

ESTUDO HISTOLÓGICO E MORFOMÉTRICO DA REPARAÇÃO DE FERIDAS CUTÂNEAS, PROVOCADAS EM RATOS, SUBMETIDAS À RADIAÇÃO BETA DO ESTRÔNCIO-90*

Gerson Vilhena Pereira Filho **

Saul Goldenberg***

Neil Ferreira Novo ****

Manoel Jesus Simões*****

PEREIRA FILHO, G.V. – Estudo histológico e morfométrico da reparação de feridas cutâneas, provocadas em ratos, submetidas à radiação Beta do Estrôncio-90.

RESUMO: O objetivo deste trabalho foi investigar os efeitos da radiação Beta do Estrôncio-90 no processo de reparação tecidual de feridas provocadas em ratos.

Utilizamos 24 animais da linhagem EPM-1 Wistar distribuídos em 4 grupos. Receberam a radiação em dias alternados e sua análise foi feita aos 3, 7, 14 e 21 dias de pós-operatório.

Realizou-se duas incisões no dorso de cada animal, suturou-se em seguida, sendo que a de situação cranial foi irradiada e a caudal serviu para controle.

Nas áreas determinadas, as feridas controle e irradiada foram observadas macroscopicamente e retiradas para preparo do estudo histológico comparativo ao microscópico óptico. Realizou-se, em seguida, análise morfométrica para contagem de leucócitos, fibroblastos e fibras colágenas, submetidos a estudo estatístico. Da análise dos resultados, pode-se concluir que, em geral, a radiação Beta do Estrôncio-90 provocou um aumento no número de leucócitos, uma diminuição no número de fibroblastos e não alterou o número de fibras colágenas, quando comparou-se a ferida irradiada à controle nos tempos do experimento.

DESCRIPTORIOS: Cicatrização de feridas – Radiação

INTRODUÇÃO

A evolução de uma ferida para cicatriz apresenta modificações que podem ser alteradas com o uso de substâncias e alguns pesquisadores têm feito estas tentativas no passar dos anos.

As radiações ionizantes têm sido utilizadas na tentativa de controlar fenômenos biológicos e, dentre estes, a cicatrização.

Os raios Beta constituem-se em radiações corpusculares de carga negativa que ao atravessarem os tecidos, provocam nesses uma série de alterações, das quais as mais importantes são a ionização e a absorção energética. Estes raios provocam modificações diretas sobre o núcleo celular e indiretas sobre o protoplasma. A radiação ionizante pode romper ligações

de hidrogênio ou sulfidrilas, oxidar compostos, romper ligações dentro da hélice do DNA ou causar dimerização das bases purina e pirimidina no DNA. As células são mais sensíveis a esses efeitos na fase pré-mitótica, por isso a necessidade de aplicações repetidas de raios Beta, com determinados intervalos, para que um grande número de células seja irradiado eficazmente (RAPER, ZIRKL, BARNES, 1951).

SNIDER & RAPER (1951) estudaram os efeitos histopatológicos dos raios Beta do fósforo-32 (p.32) em doses únicas de 5000 e 2500 Rep* na pele de camundongos, que tiveram toda superfície corpórea irradiada. As alterações observadas restringiram-se à epiderme e derme, sendo mais acentuadas nas doses maiores. As modificações da epiderme sob a forma de acúmulo de cromatina em algumas células na camada basal foram encontradas imediatamente após a irradiação. Sinais degenerativos tornaram-se mais visíveis em intervalos de 8 a 24 horas, quando o núcleo tornou-se edemaciado e vacuolizado. Entre 15 e 21 dias, a

* Rep-Abreviação de Roentgen Equivalent Physical, que é definido como a absorção do 93 ergs por grama do tecido.

* Trabalho apresentado ao exame de Membro Titular da Sociedade Brasileira de Cirurgia Plástica Estética e Reconstructiva

** Professor Titular da Disciplina de Cirurgia Plástica da FMABC

*** Professor Titular da Disciplina Técnica Operatória e C. Experimental da UNIFESP

**** Professor Adjunto da Disciplina de Bio Estatística da UNIFESP

***** Professor Adjunto da Disciplina de Histologia da UNIFESP

camada basal rompeu em muitas regiões do corpo com o aparecimento de úlceras da pele, algumas das quais não cicatrizaram completamente em três meses.

O derma também apresentou alterações logo depois da irradiação. Ocorreu rompimento de células, edema do colágeno e oclusão de vasos sanguíneos e linfáticos. Em geral, tecidos atingidos pelos raios Beta alteraram-se similarmente aos tecidos tratados por doses comparáveis de raio X.

FRIEDEL, THOMAS e KROHMER (1951) verificaram que o Estrôncio-90 radioativo é a melhor fonte de radiação Beta e foram os primeiros a empregá-lo. A meia vida do elemento é longa (28 anos), e assim evita-se o reabastecimento frequente do equipamento usado. Apresenta energia eficaz, permitindo suficiente penetração nos tecidos. Sua ação não vai além de 8 milímetros de profundidade e o máximo de seu efeito terapêutico está ao redor dos 3 a 4 milímetros.

SETTI (1960 e 1961) apresentou seus resultados com o emprego da radiação Beta do estrôncio-90. Experimentalmente, realizou aplicação no antebraço esquerdo de dois pacientes, em doses únicas que variaram de 90 a 7200 Repts, com a finalidade de investigar as reações cutâneas. A partir de 450 Rep, observou eritema nas primeiras 24 horas. Nas doses mais elevadas notou pápulas e vesículas. As reações regrediram num período de 40 dias sem deixar sequelas. Referiu também bons resultados com o emprego de radiação em doenças oculares.

A radiação Beta do Estrôncio é utilizada como tratamento complementar pós-resssecção de cicatrizes hipertróficas e queloideanas, mas não se encontrou na literatura estudo experimental ou clínico sobre seu efeito na reparação de feridas.

O Serviço de Cirurgia Plástica do Hospital Santa Catarina e Faculdade de Medicina do ABC utilizam a radiação Beta na prática clínica diária, segundo as informações e orientações deixadas por SETTI. Após a ressecção da cicatriz hipertrófica ou queloideana, o tratamento inicia-se no 1º pós-operatório e a programação é para 10 sessões em dias alternados de 250 cGy, perfazendo um total de 2500 cGy.

O objetivo deste trabalho é investigar aspectos histológicos dos efeitos da radiação Beta do Estrôncio-90 na reparação de feridas cutâneas.

MATERIAL E MÉTODO

➤ AMOSTRA

Foram utilizados 24 ratos (*Rattus norvegicus albinus*, *Rodentia mammalia*) da linhagem EPM-1 Wistar*, com 90 dias

de idade e peso individual variando entre 290 e 310 gramas, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de São Paulo - Escola Paulista de Medicina.

Os animais foram distribuídos em 4 grupos de acordo com o tempo pós-operatório de observação : 3º, 7º, 14º e 21º dia.

➤ ANIMAIS E AMBIENTE DE EXPERIMENTAÇÃO

Os animais foram mantidos em gaiolas isoladas por período de 7 dias para adaptação, recebendo alimentação e água "ad libitum".

Os atos operatórios foram realizados no laboratório da Disciplina de Técnica Operatória e Cirurgia Experimental do Departamento de Cirurgia da Universidade Federal de São Paulo-Escola Paulista de Medicina.

➤ DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

A indução anestésica foi feita por inalação, no interior de uma campânula, cuja atmosfera era saturada com éter etílico, até a perda da consciência do animal.

Durante o ato operatório a manutenção foi feita com o mesmo agente em saturação parcial com o ar ambiente, ficando o segmento cefálico no interior de pequena campânula.

O rato foi mantido em decúbito ventral horizontal e suas patas fixadas em uma prancha.

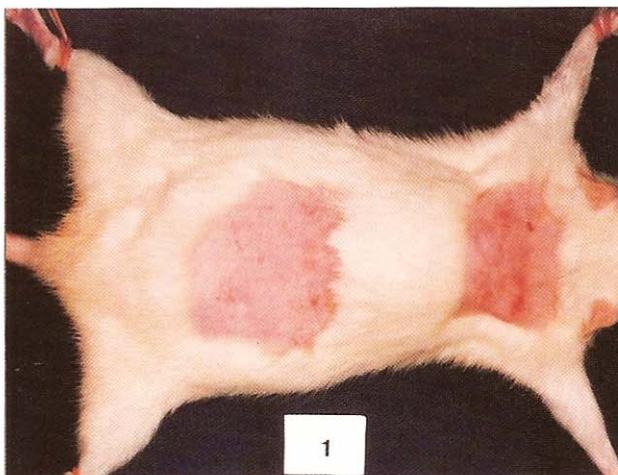


FIGURA 1 - Fotografia onde observa-se as áreas depiladas na região dorsal.

A antissepsia das duas áreas foi feita com álcool iodado a 2% seguida da colocação de campo fenestrado. Em cada local realizou-se, com bisturi de lâmina 15, uma incisão

* Nomenclatura atual do International Index of Laboratory Animals, 4a Ed., 1980, também denominada de colônia 2 BAW (VALLE, 1949).

de 1,5 centímetro de comprimento, cortando a pele na sua espessura total (Figura 2).

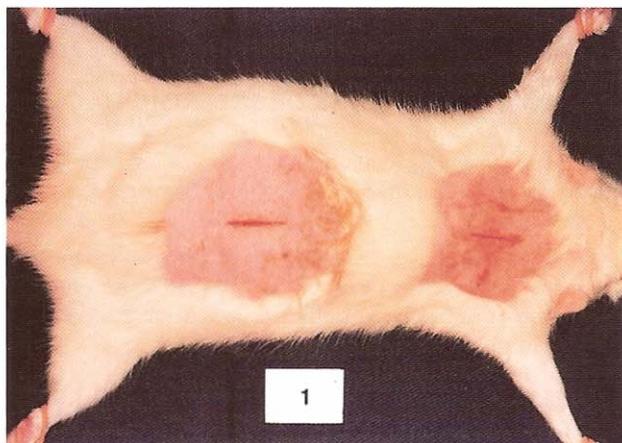


FIGURA 2 - Fotografia onde observa-se as duas incisões realizadas.

A hemostasia foi feita com gaze, por compressão digital, durante aproximadamente, 3 minutos. A pele foi saturada com 3 pontos simples, separados, com fio monofilamentar sintético, não absorvível 6-0 (Figura 3).

Não foram realizados curativos sobre as áreas operadas.

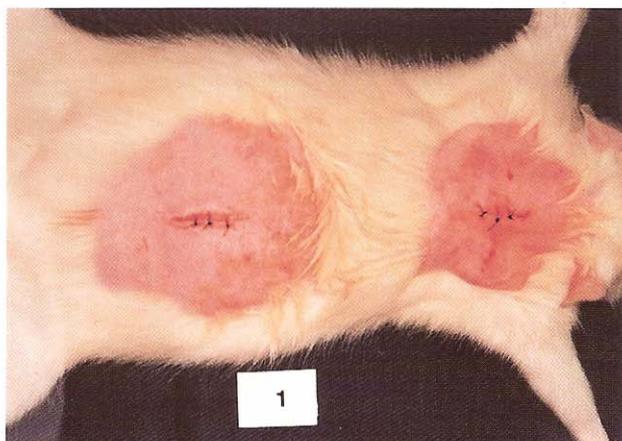


FIGURA 3 - Fotografia onde observa-se as duas feridas suturadas.

➤ PÓS-OPERATÓRIO

Após o ato operatório, os animais foram recolocados em suas respectivas gaiolas, e foram mantidos com alimentação e água semelhantes as do período de adaptação. Os fios foram retirados no 10º dia pós-operatório.

➤ IRRADIAÇÃO

Vinte quatro horas após o ato operatório, os animais foram novamente anestesiados em campânula contendo vapores de éter etílico e a seguir receberam a primeira dose de radiação. Para tanto, utilizou-se uma placa de 1,5 centímetros de diâmetro de Estrôncio-90 com atividade de 50 mci*, atividade medida em outubro de 1985, com energia de penetração de 0,54 milhões de elétron volts (Figura 4).

* mci = milicurie



FIGURA 4 - Fotografia onde observa-se a placa emissora de radiação beta do estrôncio

A dose para cada sessão foi de 250 cGy*, que consiste no contato da placa com a pele por 13,8 segundos. A dose total máxima foi de 2500 cGy. Utilizou-se uma haste protetora auxiliar no manuseio do material radioativo. Para determinar o tempo foi utilizado um cronômetro (Figura 5).

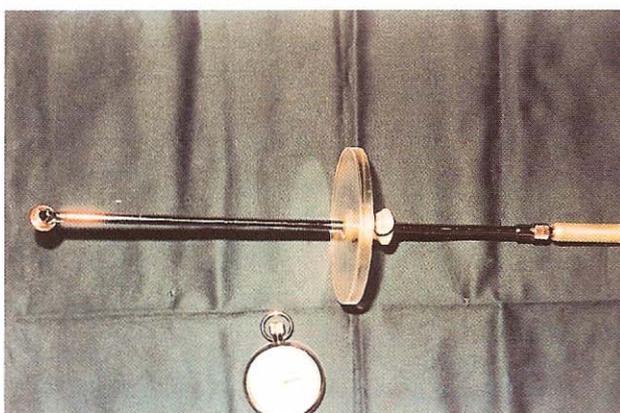


FIGURA 5 - Fotografia onde observa-se a placa emissora de radiação beta do estrôncio-90 na extremidade da haste protetora e o cronômetro utilizado.

cGy (1-cGy = 1 rad)

A frequência de irradiação foi feita a cada 48 horas. Os grupos foram submetidos às doses como se segue:

TEMPO DE OBSERVAÇÃO	FERIDA IRRADIADA Nº	Nº DE DOSE	Nº DE ANIMAIS
3	1 a 6	1	6
7	7 a 12	3	6
14	13 a 18	7	6
21	19 a 24	10	6

➤ ESTUDO HISTOLÓGICO

Nos dias pré-determinados para o sacrifício, os animais foram previamente anestesiados em campânula saturada com vapores de éter etílico.

Um segmento de pele de espessura total de 0,5 centímetros de comprimento por 1,0 centímetro de largura foi retirado das áreas irradiadas e controle, contendo sempre o terço médio da ferida operatória (Figura 6).



FIGURA 6 - Fotografia onde observa-se o terço médio da ferida operatória deslocado para a esquerda (seta), que foi utilizado para microscopia óptica.

Este material foi colocado a 10% durante 24 horas e, em seguida, submetido às técnicas para inclusão em parafina, cortado com micrótomo em espessura de 6 micra e corado pelos métodos de Hematoxilina- Eosina (HE).

Os cortes histológicos foram analisados em microscópio óptico comum, sendo que as feridas irradiadas foram comparadas às de controle aos 3, 7, 14 e 21 dias de pós-operatório.

O estudo morfométrico foi realizado com a utilização de ocular integradora Kpl-10x, fabricação ZEISS, contendo retículo com 25 pontos distribuídos geometricamente. Esta ocular foi acoplada a uma objetiva ZEISS de 100x (com aumento final de 1000 diâmetros).

Observou-se 40 campos em cada lâmina. Foram contados os leucócitos, fibroblastos e fibras colágenas.

➤ ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a análise dos resultados utilizaram-se testes não paramétricos, considerando-se a natureza das distribuições das variáveis estudadas. Aplicaram-se os seguintes testes:

1. Teste de WILCOXON para duas amostras não independentes (SIEGEL,1975), com o objetivo de comparar os números de leucócitos, fibroblastos e fibras colágenas observados na ferida irradiada e controle em cada animal.
2. Análise de variância por postos de KRUSKAL - WALLIS (SIEGEL,1975), quando comparam-se os períodos de 3, 7, 14 e 21 dias em relação aos valores das variáveis acima assinaladas. Esta análise foi aplicada em separado para as feridas irradiada e controle. Quando mostrou diferença significativa foi completada pelo teste de comparações múltiplas (HOLLANDER, 1973).

$$\Delta \% = \frac{\text{controle} - \text{irradiação}}{\text{controle}} \times 100$$

O valor do Δ % para cada uma das variáveis estudadas foi calculado segundo a fórmula:

Em todos os testes fixou-se em 0,05 ou 5% ($\infty \leq 0,05$) o nível para rejeição da hipótese de nulidade, assinalando-se com um asterisco os valores significantes.

RESULTADOS

➤ ANÁLISE HISTOLÓGICA

FERIDAS ANALISADAS NO 3º DIA DE PÓS-OPERATÓRIO:

Controle: Observa-se no epitélio superficial pequena descontinuidade, sendo que as bordas da ferida apresentam insinuações por debaixo de uma crosta que é constituída de fibrina e leucócitos. Abaixo desta área, nota-se infiltrado linfoplasmocitário e, mais profundamente, tecido de granulação rico em macrófagos, vasos sanguíneos e fibras colágenas (Figura 7).

Irradiado: Nota-se no local do corte, epitélio superficial descontínuo recoberto pela crosta. Abaixo desta, observa-se infiltrado linfoplasmocitário. Mais profundamente, o tecido conjuntivo apresenta grande quantidade de vasos dilatados, fibroblastos e macrófagos (Figura 8).

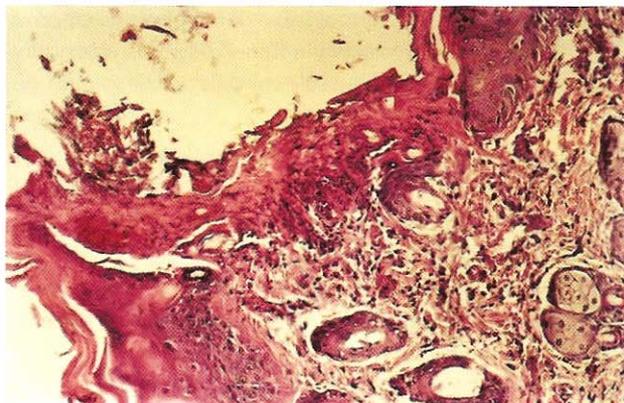


FIGURA 7 - Fotomicrografia de corte histológico de ferida controle no 3º dia de pós-operatório. observa-se descontinuidade no epitélio superficial e presença da crosta fibrino leucocitária. (h.e.720x).

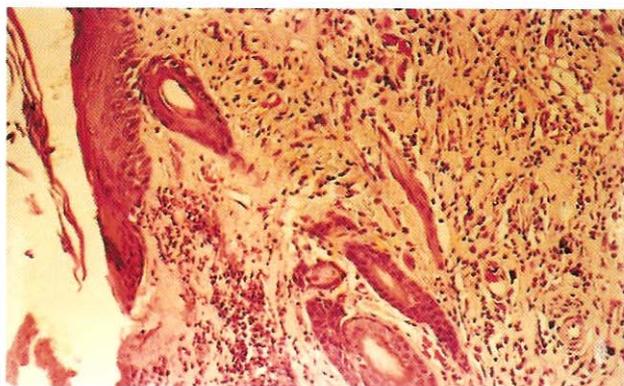


FIGURA 8 - Fotomicrografia de corte histológico de ferida irradiada no 3º dia de pós-operatório. Observa-se descontinuidade no epitélio superficial, infiltrando linfoplasmocitário, vasos dilatados. (h.e.720x).

FERIDAS ANALISADAS NO 7º DIA DE PÓS-OPERATÓRIO:

Controle: Nota-se descontinuidade no leito epidérmico superficial. Nesta área observa-se crosta fibrino-leucocitária. Logo abaixo, na derme, infiltrado linfoplasmocitário e fibras colágenas (Figura 9).

Irradiado: Observa-se descontinuidade no epitélio superficial e, logo acima, crosta de fibrina infiltrada por neutrófilos, mais evidente na parte inferior. As bordas desta área apresentam crescimento epitelial. Abaixo, nota-se tecido de granulação, constituído por fibroblastos e neutrófilos (com celularidade aparentemente menor).

Apresenta escassas fibras colágenas e vasos sanguíneos dilatados (Figura 10).

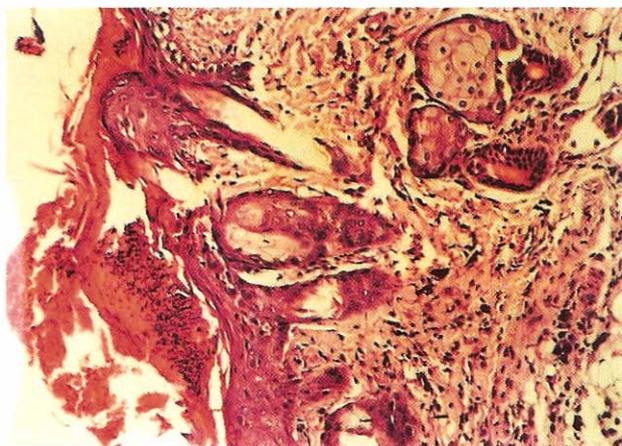


FIGURA 9- Fotomicrografia de corte histológico de ferida controle no 7º dia de pós-operatório. observa-se a presença da crosta infiltrada. (h.e. 720x)

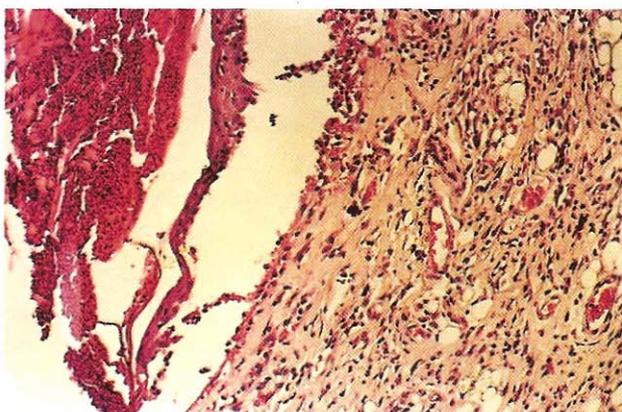


FIGURA 10- Fotomicrografia de corte histológico de ferida irradiada no 7º dia de pós-operatório. observa-se a crosta, brotos epiteliais, tecido de granulação com vasos dilatados. (h.e. 720x)

FERIDAS ANALISADAS NO 14º DIA DE PÓS-OPERATÓRIO

Controle: O epitélio, em alguns cortes, ainda não está refeito e, inferiormente, nota-se tecido conjuntivo ricamente celular, constituído por fibroblastos, fibras colágenas e macrófagos. Logo abaixo da fibrina, apresenta esboço de tecido epitelial (brotos). A parte profunda apresenta-se reparada (Figura 11).

Irradiado: Morfologia semelhante ao controle, aparentemente com menos celularidade e grande concentração de vasos sanguíneos (Figura 12).

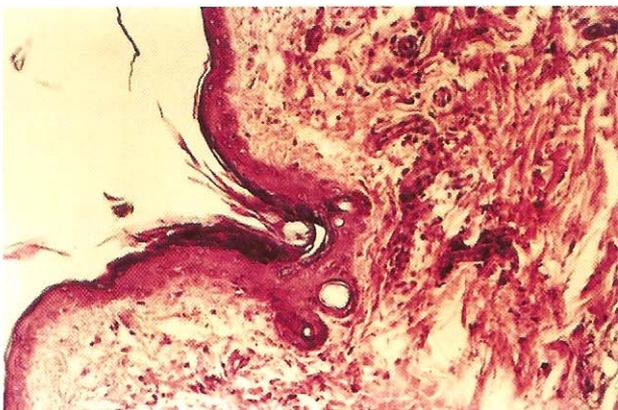


FIGURA 11- Fotomicrografia de corte histológico de ferida controle no 14º dia de pós-operatório. Observa-se logo abaixo da camada superficial, tecido conjuntivo rico em fibroblastos e fibras colágenas. (H.E. 720x).

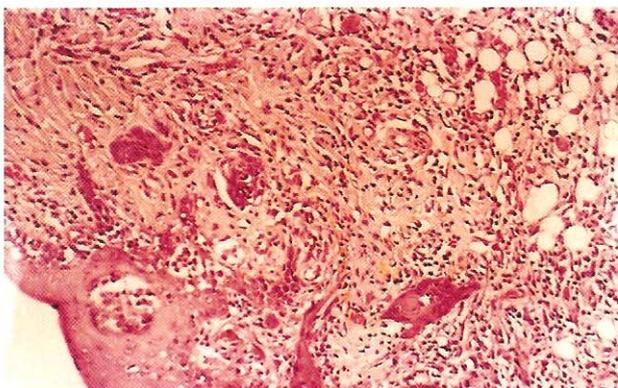


FIGURA 12- Fotomicrografia de corte histológico de ferida irradiada no 14º dia de PO. Observa-se camada superficial refeita e abaixo a presença de infiltrado linfoplasmocitário. Nota-se tecido de granulação contendo vasos sanguíneos dilatados. (H. E. 720x)

FERIDAS ANALISADAS NO 21º DIA DE PÓS-OPERATÓRIO

Controle: Apresenta epitélio estratificado pavimentoso queratinizado e logo abaixo a derme constituída de tecido conjuntivo, rica em macrófagos e leucócitos. Inferiormente a esta área, nota-se tecido conjuntivo denso não modelado (Figura 13).

Irradiado: Área da lesão revestida por epitélio estratificado pavimentoso queratinizado. Em alguns cortes podemos observar crosta fibrino leucocitária. Abaixo desta área, nota-se o tecido conjuntivo, aparentemente com menos celularidade e menos fibroso em relação ao controle. Mais profundamente, observa-se infiltrado linfoplasmocitário e congestão vascular (Figura 14).

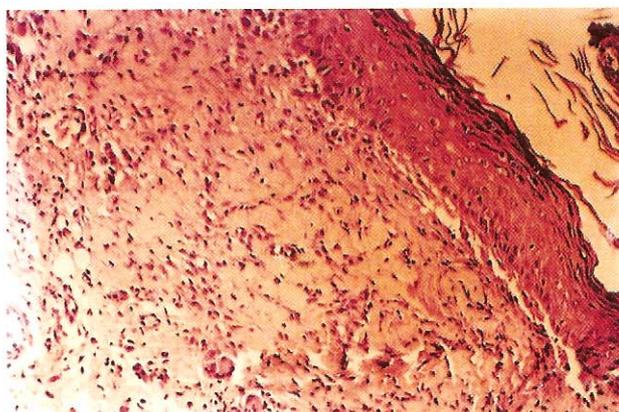


FIGURA 13- Fotomicrografia de corte histológico de ferida controle no 21º dia de pós-operatório. Observa-se epitélio estratificado pavimentoso e derme totalmente refeitos. (H.E. 720x)



FIGURA 14- Fotomicrografia de corte histológico de ferida irradiada no 21º dia de pós-operatório. Observa-se restos da crosta fibrino leucocitária e logo abaixo do epitélio superficial nota-se a presença de vasos sanguíneos dilatados. (H.E.720x)

ANÁLISE ESTATÍSTICA

➤ TABELA I - NÚMERO DE LEUCÓCITOS (EM MIL PONTOS) E VALORES DA DIFERENÇA PERCENTUAL (Δ %) OBSERVADOS EM FERIDAS IRRADIADAS (IRRAD) E EM CONTROLE (CONT) DE RATOS, EM RATOS, EM CADA TEMPO DE OBSERVAÇÃO.

	3 DIAS			7 DIAS			14 DIAS			21 DIAS		
	CONT	IRRAD	Δ%	CONT	IRRAD	Δ%	CONT	IRRAD	Δ%	CONT	IRRAD	Δ%
	35	38	8,57	3	5	66,67	34	35	2,94	29	30	3,45
	38	39	2,63	5	7	40,0	30	37	23,33	28	31	10,71
	37	40	8,11	7	9	28,57	32	38	18,75	27	32	18,52
	36	42	16,67	8	10	25,0	33	36	9,09	26	30	15,39
	35	44	25,71	9	12	33,33	29	35	20,69	25	31	24,0
	35	39	11,43	4	6	50,00	29	35	20,69	24	30	25,0
MÉDIA	36,0	40,0	12,19	6,0	8,2	40,6	31,2	36,0	15,92	26,5	30,7	16,2
R	21,50	21,42	7,83	3,5	3,5	21,25	15,33	15,58	10,33	9,67	9,5	10,58

R= Média da soma dos postos

TESTE DE WILCOXON
(CONTROLE X IRRADIADO)
T CRÍTICO = 0

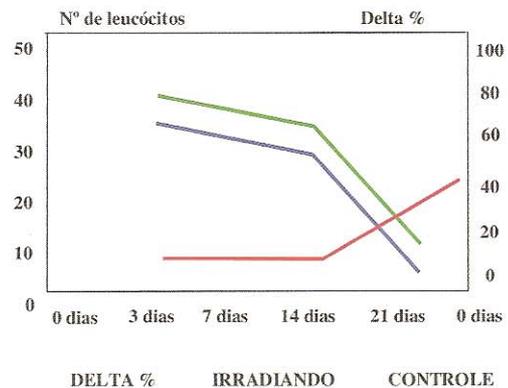
3 dias	7 dias	14 dias
T calculado=0,0*	T calculado=0,0*	T calculado=0,0*

ANÁLISE DE VARIÂNCIA POR POSTOS DE KRUSKAL-WALLIS
(3 DIAS X 7 DIAS X 14 DIAS X 21 DIAS)

H CRÍTICO = 7,82

CONTROLE	IRRADIADO	Δ %
H calculado 21,44	H calculado 21,58	H calculado 21,58
Teste comparações múltiplas	Teste comparações múltiplas	Teste comparações múltiplas
3 dias >14 e 21 dias	3 dias > 14 e 21 dias	21 dias >3>7>14dias
7 dias > 21 dias	7 dias > 21 dias	

Gráfico 1 - N° de leucócitos, valores do delta % observados em feridas de ratos, nos tempos de observação



➤ TABELA II - NÚMERO DE FIBROBLASTOS (EM MIL PONTOS) E VALORES DA DIFERENÇA PERCENTUAL (Δ %) OBSERVADOS EM FERIDAS IRRADIADAS (IRRAD) E EM CONTROLE (CONT) DE RATOS, EM CADA TEMPO DE OBSERVAÇÃO.

	3 DIAS			7 DIAS			14 DIAS			21 DIAS		
	CONT	IRRAD	Δ %	CONT	IRRAD	Δ %	CONT	IRRAD	Δ %	CONT	IRRAD	Δ %
	10	6	40,0	8	16	33,33	12	12	25,0	26	23	11,53
	7	7	0	8	15	38,46	13	10	33,33	20	24	20,0
	9	5	44,44	7	14	30,0	10	12	14,28	23	23	0
	6	5	16,66	8	17	20,0	10	12	29,41	22	20	9,09
	8	6	25,0	7	6	36,36	11	13	18,75	25	19	24,0
	7	7	0	9	1	25,0	12	14	12,5	2	20	9,09
MÉDIA	7,8	6,2	21,0	7,8	15,7	30,5	11,3	12,2	22,2	23,0	21,5	12,3
R	3,67	3,83	12,5	9,17	15,5	17,83	9,33	15,5	12,75	21,5	21,5	6,92

R= Média da soma dos postos

TESTE DE WILCOXON
(CONTROLE X IRRADIADO)
T CRÍTICO = 0

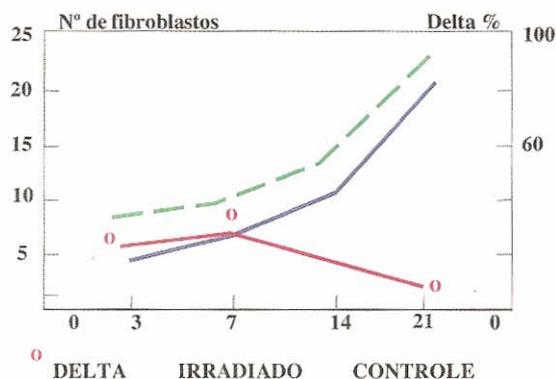
3 dias	7 dias	14 dias
T calculado=0,0* Irrad < Cont	T calculado=0,0* Irrad < Cont	T calculado=0,0* Irrad < Cont

Análise de Variância por postos de KRUSKAL-WALLIS
(3 dias X 7 dias X 14 dias X 21 dias)

H crítico = 7,82

CONTROLE	IRRADIADO	Δ %
H calculado 21,47	* H calculado 21,35	* H calculado 7,20
Teste comparações múltiplas	Teste comparações múltiplas	
21 dias >3 e 7 dias	21 dias > 3 e 7 dias	
14 dias > 3 dias		

Gráfico 2 - N° de fibroblastos valores do Delta % observados em feridas de ratos nos tempos de observação



➤ TABELA III - NÚMERO DE FIBRAS COLÁGENAS (EM MIL PONTOS) E VALORES DA DIFERENÇA PERCENTUAL ($\Delta\%$) OBSERVADOS EM FERIDAS IRRADIADAS (IRRAD) E EM CONTROLE (CONT) DE RATOS, EM CADA TEMPO DE OBSERVAÇÃO.

	3 DIAS			7 DIAS			14 DIAS			21 DIAS		
	CONT	IRRAD	$\Delta\%$	CONT	IRRAD	$\Delta\%$	CONT	IRRAD	$\Delta\%$	CONT	IRRAD	$\Delta\%$
	28	29	3,58	110	118	7,27	130	128	1,53	139	141	1,43
	27	30	11,11	115	116	0,87	137	135	1,45	140	145	3,57
	26	31	19,23	108	117	8,33	136	137	0,73	138	146	5,79
	25	32	28,0	110	118	7,27	138	140	1,44	139	140	0,71
	28	28	0	112	119	6,25	139	141	1,43	141	139	1,41
	25	28	12	115	99	13,91	132	127	3,78	140	139	0,71
MÉDIA	26,5	29,7	12,3	111,7	114,5	7,3	135,3	134,7	1,7	139,5	141,7	2,3
R	3,5	3,5	16,92	9,5	9,5	16,17	15,92	16,5	9,25	21,08	20,5	7,67

R= Média da soma dos postos

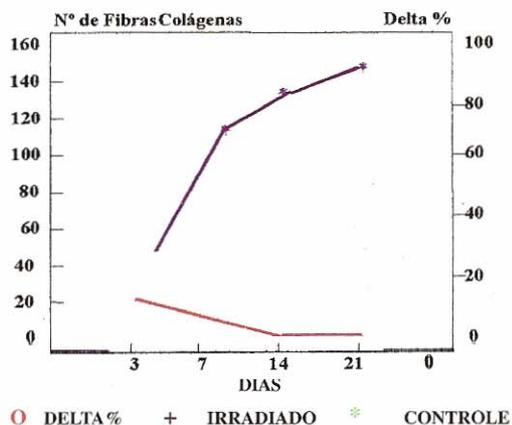
**TESTE DE WILCOXON
(CONTROLE X IRRADIADO)
T CRÍTICO = 0**

3 dias	7 dias	14 dias	21 dias
T calculado = 0,0* Irrad < Cont	T calculado = 6,0	T calculado = 8,0	T calculado = 5,0

**Análise da Variância por postos de KRUSKAL-WALLIS
(3 dias X 7 dias X 14 dias X 21 dias)**

CONTROLE	IRRADIADO	$\Delta\%$
H calculado = 21,13	H calculado = 20,44	H calculado = 8,04
Teste comparações múltipla	Teste comparações múltipla	Teste comparações múltipla
21 dias > 3 e 7 dias	21 dias > 3 e 7 dias	O TESTE NÃO DETECTOU DIFERENÇA SIGNIFICANTE
14 dias > 3 dias	14 dias > 3 dias	

Gráfico 3 - Nº fibras colágenas e valores Delta% observados em feridas de ratos nos tempos de observação



DISCUSSÃO

As substâncias radioativas produzidas com o desenvolvimento da bomba atômica passaram a ser estudadas, e seus efeitos pesquisados experimentalmente em tecidos biológicos.

A radiação Beta do Estrôncio-90 tem sido utilizada na profilaxia e tratamento complementar pós ressecções de cicatrizes hipertróficas e queiloideanas. As dúvidas no uso da clínica e a literatura escassa sobre o assunto, nos levou a desenvolver um trabalho experimental controlado para avaliar alguns aspectos da radiação Beta nas feridas operatórias.

Usou-se o rato para o experimento, devido à facilidade de manipulação, obtenção e por apresentar baixa contaminação na pele e resistência às infecções operatórias. Utilizou-se somente machos pois não apresentam variações hormonais em relação às fêmeas. Não encontrou-se modelo similar na literatura.

A frequência em dias alternados foi escolhida por corresponder ao que se realiza na clínica diária em nosso Serviço. O mesmo rato apresentava ferida controle e irradiada, com o propósito de afastar as variações individuais.

Efetuuou-se a depilação por tração manual com manobra biodigital, que é de fácil execução e menos traumática em relação aos instrumentos laminados.

Usou-se o éter etílico como agente anestésico, pois é de fácil obtenção, manuseio e o animal se recupera rapidamente de seu efeito.

Realizou-se a incisão com lâmina de bisturi nº.15 cortando a pele em sua espessura total, nas duas áreas previamente preparadas da região dorsal de aproximadamente 1,5 centímetros, pois este comprimento corresponde ao diâmetro da placa emissora do Estrôncio-90 e, por isso, confirma-se que toda ferida seria irradiada.

Usou-se o fio monofilamentar sintético não absorvível 6-0 por ser fino e provocar pequena agressão ao tecido, com três pontos simples separados, caracterizando uma ferida fechada. Não se realizou curativo, pois é muito difícil mantê-lo neste animal. Após o ato operatório, os ratos foram colocados em gaiolas individuais, evitando-se que um animal traumatizasse a ferida do outro.

Os grupos de seis ratos foram operados no mesmo dia, pois desta maneira, receberiam as radiações no mesmo intervalo de tempo.

A irradiação foi feita com os animais previamente anestesiados pela inalação do éter etílico em campânula. Um auxiliar segurava o rato e o pesquisador realizava a aplicação.

A análise do processo de reparação foi realizada em dias de pós-operatórios pré-determinados (3º, 7º, 14º e 21º dia), baseados em SIMÕES, UZUNIAN, MORA, SASSO (1985).

BARONCELLI, MAGNO E TUNESI (1962), estudando os diferentes diâmetros das placas e os campos emanados da radiação Beta do Estrôncio-90, fazem supor que a região central com maior eficácia. Por isso, a colheita do segmento de pele para estudo histológico foi realizada ressecando a parte média da ferida (0,5 centímetro de comprimento por 1,0 centímetro de largura).

A radiação Beta do Estrôncio-90 utilizada no experimento é de fácil manuseio, não exigindo treinamento e proteção especial. Com o auxílio de uma haste flexível que se encaixa no segmento central da placa radiativa, que fica acondicionada em uma câmara de chumbo, o pesquisador a coloca em contato com a pele sobre a ferida e aciona o cronômetro.

A meia vida do Estrôncio-90 é de 28 anos, por isso, periodicamente deve-se fazer a correção em relação ao decaimento radiativo. Na época do experimento, para uma dose de 250 cGy, deveria a placa emissora ficar em contato com a pele por 13,8 segundos.

SNIDER & RAPER (1951) relataram que 2500 cGy, provocaram alterações na fisiologia e reparação da pele de ratos.

RAPER, ZIRKLE e BARNES (1951), FRIEDEL e col. (1951), LENTINO, ZARET, ROSSIGNOL (1959), ELLIOT (1959), descreveram as propriedades da radiação Beta quanto à profundidade de penetração na pele. A porcentagem da dose na superfície de foco é de 100%; a um milímetro de profundidade já cai para 50% e a quatro milímetros já está em 6%, fazendo supor que, na pele do rato, haveria ação da radiação.

SETTI (1960) afirmou que as células são mais sensíveis na fase pré-mitótica, sugerindo aplicações repetidas em determinados intervalos para atingí-las na divisão; por isso utilizou-se o fracionamento em dez sessões de 250 cGy, em dias alternados.

O experimento representa o que se faz na clínica diária pós ressecção de cicatrizes hipertróficas e queiloideanas no nosso Serviço. O seu estudo forneceu dados sobre a reparação tecidual, pois o rato não apresenta essas alterações na cicatriz. Nenhuma ferida apresentou deiscência ou infecção local.

No ser humano não se recomenda a frequência diária de aplicações para se evitar a hiperpigmentação da pele irradiada.

Os resultados da microscopia foram analisados comparando-se a ferida controle com a irradiada. A morfometria forneceu dados que foram submetidos à análise estatística.

➤ ANÁLISE MICROSCÓPICA

O acompanhamento da seqüência microscópica óptica da ferida controle do experimento, demonstra o processo de reparação tecidual cutâneo, com as fases de inflamação, proliferação e maturação, documentadas por SIMÕES e col. (1985) em trabalho experimental com ratos, onde observaram essas fases por meio de microscopia eletrônica de transmissão.

No terceiro dia de pós-operatório da ferida controle, é evidente a reação inflamatória com infiltrado linfoplasmocitário, vasos e a crosta fibrino leucocitária, confirmando a descrição de TEVES, CABRAL, SIMÕES, KULAY JUNIOR (1986). Na ferida irradiada nota-se morfologia semelhante, porém verifica-se grande quantidade de vasos dilatados.

Aos 7 e 14 dias de pós-operatório da ferida controle, observa-se a fase proliferativa. O epitélio ainda não está totalmente refeito e o conjuntivo apresenta muitos macrófagos, fibroblastos e fibras colágenas. A ferida irradiada apresenta morfologia semelhante, porém diminuição da celularidade e vasos sanguíneos dilatados.

Aos 21 dias de pós-operatório da ferida controle, a área da lesão já está revestida pelo epitélio estratificado pavimentoso e o tecido conjuntivo é rico em fibroblastos e fibras colágenas. SIMÕES e col. (1985) relataram em seu trabalho a importância do fibroblasto como regulador do mecanismo de reabsorção do colágeno. A ferida irradiada apresenta morfologia semelhante, mantendo acentuada vasodilatação.

LUSHBAUGH, STORER, HALE (1953) observaram, microscopicamente, o processo de reparação da radiodermatite ulcerativa provocada na pele abdominal de ratos pelos raios Beta do Fósforo-32 e Estrôncio-90. A regeneração do epitélio e a fibroplastia na parte mais profunda, ocorreram 15 a 20 dias após o aparecimento da lesão.

BISHOP (1954), em estudo comparativo sobre os efeitos do raio X e Beta em coelhos, verificou que as alterações da pele provocadas pela irradiação, observadas à microscopia óptica, são semelhantes.

PRADO (1981), em seu trabalho sobre a ação dos raios X no processo de reparação tecidual da pele de ratos, revelou que existiu diferença no número de fibroblastos e fibras colágenas, tendo sido sempre maior no grupo controle em relação ao irradiado.

TABACHNICK & WEISS (1959), realizaram trabalho experimental com radiação Beta do Estrôncio-90 (dose única de

3000 Rep) na pele de porcos. Relataram a diminuição dos ácidos nucleicos (DNA e RNA) dosados na epiderme.

FUKUYAMA, BERNSTEIN, CURTIS (1959), em experimento com ratos utilizando radiação Beta do Fósforo-32, verificaram que doses acima de 80 mci/min* (milicurie/minuto) provocaram diminuição na atividade mitótica das células da epiderme.

BARENDESEN (1962) relatou em seu trabalho com células humanas em cultura a inibição dos clones por raios Alfa, Beta e X em doses diferentes.

Verificou-se que a radiação provocou uma diminuição da celularidade, mas permitiu que a reparação do epitélio e derme se completassem aos 21 dias. A observação microscópica ofereceu melhor interpretação quantitativa da celularidade quando feito o estudo morfométrico.

➤ ESTUDO MORFOMÉTRICO

Utilizou-se a morfometria para melhor análise dos resultados relativos às estruturas teciduais estudadas no processo de reparação aos 3, 7, 14 e 21 dias de pós-operatório.

O número de leucócitos (em mil pontos) foi maior na ferida irradiada em relação ao controle.

O número de fibroblastos (em mil pontos) da ferida irradiada foi menor que o controle.

De maneira geral o número de fibras colágenas apresentou contagem semelhante entre a ferida irradiada e controle. Com relação à morfometria das fibras colágenas, deve ser ressaltado que na realidade quantifica-se o colágeno e não a contagem numérica das fibras.

Verificou-se que a morfometria permitiu o estudo da alterações em número de leucócitos, fibroblastos e fibras colágenas provocadas pela radiação Beta do Estrôncio-90.

➤ ANÁLISE ESTATÍSTICA

A morfometria forneceu dados objetivos, de natureza quantitativa, o que permitiu a aplicação de testes estatísticos.

Ao analisar-se a Tabela I e Gráfico 1 verifica-se que:

1) A irradiação provocou um aumento significativo no número de leucócitos nos quatro tempos estudados.

2) O número de leucócitos da ferida controle e da irradiada aos 3 dias foi significativamente maior do que aos 14 e 21 dias.

3) O número de leucócitos da ferida controle e da irradiada foi significativamente maior aos 7 do que aos 21 dias.

4) O número de leucócitos da ferida controle e da irradiada decresceu significativamente com o passar do tempo.

5) A diferença percentual ($\Delta\%$) calculada a partir da ferida irradiada e da controle no 21º dia, foi significativamente maior do que a observada no 3º, 7º e 14º dias, sugerindo efeito tardio da radiação.

A Tabela II e o Gráfico 2 permitem afirmar que:

1) A radiação provocou um decréscimo significativo no número de fibroblastos aos 3, 7 e 14 dias do experimento.

2) O número de fibroblastos da ferida controle e da irradiada aos 21 dias foi significativamente maior do que aos 3 e 7 dias.

3) O número de fibroblastos da ferida controle e da irradiada aos 14 dias foi significativamente maior do que aos 3 dias.

4) Embora pelo tamanho, o teste de comparações não tenha detectado diferença significativa, os valores do $\Delta\%$ sugerem que o decréscimo no 21º dia seja menor do que o observado nos 3º e 7º dias.

Em relação à Tabela III e ao Gráfico 3 verifica-se que:

1) A ferida irradiada apresentou aumento das fibras colágenas em relação ao controle significativo apenas no 3º dia. Nos demais períodos, o tamanho da amostra não permitiu rejeitar a hipótese de igualdade entre as duas situações.

2) O número de fibras colágenas da ferida controle e da irradiada, aos 21 dias, foi significativamente maior do que aos 3 e 7 dias.

3) O número de fibras colágenas da ferida controle e da irradiada, aos 14 dias foi significativamente maior do que aos 3 dias.

4) O teste de comparações múltiplas em relação ao $\Delta\%$ não detectou diferença significativa, pois o tamanho da amostra não permitiu. Os resultados sugerem que as diferenças percentuais entre a ferida irradiada e a controle do 14º e 21º dia foram menores do que as do 3º dia.

A análise estatística foi muito importante pois forneceu informações precisas sobre a composição numérica das estruturas estudadas e permitiu formular as conclusões deste trabalho.

CONCLUSÕES

Ao analisar-se os resultados da pesquisa, conclui-se que a radiação Beta do Estrôncio-90:

1) Provocou aumento no número de leucócitos.

2) Reduziu o número de fibroblastos.

3) Não alterou o número de fibras colágenas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BARENSEN, G.W. - Dose-survival curves of human cells in tissue culture irradiated with alfa-,beta-, 20-Kv. X- and 200-Kv. X- radiation. *Nature*, 193:1153-5,1962.
2. BARONCELLI, G; MAGNO, L; TUNESI, G. - La posizione dello stronzio 90 nella radioterapia di contato: proprietà fisiche, modalità tecni-che d'impiego, indicazioni cliniche *Radiol. Med.*,48:635-62,1962.
3. BISHOP, F.W: Comparison of X- and beta-radiation effects in rabbits. In: Blair,HA-Biological effects of external. 1ªed.New York,Mcgraw-Hill Book Company, 1954,p.194- 203.
4. ELLIOT,R. - A method of beta particle treatment. *Trans. Ophthalmol.Soc.* 2 11:32-40,1959.
5. FRIEDEL, H.L; THOMAS,C.I; KROH-MER,J.S. - Description of an Sr⁹⁰ be-ta-ray applicator and its use on the eye. *Am. J. Toentgenol. Radium Ther.*, 65:232-44,1951.
6. FUKUYAMA, K.; BERNSTEIN, I. .A.; CURTIS, A. C. - Effect of beta-radiation on mitotic activity in the skin of the young rat. *J.Invest.Dermatol.*, 32: 39-42,1959.
7. HOLLANDER, M. & WOLFE, D. A. - Non parametric statistical methods. New York,Wiley, 1973. 503p.
8. LENTINO,W; ZARET,M.M; ROSSIGNOL,B; RUBENFELD,S.- Treatment of pterygium by surgery followed by beta radiation. *Am J. Roentgenol*,81-93-8,1959.
9. LUSHBAUGH,C.C; STORER,J.B; HALE D.B. - Experimental acute radioder-matitis following beta radiation: I. Its pathogenesis and repair. *Cancer*, 6:671-7,1953.
10. PRADO,M.A.S. - Aspectos morfológicos e morfométricos do processo de reparação da pele de ratos albinos, após a ação dos raios X. São Paulo 1981.48p. [Tese-Mestrado- Universidade Federal de São Paulo- Escola Paulista de Medicina].
11. RAPER, JR; ZIRKLE,R.E; BARNES,K.K. - Techniques of external irradiation with beta radiation. 1.ed. New York,Mcgraw-Hill Book Company 1951.p.1-41.
12. SETTI,R.I. - Atualização do emprego do emprego do

- estrôncio-90 em oftalmologia. Arq. Bras. Oftalmol., 23: 91-103,1960.
13. SETTLER, R.I. - Resultados obtidos com o aplicador do estrôncio-90, em lesões oftalmológicas, em mais de seis meses de observações. Arq. Bras. Oftalmol., 24:174-83,1961.
14. SIEGEL, S. - Estadística no paramétrica. México, Ed. Trillas, 1975. 346p.
15. SIMÕES, M.J; UZUNIAN, A; MORA, O. A; SASSO, W.S. - Aspectos ultra-estruturais do processo de reparação da pele de ratos albinos. Rev. Paul. Med., 103:123-6, 1985.
16. TABACHNICK, J & WEISS, C: - Bio chemical changes in beta-irradiated epidermis of guinea pigs. Radiat. Res., 11: 684-99, 1959.
17. TEVES, D.C; CABRAL, A.C.V; SIMÕES, M. J; KULAY JR, L. - Biologia da reparação tecidual. J. Bras. Med., 50: 39-44, 1986.

PEREIRA FILHO, G.V. - Histologic and morphometric study on the healing of skin wounds in rats submittid to Beta irradiation of Stroncium-90.

SUMMARY - The purpose os this work is to investigate the effects of Beta radiation of Stroncium-90 for reaping the tissue of wounds made in rats.

We used 24 animals of the lineage EPM-1 Wistar, distributed in four groups. That received radiation in alternate days, and analysed in the 3rd, 7th, 14th and 21 st day after operation.

Two incisions were made in the back of the animal and sutured immediately afterwards; the upper part was irradiated and the lower part used as control.

On the dates established the irradiated and control wounds were macroscopically examined and withdrawn for preparation of the hystological comparative study in the optical microscope. Follwing, a morphometrical analysis was performed to count leucocyts, fiberblast and colagens fibers which were submitted to statistical study.

When analysing the results we reached the conclusion that, as a rule, the Beta radiation of Stroncium-90 promoted an increase in the number of leucocyts, a decrease in the number of fiberblasts and did not alter the number of collagen fibers when compared to the irradiated and control wound during the time used for the experiment.

SUBJECT HEADINGS: Wound healing - Cicatrix - Radiation
