbook of Microscopical Technique**. New York: Hafner Publishing CO, 1967, cap.6, p.240-268.
18. FITZPATRICK, D.W.; FISHER, H. Carnosine, histidine, and wound healing. **Surgery**, Saint Louis, v.91, n.1, p.56-60, Jan. 1982.
19. FREITAS, A.; ROSA, J.E.; SOUZA, I.F. **Radiologia Odontológica**: 5ed., São Paulo: Artes Médicas, 2000. 776 p.
20. FUJII, A.; COOK, E.S. Prodiotics. Antistaphylococcal and antifibrinolytic activities of ω -guanidoacyl 1- histidines. **J Med Chem**, Washington, v.16, n.12, p.1409-1411, Dec. 1973.

21. GARIBALLA, S.H.; SINCLAIR, A.J. Carnosine: physiological properties and therapeutic potential. **Age Ageing**, Oxford, v.29, n.3, p.207-210, May 2000.
22. GOLDSCHMIDT, H. *et al.* Ionizing radiation therapy in dermatology. **J Am Acad Dermatol**, Saint Louis, v.30, n.2, p.157-182, Feb. 1994.
23. GRILLO, H.C. Origin of fibroblasts in wound healing: an autoradiographic study of inhibition of cellular proliferation by local x-irradiation. **Ann Surg**, Philadelphia, v.157, n.3, p.453-467, Mar. 1963.
24. GUIDUGLI NETO, J. The effect of Roentgen radiation on the capillary sprouts and superficial loops of granulation tissue. I. Quantitative study of the vascular volume. **Rev Fac Odontol Univ São Paulo**, São Paulo, v.1, n.4, p.6-8, out./dez. 1987.
25. GULEWITCH und AMIRADZIBI. **Z Physiol Chem Bd.** 30, S. 565 (1900). *Apud* NAGAI, K. *Op. cit.* Ref. 45.
26. HILL, R.P. *et al.* Normal tissue radiobiology: from the laboratory to the clinic. **Int J Radiat Oncol Biol Phys**, Tarrytown, v.49, n.2, p.353-365, 2001.
27. HIPKISS, A.R.; BROWNSON, C.; CARRIER, M.J. Carnosine, the anti-aging, anti-oxidant dipeptide, may react with protein carbonyl groups. **Mech Ageing Dev**, Limerick, v.122, n.13, p.1431-1445, Sept. 2001.
28. HIPKISS, A.R. *et al.* Pluripotent protective effects of carnosine, a naturally occurring dipeptide. **Ann N Y Acad Sci**, New York, v.20, n.854, p.37-53, Nov. 1998.
29. HIPKISS, A.R. *et al.* Protective effects of carnosine against malondialdehyde-induced toxicity towards cultured rat brain endothelial cells. **Neurosci Lett**, Limerick, v.238, n.5, p.135-138, Dec. 1997.
30. HOLLIDAY, R.; McFARLAND, G.A. A role carnosine in cellular maintenance. **Biochemistry**, Washington, v.65, n.7, p.991-997, 2000.

31. KANSCI, G. *et al.* The antioxidant activity of carnosine and its consequences on the volatile profiles of liposomes during iron/ascorbate induced phospholipid oxidation. **Food Chem**, Oxford, v.60, n.2, p.165-175, 1997.
32. KARBOWNIK, M.; REITER, R.J. Antioxidative effects of melatonin in protection against cellular damage caused by ionizing radiation. **Proc Soc Exp Biol Med**, Cambridge, v.225, n.1, p. 9-22, Oct. 2000.
33. KRISHNAN, E.C. *et al.* Dose-dependent radiation effect on microvasculature an repair. **J Natl Cancer Invest**, Cary, v.79, n.6, p.1321-1325, Dec. 1987.
34. LUCE, E.A. The irradiated wound. **Surg Clin N Am**, Philadelphia, v.64, n.4, p.821-829, Aug. 1984.
35. MAISIN, J.R.; MATTELIN, G.; LAMBIET-COLLIER, M. Chemical radioprotection against the long-term effects of a single whole-body exposure of a mice to ionizing radiation. I. Life shortening. **Radiat Res**, London, v.71, n.1, p.119-131, July 1977.
36. MAISIN, J.R. Chemical radioprotection: past, present and future prospects. **Int J Radiat Biol**, London, v.73, n.4, p.443-450, 1998.
37. MANZI, F.R. **Estudo do efeito radioprotetor da viatmina E (dl-alfa-tocoferil) na reparação tecidual em ratos**. Piracicaba, 2001. x, 122p. Dissertação (Mestrado em Radiologia) – Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas.
38. McFARLAND, G.A.; HOLLIDAY, R. Retardation of the senescence of cultured human diploid fibroblasts by carnosine. **Exp Cell Res**, Orlando, v.212, n.2, p.167-175, June 1994.
39. MILLER, S.H.; RUDOLPH, R. Healing in the irradiated wound. **Clin Plast Surg**, Philadelphia, v.17, n.3, p.503-508, July 1990.
40. MONTEIRO, S.A.C. **Efeitos da irradiação de elétrons em feridas e em tecido de granulação**. Piracicaba, 1999. 99p. Tese (Doutorado em Radiologia) – Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas.

41. MOORE, M.J. The effect of radiation on connective tissue. **Otolaryngol Clin North Am**, Philadelphia, v.17, n.2, p.389-398, May 1984.
42. MUKKADA, A.J.; NUTINI, L.G.; COOK, E.S. Prophylactic effect of γ - aminobutyrylhistidine (homocarnosine) on the experimental staphylococcal infections in mice. **Appl Microbiol**, Washington, v.18, n.4, p. 641-645, Oct. 1969.
43. MUSTOE, T.A.; PORRAS-REYES, B.H. Modulation of wound healing response in chronic irradiated tissues. **Clin Plast Surg**, Philadelphia, v.18, n.3, p.465-471, July 1993.
44. NAGAI, K. Pathophysiologische Bedeutung von l-Carnosin auf die Wundheilung. **Heterocycles**, v.10, p.277-347, 1978. *Apud* VIZIOLI, M.R. *et al. Op. cit.* Ref. 67.
45. NAGAI, K. **Studies of carnosine and related chemicals on the physiology of wound repair mechanism**. Tokyo: Department of Physiology, School of Dentistry Nihon University, 1975.
46. NAGAI, K.; SUGIYAMA, H. A curative effect of carnosine (β -alanyl 1- histidine) on the decubital ulcer. **J Nihon Univ Sch Dent**, Tokyo, v.16, n.1, p.23-28, Mar. 1974.
47. NAGAI, K. *et al.* Action of carnosine and β -alanine on wound healing. **Surgery**, Saint Louis, v.100, n.5, p.815-821, Nov. 1986.
48. NATHANSON I.T. Effect of the gamma-ray of radium on wound healing. **Surg Gynec Obst**, v. 59, p. 62-69, July 1934.
49. PAVLOV, A.R. *et al.* The mechanism of interaction of carnosine with superoxide radicals in water solutions. **Biochim Biophys Acta**, Amsterdam, v.1157, n.3, p.304-312, July 1993.
50. PEREIRA FILHO, G.V. *et al.* Estudo histológico e morfométrico da reparação de feridas cutâneas, provocadas em ratos, submetidas à radiação beta do estrôncio-90. **Arq Med ABC**, Santo André, v.21, n.1/2, p.4-16, 1998.
51. POHLE, E.A.; RITCHIE, G.; MOIR, W.W. Studies of the effect of Roentgen rayS on healing of wounds. I. Histological changes in skin wounds in rats following. Postoperative irradiation with very small and moderated doses. **Radiology**, Oak Brook, v.52, p.707-7013, May 1949.

52. POHLE, E.A.; RITCHIE, G.; WRIGHT, C.S. Studies of the effect of Roentgen ray on the healing of wounds. I. Behavior of the skin wound in rats under pre or post operative irradiation. **Radiology**, Oak Brook, v.16, p.445-460, 1931.
53. RAVELI, D.B. *et al.* Influência da radiação X na cronologia do processo de reparo em feridas de extração dental. Estudo histomorfométrico em ratos. **Rev Fac Odontol Univ São Paulo**, São Paulo, v.4, n.2, p.119-125, abr./jun. 1990.
54. REINHOLD, M.D.; BUISMAN, G.H. Radiosensitivity of capillary endothelium. **Br J Radiol**, London, v.46, n.541, p.54-47, Jan. 1973.
55. RITCHIE, G. Effect of roentgen irradiation on the healing of wounds. **Arch Path.** v.16,n. ,p.839-851, Dec. 1933.
56. ROSS, R.; EVERETT, B.; TYLER, R. Wound healing and collagen formation VI- The origin of the wound fibroblast studied in parabiosis. **J Cell Biol**, New York, v.44, n.3, p.645-654, Mar. 1970.
57. RUDOLPH, R. *et al.* Slowed growth of cultured fibroblasts from human radiation wounds. **Plast Reconstr Surg**, Baltimore, v.82, n.4, p.669-675, Oct. 1988.
58. SILAEVA, S.A. *et al.* Effects of 4-methyluracil and carnosine on healing of skin wounds in rats. **Biull Eksp Biol Med**, Moskva, v.109, n.2, p.180-182, 1990.
59. STEIN, M.; BRADY, L.W.; RAVENTOS, A. The effects of radiation on extraction-wound healing in the rat. **Cancer**, New York, v.10, n.6, p.1167-1181, Nov./Dec. 1957.
60. STVOLINSK, S.L.; DOBROTA, D. Anti-ischemic activity of carnosine. **Biochemistry**, Washington, v.65, n.7, p.998-1005, 2000.
61. SUZUKI, T.; NAGAI, K. Local antiinflammatory effect of L-carnosine (β alanyl 1-histidine) associated with pains of post dental extraction. **J Nihon Sch Dent**, Tokyo, v.16, n.1, p.18-22, Mar. 1974.
62. TAMBA, M.; TORREGGIANI, A. A pulse radiolysis study of carnosine in aqueous solution. **Int J Radiat Biol**, London, v.74, n.3, p.330-340, Sept. 1998.

63. TIBBS, M.K. Wound healing following radiation therapy: a review. **Radiother Oncol**, Limerick, v. 42, n.2, p.99-106, Feb. 1997.
64. TUJI, F.M. **Avaliação do efeito radioprotetor do selenito de sódio no processo de reparação tecidual. Estudo experimental em ratos**. Piracicaba, 2001. xx, 121p. Dissertação (Mestrado em Radiologia) – Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas.
65. VIZIOLI, M.R. Macromolecular organization of rat sponge-induced granulation tissue as revealed by dichroism. **Acta Anat (Basel)**, Basel, v.80, n.10, p.73-80, Nov. 1971.
66. VIZIOLI, M.R.; ALMEIDA, O.P. Effects of carnosine on the development of rat sponge-induced granulation tissue. I. General morphology and glycosaminoglycans histophotometry. **Cell Mol Biol**, Noisy Le Grand, v.23, n.3, p.267-273, 1978.
67. VIZIOLI, M.R. *et al.* Effects of carnosine on the development of rat sponge-induced granulation tissue.II. Histoautoradiographic observations on collagen biosynthesis. **Cell Mol Biol**, Noisy Le Grand, v.29, n.1, p.1-9, 1983.
68. WANG, Q. *et al.* Eletron irradiation slows down wound repair in rat skin: A morphological investigation. **Br J Dermatol**, Oxford, v.130, n.5, p.551-560, May 1994.
69. WATANABE, P.C.A. *et al.* Efeitos de baixas doses de radiação sobre a gênese e a evolução do tecido de granulação. **Rev Odontol Univ São Paulo**, São Paulo, v.8, n.2, p.137-143, abr./jun. 1994.
70. WEISS, J.F.; LANDAUER, M.R. Radioprotection by antioxidants. **Ann N Y Acad Sci**, New York, v.899, p.44-60, 2000.

