ESTUDO MORFOLÓGICO DO EFEITO RADIOPROTETOR DA VITAMINA E (DL-ALFA-TOCOFERIL) NA REPARAÇÃO TECIDUAL EM RATOS*

Flávio Ricardo Manzi[1], Frab Norberto Bóscolo[2], Solange Maria de Almeida[3], Fabricio Mesquita Tuji[4]

Resumo **Esta pesquisa teve por finalidade avaliar a ação da vitamina E como radioprotetora no processo de reparação tecidual em ratos, após sofrerem um procedimento cirúrgico, que consistiu da produção de uma ferida na região dorsal anterior. Os animais foram divididos em cinco grupos: grupo CO (controle) – constituído de animais em que foi produzida somente a ferida; grupo VE – pré-tratamento com vitamina E (90 UI); grupo IR – irradiação três dias após a cirurgia; grupo VEIR – pré-tratamento com 90 UI de vitamina E e irradiação de suas bordas três dias após a cirurgia; grupo OIR – pré-tratamento com óleo de oliva e irradiação de suas bordas três dias após a cirurgia. A ação radioprotetora da vitamina E foi avaliada pela coloração por hematoxilina-eosina para análise morfológica do tecido de granulação, aos 4, 7, 14 e 21 dias após a cirurgia. A análise dos resultados mostrou que o retardo no processo de reparação tecidual causado por 6 Gy de radiação de elétrons com feixe de 6 MeV não ocorreu no grupo de animais que recebeu vitamina E, mostrando-se esta substância efetiva como radioprotetora.**

Unitermos: Vitamina E; Radioprotetor; Radicais livres; Radiação ionizante; Reparação tecidual.

Abstract *Morphological study of the radioprotective effect of vitamin E (dl-alpha-tocopheril) in tissue reparation in rats.* **The purpose of this work was to evaluate the action of the vitamin E as a radioprotective agent in the process of tissue reparation in rats submitted to a surgical procedure, which consisted of a wound done in the fore dorsal area. The animals were divided into five groups: group C (controls) – wound; group VE – previous treatment with vitamin E (90 UI); group IR – wound and irradiation of the borders three days after surgery; group VEIR – previous treatment with 90 UI of the vitamin E and irradiation of the borders three days after the surgery; group OIR – previous treatment with olive oil and irradiation of the borders three days after surgery. The radioprotective effect of the vitamin E was evaluated using hematoxylin-eosin stained specimens in order to identify granulation tissue, at 4, 7, 14 and 21 days after the surgical procedures. The results showed that 6 Gy of electron irradiation with a beam of 6 MeV caused retardation of the tissue repairing process and that vitamin E was effective as a radioprotective agent.**

Key words: Vitamin E; Radioprotective; Free radicals; Ionizing radiation; Tissue reparation.

INTRODUÇÃO

A radiação ionizante, usada com finalidade terapêutica em pacientes portadores de neoplasias, pode causar alta porcentagem de complicações, como injúrias nas células normais adjacentes à massa tumoral. Existe uma preocupação por parte dos profissionais em diminuir os efeitos deletérios das radiações ionizantes. Assim, na radioterapia há uma crescente utilização dos aceleradores lineares, que produzem feixes de elétrons altamente colimados, e por ser possível determinar a energia dos feixes de radiação, torna-se fácil controlar sua profundidade de penetração. Atualmente, também se faz o uso das técnicas de planejamento em 3D e radioterapia com intensidade modulada (IMRT – "intensity modulated radiotherapy"), que é uma tecnologia avançada de radioterapia. O objetivo de todos os tratamentos radioterápicos é danificar ao máximo as células tumorais e ao mesmo tempo causar um mínimo de dano às células normais. Os aparelhos de IMRT controlam melhor o feixe de radiação do que os aparelhos convencionais, provocando, assim, o mínimo de danos às células normais.

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

Os danos causados quando da absorção da radiação pelos tecidos vivos são decorrentes de reações físico-químicas que levam à produção de radicais livres. O efeito prejudicial da radiação pode estar relacionado ao início da peroxidação de lipídios por esses radicais, processo ocorrido principalmente dentro da membrana celular com alta concentração de ácidos graxos poli-insaturados. Como as membranas microssomais e mitocondriais apresentam

---

* Resumo de Tese de Mestrado em Radiologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas (FOP-Unicamp), Piracicaba, SP.

1. Professor de Radiologia Odontológica da Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais, Mestre e Doutorando em Radiologia Odontológica da FOP-Unicamp, Radiologista Odontológico do Centro de Tomografia Computadorizada da Santa Casa e do Hospital dos Fornecedores de Cana de Piracicaba.

2. Professor Titular de Radiologia Odontológica da FOP-Unicamp.

3. Professora Livre-Docente de Radiologia Odontológica da FOP-Unicamp.

4. Professor de Radiologia Odontológica da Universidade Federal do Pará, Mestre e Doutorando em Radiologia Odontológica da FOP-Unicamp.

Endereço para correspondência: Dr. Flávio Ricardo Manzi. Avenida Paes de Barros, 1340, ap. 62, Mooca. São Paulo, SP, 03114-000. E-mail: manzi@pucminas.br

Recebido para publicação em 22/8/2002. Aceito, após revisão, em 22/4/2003.

grande quantidade de ácidos graxos, elas são mais suscetíveis à peroxidação lipídica, tendo como conseqüências a perda de sua integridade e a diminuição no funcionamento celular[1–8].

Os radioprotetores têm a propriedade de proteger o tecido vivo, diminuindo os danos a ele causados pela radiação. Sua ação é decorrente da ligação química entre essas substâncias e os radicais livres produzidos pela radiação, impedindo os efeitos danosos[1,4–20].

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

MATERIAIS E MÉTODOS

Foram utilizados 100 ratos machos (*Rattus norvegicus*, albinos, Wistar), com idade aproximada de 60 dias, pesando entre 200 e 250 g, mantidos da fase pré-operatória até o sacrifício em gaiolas apropriadas, com temperatura e umidade controladas, ração balanceada e água *ad libitum*.

Em toda a amostra foi realizada uma ferida de 2,5 cm × 1,5 cm na região dorsal anterior dos animais, a 10 mm da espinha dorsal, com profundidade aproximada de 2 mm, tendo o tecido muscular como base da ferida.

A amostra foi dividida, de forma aleatória, em cinco grupos:

Grupo controle (CO) – Constituído por animais que sofreram somente o procedimento cirúrgico.

Grupo vitamina E (VE) – Caracterizado por animais que receberam três doses de acetato de dl-alfa-tocoferil (vitamina E), via intraperitoneal. Cada dose continha 90 UI, diluídas em 1 ml de óleo de oliva. As doses foram administradas com intervalos de 48 horas, e um dia após receberem a última dose os animais sofreram o procedimento cirúrgico.

Grupo irradiado (IR) – Constituído por animais que, três dias após o procedimento cirúrgico, tiveram uma região correspondente a 10 mm, lateralmente a cada borda da ferida, irradiada com dose única de 6 Gy de um feixe de elétrons com energia de 6 MeV e distância alvo–fonte de 100 cm. Durante o procedimento, com exceção da região citada, todo o corpo do animal, incluindo a ferida, foi protegida com avental de chumbo de 4 mm de espessura.

Grupo vitamina E/irradiado (VEIR) – Os animais deste grupo sofreram o mesmo procedimento terapêutico citado para o grupo VE e o mesmo procedimento de irradiação do grupo IR. Portanto, os animais receberam a vitamina E e foram irradiados.

Grupo óleo de oliva (OIR) – Caracterizou-se por animais que receberam três injeções de 1,0 ml de óleo de oliva, via intraperitoneal, com intervalo de 48 horas, e também, como no grupo VE, um dia após receberem a última dose, sofreram o procedimento cirúrgico e, finalmente, suas bordas foram irradiadas após três dias, como o grupo IR.

RESULTADOS

No quarto dia os animais dos grupos CO, VE e VEIR apresentaram extensa área da ferida sendo coberta por uma crosta de material necrótico protegendo o tecido de granulação incipiente. Este tecido apresentava poucos fibroblastos, muitas células redondas, predominantemente linfócitos, observando-se o início de neoformação vascular e fibras colágenas incipientes. Já a área da ferida dos grupos IR e OIR mostrava-se mais extensa, coberta por uma crosta mais espessa, com o tecido de granulação bastante recém-formado, mostrando menor quantidade de células e fibras em relação aos grupos supracitados, sugerindo um tecido altamente desorganizado.

No sétimo dia o tecido de granulação apresentava-se típico, celular, com maior concentração de fibroblastos e neoformação vascular. Nos grupos IR e OIR, porém, observaram-se predominantemente células redondas, indicando atraso na formação do tecido de granulação. O grupo VE mostrou-se mais adiantado que o grupo CO, cujos vasos neoformados apresentavam hemácias no seu interior, revelando, portanto, indícios de funcionamento. O tecido de granulação dos animais do grupo VEIR estava semelhante ao dos animais do grupo CO (Figuras 1 a 5).

No 14º dia de reparação tecidual, nos animais dos grupos CO, VE e VEIR o tecido de granulação apresentava-se bastante fibroso. O epitélio recobria a ferida, sendo que nos animais do grupo VE o processo ainda se mostrava adiantado em relação ao grupo CO, pois este se apresentava mais delgado e com diminuição de acantoses. Nos grupos IR e OIR o epitélio mostrou-se desorganizado e o tecido de granulação bastante celular, sendo que a ferida do grupo OIR não estava totalmente recoberta pelo epitélio, enquanto a ferida do grupo VEIR apresentava-se semelhante à do grupo CO (Figuras 6 a 10).

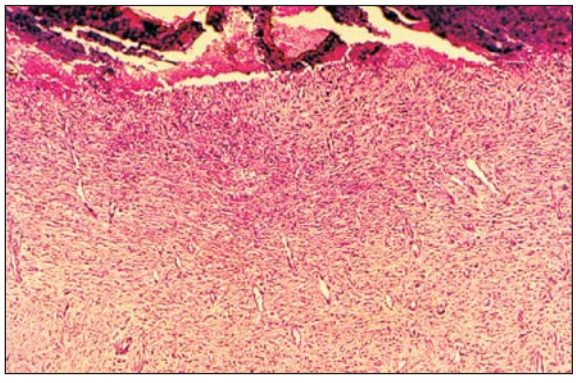

Figura 1. Grupo CO – sete dias de reparação tecidual.

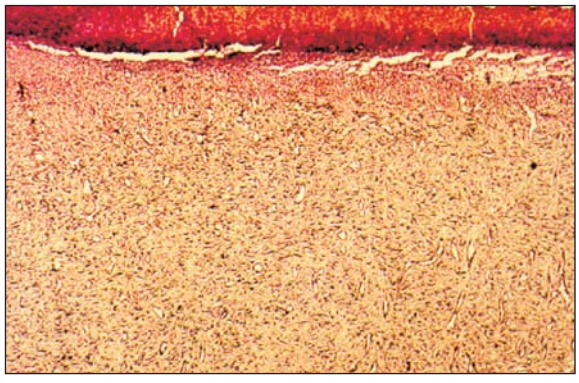

Figura 2. Grupo VE – sete dias de reparação tecidual.

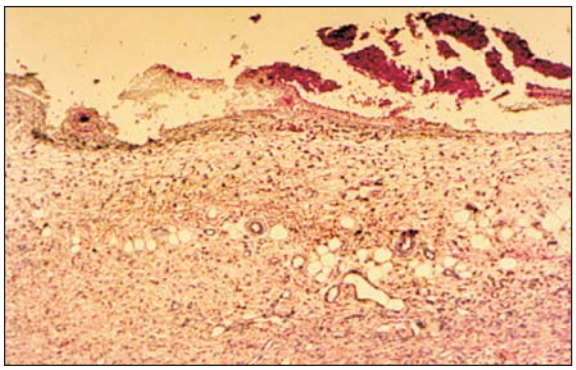

Figura 3. Grupo IRR – sete dias de reparação tecidual.

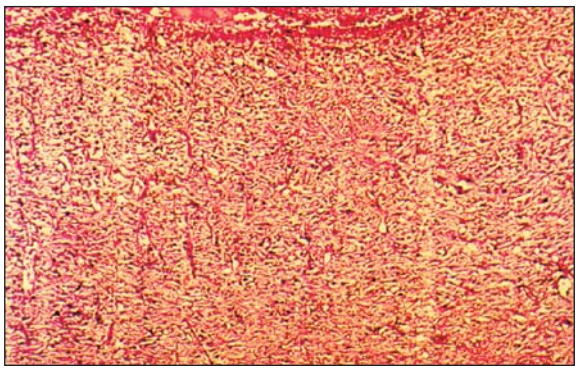

Figura 4. Grupo VEIR – sete dias de reparação tecidual.

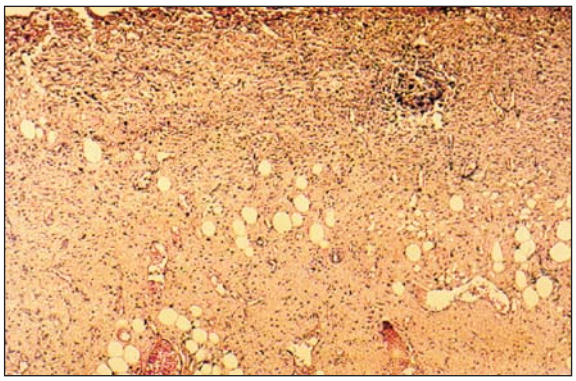

Figura 5. Grupo OIR – sete dias de reparação tecidual.

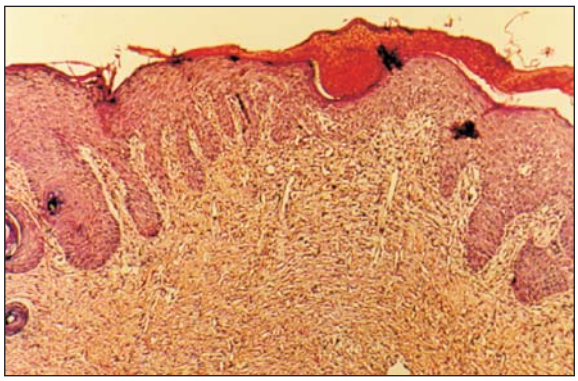

Figura 6. Grupo CO – 14 dias de reparação tecidual.

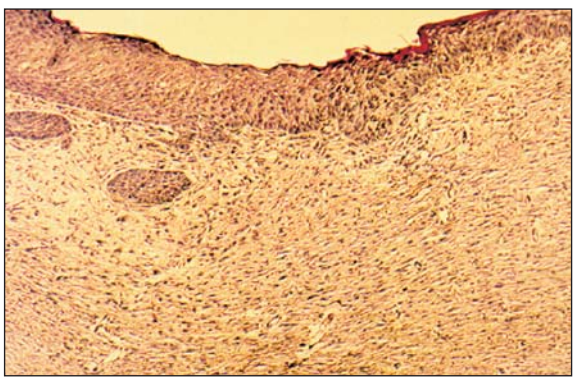

Figura 7. Grupo VE – 14 dias de reparação tecidual.

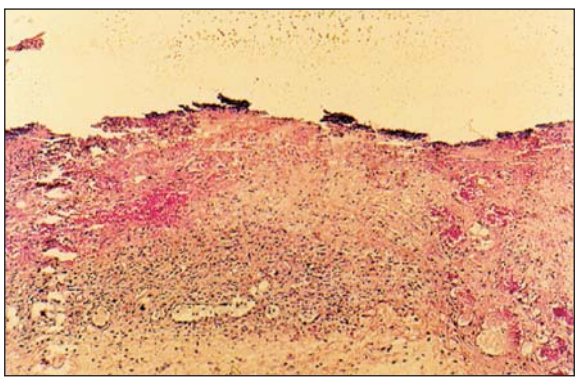

Figura 8. Grupo IRR – 14 dias de reparação tecidual.

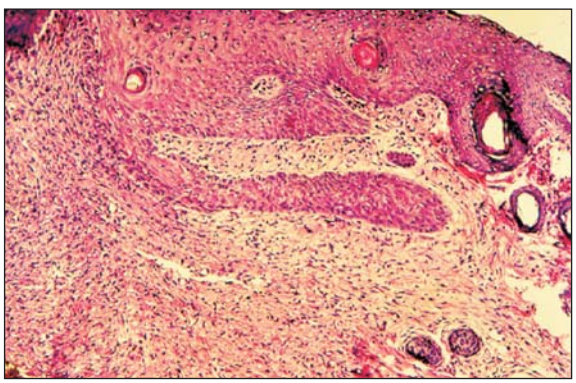

Figura 9. Grupo VEIR – 14 dias de reparação tecidual.

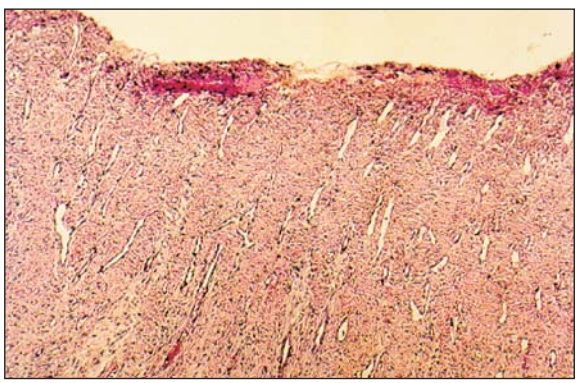

Figura 10. Grupo OIR – 14 dias de reparação tecidual.

No 21º dia a ferida nos grupos CO, VE e VEIR apresentava-se cicatrizada, visto que o tecido de granulação estava bastante fibroso e o epitélio delgado, queratinizado, visualizando-se a presença dos anexos da pele. Os grupos IR e OIR ainda se mostravam atrasados, com tecido de granulação bastante celular e o epitélio com ausência de queratina e anexos da pele.

DISCUSSÃO

Comparando-se o grupo CO com os animais que sofreram apenas o tratamento prévio de vitamina E (grupo VE), observou-se que o grupo VE apresentava-se mais adiantado. Isto sugere que a vitamina E favorece, de alguma maneira, o processo de reparação tecidual. Segundo Marcus e Coulston[21], a propriedade antioxidante da vitamina E é a característica mais importante dos tocoferóis, sabendo-se que esta impede a oxidação de constituintes essenciais dos tecidos, como a ubiquinona (coenzima Q), ou impede a formação de produtos tóxicos da oxidação, como os produtos da peroxidação formados a partir de ácidos graxos insaturados, ou seja, os radicais livres. Como a produção da ferida está associada à produção de radicais livres, devido ao estresse oxidativo, a vitamina E exerce a sua propriedade de antioxidante.

Analisando-se o efeito radioprotetor da vitamina E no grupo VEIR, observou-se que não houve diferença morfológica no processo de reparação quando comparado ao grupo CO em todos os períodos avaliados. No entanto, o grupo VEIR mostrou-se mais adiantado em relação aos grupos IR e OIR, podendo-se afirmar que a vitamina E, na forma de dl-alfa-tocoferil, teve efeito radioprotetor no processo de reparação tecidual, mesmo ligando-se a uma maior quantidade de radicais livres produzidos pelo ferimento e posteriormente pela irradiação.

Felemovicius *et al.*[4] discutem, em seu trabalho, que os efeitos da radiação ionizante são mediados principalmente por radicais livres de oxigênio gerados da interação da radiação com a molécula da água. Essas moléculas de oxigênio resultantes contêm um elétron não-pareado na última órbita da eletrosfera, com capacidade de induzir injúrias, sendo altamente reativo. Essas reações oxidantes removem átomos de hidrogênio dos ácidos graxos, causando a peroxidação lipídica, gerando mudanças na permeabilidade e fluidez das membranas celulares, levando as células à morte. Desse modo, o efeito radioprotetor da vitamina E deve-se, provavelmente, à sua ligação química com os radicais livres produzidos pela irradiação, uma vez que os radicais livres ligados tornam-se estáveis, não promovendo, portanto, ações danosas ao organismo. Essa hipótese da ação da vitamina E como radioprotetor é aceita e afirmada por muitos autores[2,4,5,7–10,12,13,16–19,22] que estudaram a vitamina E e outros antioxidantes.

Felemovicius *et al.*, ainda no trabalho anteriormente citado[4], afirmam que os oxirradicais também induzem a quebra de DNA. Os trabalhos de Galligan *et al.*[23], Konopacka *et al.*[15,24] e Yoshimura *et al.*[18], que estudaram o efeito radioprotetor da vitamina E, mensurando as quebras do DNA, observaram diminuição significante dessas quebras quando compararam com o grupo controle, sugerindo que a vitamina E aumenta, de alguma maneira, a capacidade de reparo do DNA.

Entretanto, Konopacka *et al.*[15,24] afirmam que as propriedades radioprotetoras da vitamina C e da vitamina E são dependentes de sua concentração e do tempo de administração.

Os resultados obtidos no presente estudo coincidem com a maioria dos trabalhos aqui citados no que diz respeito ao efeito radioprotetor da vitamina E, porém não está de acordo com o trabalho de Rostock *et al.*[25], que observaram não haver diferença significativa entre os animais dos grupos que receberam a vitamina E e os do grupo controle. Deve-se levar em consideração que nesse trabalho os tipos de tecido analisados foram o pulmonar e o cardíaco, sugerindo que as células que os compõem são radiorresistentes.

Os achados do presente trabalho também não coincidem com os achados de El-Nahas *et al.*[26], que observaram que a vitamina E não se mostrou efetiva na radioproteção das aberrações cromossômicas e na atividade mitótica de células da medula óssea. Esses autores também afirmaram que o óleo de oliva, o veículo da vitamina E, promove ação radioprotetora e esta ação é suprimida pela presença da vitamina E. No nosso trabalho, entretanto, o óleo de oliva não promoveu radioproteção no tecido, uma vez que este se apresenta semelhante ao do grupo que recebeu apenas a irradiação (grupo IR), tornando-se claro que o efeito radioprotetor no processo de reparação tecidual é dado pelo dl-alfa-tocoferil e não pelo óleo de oliva. Talvez esta diferença de resultados pode ser devida à via de administração da vitamina E e do óleo de oliva, que no trabalho de El-Nahas *et al.*[26] foi a oral e neste trabalho foi a intraperitoneal.

CONCLUSÃO

Com os resultados obtidos nesta pesquisa, dentro das condições experimentais utilizadas, pode-se concluir que a vitamina E (dl-alfa-tocoferil) atuou junto ao processo de reparação tecidual como um eficaz radioprotetor.

REFERÊNCIAS

1. Bubrick MP. Radiation injuries to the small and large intestine. *In:* Gordon PH, Nivatvong S, eds. Principles and practice of surgery for the colon, rectum and anus. St. Louis, MO: Quality Med Publ, 1992:835–54.
2. Carroll MP, Zera RT, Roberts JC, *et al.* Efficacy of radioprotective agents in preventing small and large bowel radiation injury. Dis Colon Rectum 1995; 38:716–22.
3. Bernstein EF, Sullivan FJ, Mitchell JB, Salomon GD, Glatstein E. Biology of chronic radiation effect on tissues and wound healing. Clin Plast Surg 1993;20:435–53.
4. Felemovicius I, Bonsack ME, Baptista ML, Delaney JP. Intestinal radioprotection by vitamin E (alpha-tocopherol). Ann Surg 1995;222:504–10.
5. Konings AW, Oosterloo SK. Radiation effects on membranes. II. A comparison of the effects of X irradiation and ozone exposure with respect to the relation of antioxidant concentration and the capacity for lipid peroxidation. Radiat Res 1980;81:200–7.
6. Reynolds JEF. Martindale: The extra pharmacopoeia. 29th ed. London: Pharmaceutical Press, 1989:1284–5.
7. Malick MA, Roy RM, Sternberg J. Effect of vitamin E on post irradiation death in mice. Experientia 1978;34:1216–7.
8. Shiraishi N, Joja I, Kuroda M, Fujishima M, Miyake M, Aono K. Radiation-induced peroxidation of lipid dissolved in organic solvent and its inhibition by alpha-tocopherol and cepharanthine. Physiol Chem Phys Med NMR 1985;17:243–6.
9. Londer HN, Myers CE. Radioprotective effect of vitamin E. Am J Clin Nutr 1952;1:705.
10. Rana K, Sood A, Malhotra N. Radioprotection of chick thymus by vitamin E. Indian J Exp Biol 1993;31:847–9.
11. Taren DL, Chvapil M, Weber CW. Increasing the

breaking strength of wounds exposed to preoperative irradiation using vitamin E supplementation. Int J Vitam Nutr Res 1987;57:133–7.

12. Simon GA, Schmid P, Reifenrath WG, van Ravenswaay T, Stuck BE. Wound healing after laser injury to skin – the effect of occlusion and vitamin E. J Pharm Sci 1994;83:1101–6.
13. Mutlu-Turkoglu U, Erbil Y, Oztezcan S, Olgac V, Toker G, Uysal M. The effect of selenium and/or vitamin E treatments on radiation-induced intestinal injury in rats. Life Sci 2000;66:1905–13.
14. Weiss JF, Landauer MR. Radioprotection by antioxidants. Ann N Y Acad Sci 2000;899:44–60.
15. Konopacka M, Rzeszowska-Wolny J. Antioxidant vitamins C, E and beta-carotene reduce DNA damage before as well as after gamma-ray irradiation of human lymphocytes *in vitro*. Mutat Res 2001;491: 1–7.
16. Yanardag R, Bolkent S, Kizir A. Protective effects of DL-alpha-tocopherol acetate and sodium selenate on the liver of rats exposed to gamma radiation. Biol Trace Elem Res 2001;83:263–73.
17. Kumar KS, Srinivasan V, Toles R, Jobe L, Seed TM. Nutritional approaches to radioprotection: vitamin E. Mil Med 2002;167(2 Suppl):57–9.
18. Yoshimura M, Kashiba M, Oka J, Sugisawa A, Umegaki K. Vitamin E prevents increase in oxidative damage to lipids and DNA in liver of ODS rats given total body X-ray irradiation. Free Radic Res 2002;36:107–12.
19. Noaman E, Zahran AM, Kamal AM, Omran MF. Vitamin E and selenium administration as a modulator of antioxidant defense system: biochemical assessment and modification. Biol Trace Elem Res 2002;86:55–64.
20. Rajagopalan R, Wani K, Huilgol NG, Kagiya TV, Nair CK. Inhibition of gamma-radiation induced DNA damage in plasmid pBR322 by TMG, a water-soluble derivative of vitamin E. J Radiat Res (Tokyo) 2002;43:153–9.
21. Marcus R, Coulston AM. Vitaminas lipossolúveis: vitaminas A, K, e E. *In*: Goodman LS, Gilman AG, eds. As bases farmacológicas da terapêutica. 9ª ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 1996:1165–78.
22. Jha MN, Bedford JS, Cole WC, Edward-Prasad J, Prasad KN. Vitamin E (d-alpha-tocopheryl succinate) decreases mitotic accumulation in gamma-irradiated human tumor, but not in normal, cells. Nutr Cancer 1999;35:189–94.
23. Galligan ES, Sweetman SF, Strain SJ, McKeown SR. An investigation of the radioprotective effect of dietary antioxidants on isolated murine lymphocytes. Biochem Soc Trans 1997;25:136.
24. Konopacka M, Widel M, Rzeszowska-Wolny J. Modifying effect of vitamins C, E and beta-carotene against gamma-ray-induced DNA damage in mouse cells. Mutat Res 1998;417:85–94.
25. Rostock RA, Stryker JA, Abt AB. Evaluation of high-dose vitamin E as a radioprotective agent. Radiology 1980;136:763–6.
26. El-Nahas SM, Mattar FE, Mohamed AA. Radioprotective effect of vitamins C and E. Mutat Res 1993; 301:143–7.