INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES Autarquia associada à Universidade de São Paulo

Atenuação da radionecrose em ratos Wistar com aplicação cutânea de quercetina

Nelson Mendes Alves

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do Grau de Doutor em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear - Aplicações

Orientadora: Profa. Dra. Monica Beatriz Mathor

Versão Corrigida Versão Original disponível no IPEN

> São Paulo 2016

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, porque é a luz que faz brilhar sobre nos, pois em todos os momentos me amparou fortalecendo a minha fé e esperança, não permitindo que me afastasse de meu propósito, dando-me proteção e sabedoria. Quando os resultados das pesquisas eram escassos, momentos que pareciam intransponíveis, uma força invisível acalentava meus sonhos, dando sentido a minha vida.

À minha orientadora Profa. Dra. Mônica Beatriz Mathor, pela sua dedicação, atenção e paciência, bem como por seus preciosos ensinamentos me guiando e estimulando, dividindo seu inegável saber científico, dos seus longos anos de trabalhos e pesquisas, tanto pelas suas correções, criticas e sugestões, quanto pela amizade e confiança, fatores relevantes durante toda a orientação.

A todos os colegas do IPEN, pelos momentos de companheirismo e colaboração partilhados, muito obrigado.

Ao Centro de Biotecnologia do IPEN, pelo atencioso acolhimento e por permitir a utilização das instalações, proporcionando um bom desenvolvimento deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Nelson Minoru Omi do CTR, pela prestimosa e eficiente ajuda no cálculo de blindagem do sistema para irradiação animal.

Às Professoras, Dr.as Josemary A. C. Gonçalves e Carmen Cecília Bueno, pela eficiente colaboração no desenvolvimento do trabalho de dosimetria.

À Dra. Neuza Mariko Aimoto Hassimoto FCF/USP pela valiosa colaboração, ao disponibilizar seu laboratório e equipamentos para importante fase desta pesquisa.

Ao Dr. Fabio Eduardo de Campos, Gerente do DPF/IPEN, pela sua presteza e atenção no auxílio da confecção das blindagens do sistema para irradiação animal.

Aos Eng., Carlos Gaia da Silveira e Elizabeth S. Ribeiro Somessari, pela ajuda na irradiação das células e animais.

Ao Sr. Marcos Cardoso da Silva responsável pelo Setor Administrativo do CTR, pelo seu profissionalismo e dedicado trabalho a nos proporcionado.

Aos técnicos: Helio Antonio Paes, Valdemir Silvério da Conceição e Wagner dos Santos Oliveira do CTR, pelo seu profissionalismo no auxílio da confecção do imobilizador animal.

À técnica Neide do biotério do IPEN, pela sua dedicação no ensino e ajuda na manipulação dos ratos no biotério do IPEN.

Ao Dr. Carlos Leonel Zapparoli Junior e equipe da Radiofarmácia por disponibilizar seu laboratório e equipamentos para complemento desta pesquisa.

Meus agradecimentos a todos os colegas que passamos juntos no Grupo, em especial a Ana Paula Funari e Jurandir Tomaz Miranda, que sempre estiveram dispostos a me auxiliar, pela valorosa colaboração na realização deste trabalho e pelos vários momentos de descontração e amizade.

Aos amigos Adriano, Angélica, Alexandre, Amanda, Bruna, Camila, Diego, João, Juliana, Kauê, Maria Fátima, Luciane (FCF/USP), Nelson, Patrícia, Rejeane, Rodrigo, Rodrigo T. pela amizade, por serem prestativos quando precisei, pelas conversas construtivas e descontraídas, muito obrigado.

Não poderia deixar de agradecer ao Sr. Geraldo Araujo Claudio, segurança do CTR, pelo seu valioso trabalho a nos proporcionado.

Ao Prof. Dr. Edson Ramos de Andrade, pesquisador do Centro Tecnológico do Exército (CTEx) e Instituto Militar de Engenharia (IME), pelo incentivo, apoio e força demonstrada, quando iniciamos trabalhos de pesquisa juntos na Universidade Federal de Santa Maria/RS e, inicialmente dávamos os rumos que seguiríamos, pela nossa amizade de longa data.

Aos amados da igreja AD Setor 34 Pinheiros/SP, pela carinhosa acolhida quando aqui chegamos eu e minha esposa, pelos seus lideres especialmente os Prs. Paulo dos Santos, Ezequiel Amâncio, Elias José da Silva, Jeferson M. Jordão, Dirceu Doneda, e ultimamente o Pr. Paulo R. Morais e suas respectivas famílias representando a comunidade, com os cuidados e amizades a nos dispensaram. Especialmente ao amigo Tálysson Sarmento Alvarenga, doutorando no IPEN, que não mediu esforços de me auxiliar, quando precisei da sua ajuda, para completar meus experimentos.

Encerrando, tenho plena consciência que se estou concluindo este trabalho, devo em parte à participação essencial de minha esposa, Deloni da Silva Alves, pela sua compreensão, encorajamento, apoio incondicional, incentivo, paciência, carinho e amor, demonstrando total ajuda na superação dos obstáculos e nos momentos de estresse e ansiedade que ao longo desta jornada foram surgindo. Seus cuidados chegaram até a cozinha, no preparo de pratos leves, saudáveis e variados, muitos se tornando meus preferidos.

Aos membros de minha família: irmãos Sergio e Maurício M. Alves e respectivas famílias, cunhadas e sobrinhos que souberam entender e superar minha ausência, em todos os momentos não deixaram de demonstrar preocupações e confiança na minha empreitada.

Aos amigos de perto e distantes que não mediram esforços e considerações ao enviarem-me palavras, mensagens de incentivo e apoio imprescindíveis nestes momentos. Agradeço de coração a todos.

Por fim: "Nenhum dever é mais importante do que a gratidão".

ATENUAÇÃO DA RADIONECROSE EM RATOS WISTAR COM APLICAÇÃO CUTÂNEA DE QUERCETINA

Nelson Mendes Alves

RESUMO

O aumento da incidência de câncer tem sido expressivo nas ultimas décadas na população mundial, sendo confirmada segundo previsões de entidades nacionais e internacionais da área da saúde. O surgimento do câncer é influenciado predominantemente por fatores genéticos e ambientais, sendo manifestado com mais intensidade na população adulta. As principais modalidades para tratamento do câncer (radioterapia, quimioterapia e cirurgia) podem ser usadas individualmente ou em combinação, dependendo do tipo de câncer. Entre as modalidades citadas, a radioterapia é aquela com maior abrangência no tratamento de pacientes, tendo associado um efeito colateral denominado radiodermite que possui graus de severidade que variam de um simples eritema até radionecrose. As manifestações da radiodermite poderão ocorrer durante o tratamento ou após as seções de radioterapia, ambas as situações terão grande relevância na qualidade de vida do paciente e no custo social. Uma das terapias alternativas estudadas para atenuar a radionecrose é a aplicação cutânea de quercetina. Para avaliar a efetividade desta atenuação foi elaborado um modelo animal de radionecrose a ser utilizado em ratos Wistar. Após estudos in vitro, foi possível determinar as concentrações e momento de aplicação da quercetina, redundo o número de animais a serem utilizados nos experimentos in vivo. Com a aplicação tópica de 250 µmol/L de quercetina, uma hora antes da irradiação gama com dose de 85 Gy, foi possível minimizar os efeitos secundários da radiação, evitando a formação de radionecrose e uma tendência de atenuar a área da ferida nos animais estudados, em comparação aos animais irradiados sem a aplicação da mesma.

Palavras-Chaves: cicatrização, radiodermite, radionecrose, quercetina.

RADIONECROSIS ATTENUATION IN WISTAR RATS WITH CUTANEOUS APPLICATION OF QUERCETIN

Nelson Mendes Alves

ABSTRACT

The increased incidence of cancer has been significant in recent decades in the world population, as confirmed by national and international institutions in the health area. The emergence of cancer is influenced, predominantly by genetic and environmental factors, being manifested more in the adult population. The main modalities for cancer treatment (radiotherapy, chemotherapy and surgery) may be used separately or in combination, depending on the type of cancer. Among the methods mentioned, radiation therapy is the one more broadly used for the treatment of patients, having an associated side effect called radiodermatitis, which has degrees of severity ranging from simple erythema to radionecrosis. The manifestation of radiodermatitis may occur during the treatment or after the radiotherapy sessions: both situations have great relevance in the patient's quality of life and social costs. One of the studied alternative therapies for attenuating the radionecrosis is the quercetin cutaneous application. One of the alternative therapies, studied to mitigate or eliminate the radionecrosis, is based on the topical application of quercetin. To evaluate the effectiveness of this mitigation, an animal model of radionecrosis was developed, to be used in Wistar rats. After in vitro studies, the quercetin concentrations and time of application were determined, reducing the number of animals, when in vivo experiments are carried out. With the topical application of 250 µmol/L of quercetin, one hour prior to gamma irradiation, at a dose of 85 Gy, the side effects of radiation were minimized, avoiding the formation of radionecrosis. There was, also, a tendency to attenuate the wound area in the studied animals, compared to the irradiated animals without the quercetin application.

Key Words: healing, radiodermatitis, radionecrosis, quercetin.

SUMÁRIO

| 1 INTRODUÇÃO | 19 |
|--|----|
| 2 OBJETIVOS | 22 |
| 2.1 Objetivo principal | 22 |
| 2.2 Objetivos secundários | 22 |
| 3 CONSIDERAÇÕES GERAIS | 23 |
| 3.1 Radioterapia | 23 |
| 3.2 Interação da radiação com o tecido biológico | 26 |
| 3.3 Radicais livres | 27 |
| 3.4 Radioprotetores | 27 |
| 3.4.1 Radioprotetor artificial | 28 |
| 3.4.2. Radioprotetor natural | 28 |
| 3.5 Quercetina | 31 |
| 3.6 Pele | 31 |
| 3.6.1 Epiderme | 31 |
| 3.6.1.1 Queratinócitos | 33 |
| 3.6.2 Membrana basal | 33 |
| 3.6.3 Derme | 33 |
| 3.6.3.1 Fibroblastos | 34 |
| 3.6.3.2 Fibras de colágeno | 34 |
| 3.7 Reparo | 35 |
| 3.8 Queimadura | 38 |
| 3.9 Reparo após efeito secundário da radiação | 39 |

| 3.10 Radiação ionizante | 40 |
|--|----|
| 3.10.1 Radiação corpuscular | 40 |
| 3.10.2 Radiação eletromagnética | 40 |
| 3.11 Histologia | 41 |
| 4 ESTUDOS PRELIMINARES | 43 |
| 4.1 Modelo de radionecrose animal | 43 |
| 4.1.1 Elaboração do sistema para irradiação animal | 43 |
| 4.1.2 Dosimetria da geometria do SIA | 43 |
| 4.1.3 Irradiação do ratos Wistar | 45 |
| 4.1.4 Resultado da dosimetria no SIA do ratos Wistar | 45 |
| 4.1.5 Obtenção da radionecrose | 48 |
| 4.1.6 Conclusão sobre o modelo de radionecrose | 48 |
| 4.2 Estudo da variabilidade dos Aspersores | 49 |
| 4.2.1 Administração de medicamento | 49 |
| 4.2.2 Avaliação do aspersor manual | 49 |
| 4.2.3 Resultado da aferição dos aspersores manuais | 52 |
| 4.2.4 Comportamento do volume aspergido pelos aspersores manuais | 52 |
| 4.2.5 Análise estatística dos aspersores manuais | 53 |
| 4.2.6 Uniformidade do volume sobre a superfície | 54 |
| 4.2.7 Conclusão sobre a variabilidade dos aspersores | 55 |
| 5 MATERIAIS E MÉTODOS | 56 |
| 5.1 Curvas de citotoxicidade | 56 |
| 5.1.1 Diluição da quercetina | 56 |
| 5.1.2 Meio de cultura utilizado | 56 |

| 5.1.3 Determinação da concentração não tóxica da QC | 57 |
|--|----|
| 5.1.3.1 Queratinócitos | 57 |
| 5.1.3.2 Fibroblastos | 57 |
| 5.1.4 Leitura da Viabilidade Celular | 57 |
| 5.2 Irradiação celular | 57 |
| 5.2.1 Dosimetria da Placa de 96 poços | 57 |
| 5.2.2 Proteção celular pela quercetina | 58 |
| 5.3 Elaboração do modelo de radionecrose animal | 59 |
| 5.3.1 Elaboração do suporte para irradiação animal | 59 |
| 5.3.2 Imobilizador animal do ratos Wistar | 60 |
| 5.3.3 Geometria de irradiação dos SIAs | 60 |
| 5.3.4 Dosimetria da geometria de irradiação dos SIAs | 61 |
| 5.3.5 Irradiação da pele da região dorsal superior do rato | 62 |
| 5.3.5.1 Determinação da radionecrose no estudo piloto com os Ratos a-c | 63 |
| 5.4 Efeito da aplicação <i>in vivo</i> de QC | 64 |
| 5.4.1 Irradiação dos ratos com aplicação de QC | 64 |
| 5.4.2 Procedimento após o período de irradiação | 64 |
| 5.4.3 Avaliação da proteção pela QC na pele da região dorsal do rato irradiado | 64 |
| 5.4.3.1 Registro fotográfico da região de radionecrose | 64 |
| 5.4.3.2 Analise histológica da pele | 65 |
| 6 RESULTADOS | 66 |
| 6.1 Citotoxidade da Quercetina | 66 |
| 6.1.1 Determinação da concentração não tóxica de QC em queratinócitos | 66 |
| 6.1.1.1 Estatística das curvas de viabilidade celular da QC e DMSO em queratinócitos | 67 |

| 6.1.2 Determinação da concentração não tóxica de quercetina em fibroblastos | 68 |
|--|----|
| 6.1.2.1 Análise estatística das curvas do percentual de viabilidade dos fibroblastos | 69 |
| 6.2 Irradiação das células | 70 |
| 6.2.1 Dosimetria da Placa de 96 poços | 70 |
| 6.2.2 Definição da dose de irradiação | 71 |
| 6.2.2.1 Análise estatística das doses de irradiação | 71 |
| 6.2.3 Determinação do momento de aplicação da QC | 73 |
| 6.2.3.1 Análise estatística do momento de aplicação da QC | 74 |
| 6.2.4 Concentração ideal da QC para proteção celular | 76 |
| 6.2.4.1 Análise estatística das concentrações de QC | 76 |
| 6.3 Padronização do modelo de radionecrose animal | 77 |
| 6.3.1 Dosimetria da geometria de irradiação | 78 |
| 6.3.2 Estudo piloto da irradiação dos Ratos | 79 |
| 6.3.3 Avaliação da proteção pela QC | 79 |
| 6.3.3.1 Acompanhamento fotográfico da ferida | 80 |
| 6.3.3.1a Acompanhamento fotográfico da ferida dos ratos não irradiado | 80 |
| 6.3.3.1b Acompanhamento fotográfico dos ratos irradiados no primeiro experimento | 80 |
| 6.3.3.1c Acompanhamento fotográfico dos ratos irradiados no segundo experimento | 81 |
| 6.3.3.2 Mensuração da área da ferida dos ratos | 82 |
| 6.3.3.2a Mensuração da ferida dos ratos não irradiado | 82 |
| 6.3.3.2b Mensuração da radiodermite dos ratos irradiados | 83 |
| 6.3.3.3 Mensuração da área da ferida dos ratos | 83 |
| 6.3.3.4 Analise histológica da pele | 85 |
| 7 DISCUSSÃO | 87 |

| 8 CONCLUSÃO | 93 |
|--|----|
| 9 ANEXO | 94 |
| ANEXO 1 – Aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais | 94 |
| 10 APÊNDICE | 95 |
| APÊNDICE A | 95 |
| 11 REFERÊNCIA | 99 |

LISTA DE ABREVIAÇÕES

- AM Aspersor manual
- CEUA Comitê de Ética no Uso de Animais
- CLAE Cromatografia liquida de alta eficiência
- CNEN Comissão Nacional de Energia Nuclear
- CPI Condição de pré-irradiação
- CTR Centro de Tecnologia das Radiações
- D10 Nomenclatura adotada no laboratório de cultura para meio de cultura de fibroblastos
- DCAMSA Distância centro do AM a superfície aspergida
- DMSO Dimetilsulfóxido
- DNA Deoxyribonucleic Acid (ácido desoxirribonucleico)
- E7 Poço referencia na placa de 96 poços
- F1-F6 Fabricante 1, Fabricante 2, Fabricante 3, Fabricante 4, Fabricante 5 e Fabricante 6
- FRP Falta de repetibilidade
- G Unidade de indução magnética
- Gy Unidade de radiação
- HE Hematoxilina e eosina
- IA Imobilizador animal
- IA_d Imobilizador animal do suporte para irradiação animal direito
- IAe, Imobilizador animal do suporte para irradiação animal esquerdo
- IA_{ref.} Imobilizador animal do suporte para irradiação animal referência
- IGRT Radioterapia guiada por imagem
- IMRT Radioterapia com intensidade modulada do feixe
- IPEN Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares

K+ – Nomenclatura adotada no laboratório de cultura para meio de cultura de queratinócitos

kV – Quilovolt

LET – *Linear energy transfer* (transferência linear de energia)

MeV - Milhão de elétrons-volt

MTS – Composto tetrazólico, reduzida pela atividade de enzimas mitocondriais, a um produto formazana, cuja intensidade de coloração é diretamente proporcional à quantidade de células viáveis em cultura

- MV Megavolt
- mW Miliwatt
- NCI National Cancer Institute
- NPA Não produziu aspersão
- OH Hidroxila
- PMF Plano mediano da fonte
- PMS Fenazina metasulfato
- PVC Policloreto de vinila
- QC Quercetina 3-β-D-Glicosideo
- QDA Quebrou durante o processo de aferição
- RI Radiação ionizante
- RLs Radicais livres
- RPT Repetibilidade
- SIA Suporte para irradiação animal
- SIA_d Suporte para irradiação animal posicionado a direita da fonte do irradiador
- SIAe Suporte para irradiação animal posicionado a esquerda da fonte do irradiador

SIA_{ref} – Suporte para irradiação animal posicionado na posição referência enfrente da fonte do irradiador

TCC – Tijolos de chumbo com chevron

TD – Taxa de dose

TDm – Taxa de dose média

TDs – Taxas de dose

V – Volume

 ΔV – Variação de volume

 ϕ_{externo} – Diâmetro externo

LISTA DE FIGURAS

| FIGURA 1 – Ilustração da ação ambiental (agente cancerígeno) na célula e ação individual (célula cancerígena) | 23 |
|---|----|
| FIGURA 2 – Graus crescentes de severidade da radiodermite. A: Grau I - descamação seca, B : Grau II - descamação úmida em placas, C : Grau III - eritema rubro escuro e D : Grau IV – necrose | 26 |
| FIGURA 3 – Estrutura molecular básica do flavonoide. Os anéis aromáticos (A e B) e um pirano (C) acoplado ao anel (A) e as posições 2^{-6} e $2-8$ | 29 |
| FIGURA 4 – Ilustração da estrutura molecular básica da quercetina | 30 |
| FIGURA 5 – Ilustração da estrutura da molécula de quercetina com componentes estruturais (I, II, III) relacionados à atividade antioxidante | 30 |
| FIGURA 6 – Fórmula estrutural da quercetina 3-β-D-Glicosideo | 31 |
| FIG. 7 – Imagem ilustrativa das camadas da pele | 32 |
| FIGURA 8 – Vista de perfil do SIA _{ref.} . Os círculos laranja indicam diferentes alturas dos tubos de quartzo com orifício para exposição da pele do rato. O retângulo tracejado em vermelho delimita os componentes do SIA | 44 |
| FIGURA 9 – Vista superior do SIA _{ref.} Deslocamentos angulares $\theta_d(90^\circ)$ do SIA _{d.} , $\theta_{ref.}(0^\circ)$ do SIA _{ref.} (coincidente com o PMF) e $\theta_e(270^\circ)$ do SIA _e . Os números de 1-4 identificam posições ocupadas pelo diodo (retângulo vermelho) durante a aferição da TD. As linhas tracejada em vermelho delimita os componentes do SIA | 44 |
| FIGURA 10 – A: IA do rato Wistar e B: IA do camundongo Nude. Os marcadores em vermelho (1-4) indicam as posições ocupadas pelo diodo durante o mapeamento da TD | 47 |
| FIGURA 11 – Crescimento percentual da área da radiodermite dos Ratos a-c . Os pontos laranja identificam o inicio da radiodermite (7º dia) e os pontos vermelhos representam o dia de extensão máxima da radionecrose. O final de cada curva (azul, lilás, verde) indica o dia da cicatrização dos Ratos a-c respectivamente | 48 |
| FIGURA 12 – É mostrada a extensão máxima da radionecrose na região dorsal do Rato a no 16º dia, Rato b no 18º dia e Rato c no 18º dia após a irradiação | 48 |
| FIG. 13 – Resultado da aferição dos 45 aspersores. Grupo 1: 2 AM com repetibilidade, Grupo 2: 37 AM sem repetibilidade, Grupo 3: 5 AM com esguicho, Grupo 4: 1 AM quebrou | 52 |
| FIGURA 14 – Comportamento do volume aspergido com soro fisiológico (♠) e água (■), A: aspersor EBF-1 e B: aspersor D50-3, em função do nº de acionamento | 52 |

| FIGURA 15 – Comportamento irregular do volume aspergido com água, C: aspersor COM-4 e D : aspersor EPY-3, em função do número de acionamentos | 53 |
|--|----|
| FIGURA 16 – Distribuição dos volumes aspergidos por EBF-1 | 53 |
| FIGURA 17 – Distribuição dos volumes aspergidos por D50-3 | 54 |
| FIGURA 18 – Vista superior da dimensão do dosímetro de alanina da AERIAL utilizada na dosimetria | 58 |
| FIGURA 19 – Posição do poço referência () na dosimetria da placa de 96 poços | 58 |
| FIGURA 20 – Fluxograma de alternativas que foram avaliadas para obtenção da melhor condição de proteção da QC nas células, durante o processo de irradiação | 59 |
| FIGURA 21 – A: imobilizador animal do camundongo Nude e B: imobilizador animal do rato Wistar | 60 |
| FIGURA 22 – Ilustração da vista superior da geometria de irradiação. Os números de 1 - 7 indicam as posições ocupadas pelas alaninas (retângulos vermelhos) durante a irradiação no IA. O deslocamento angular $\theta_e(265,5^\circ)$, $\theta_{ref.}(18^\circ)$, $\theta_d(96^\circ)$ do PMF de cada SIA e os blocos de chumbo A e B também são apresentados | 61 |
| FIGURA 23 – A: Vista superior dos SIAs com o posicionamento dos dosímetros de alaninas nas alturas de 10-15 cm nas posições externas 1-2, sendo as posições internas 3-7 ilustradas na FIG. 22 e B: Vista de perfil do SIA com fixação do fio de sutura | 62 |
| FIGURA 24 – Posição dos ratos sobre a faixa térmica após a finalização da irradiação até o final da ação anestésica | 64 |
| FIGURA 25 – Da esquerda para direita é ilustrada a vista frontal e perfil do sistema de obtenção de imagem da região dorsal do rato | 64 |
| FIGURA 26 – Percentual de viabilidade da QC dos queratinócitos. A: Concentrações variando de 50 a 250 μ mol/L e B : Concentrações variando de 100 a 1000 μ mol/L. As linhas tracejadas representam a variação do controle | 66 |
| FIGURA 27 – Distribuição da viabilidade celular em queratinócitos. A1: Concentrações de QC e A2: Concentrações de DMSO ambas variando de 50-250 μ mol/L, B1: Concentrações de QC e B2: Concentrações de DMSO ambas variando de 100 a 1000 μ mol/L | 67 |
| FIGURA 28 – A linha tracejada (cor laranja) identifica a concentração de QC (250 µmol/L) que difere do seu controle | 68 |
| FIGURA 29 – Percentual de viabilidade da QC para diluição SM(2) para concentrações variando de 75 a 750 µmol/L. As linhas tracejadas representam a variação do controle | 68 |

| FIGURA 30 – Distribuição de viabilidade celular dos fibroblastos. C1 e C3: Concentrações de QC variando de 75 a 750 μ mol/L, C2 e C4: Concentrações de QC com 75 e 150 μ mol/L | • |
|--|---|
| FIGURA 31 – A linha tracejada (cor laranja) identifica a concentração de QC (150 µmol/L) que difere do seu controle |) |
| FIGURA 32 – Percentual de viabilidade dos fibroblastos irradiados com doses de 85, 100 e 150 Gy após 2 e 7 dias de cultivo. As linhas tracejadas representam a variação do controle | L |
| FIGURA 33 – Distribuição da viabilidade celular dos fibroblastos. D1 e D2 : Doses de irradiação (85, 100 e 150 Gy) com cultivo de 2 e 7 dias respectivamente | 2 |
| FIGURA 34 – A linha tracejada (cor laranja) identifica a equivalência estatística entre as doses de irradiação após 7 dias de cultivo | 3 |
| FIGURA 35 – Percentual de viabilidade dos fibroblastos irradiados a 100 e 150 Gy, adição de concentrações de 75 e 150 µmol/L e variação do tempo de contato. As linhas tracejadas representam a variação do controle | 3 |
| FIGURA 36 – Distribuição da viabilidade celular dos fibroblastos para contato 24h e 1h antes e 1h e 24h após a irradiação | 1 |
| FIGURA 37 – A linha tracejada (cor laranja) identifica a equivalência estatística entre os instantes de 1 hora antes e 1 hora depois para aplicação da QC | 5 |
| FIGURA 38 – Percentual de viabilidade dos fibroblastos irradiados a 100 e 150 Gy, adição de concentrações de 75 a 750 µmol/L. As linhas tracejadas representam a variação do controle | 5 |
| FIGURA 39 – Distribuição da viabilidade celular dos fibroblastos para concentrações de 75-750 μmol/L irradiadas com dose de 100-150 Gy | 7 |
| FIGURA 40 – As linhas tracejadas (cor laranja) identificam a equivalência estatística entre as concentrações de QC | 7 |
| FIGURA 41 – Acompanhamento fotográfico das feridas com aplicação de DMSO nos Ratos 4, 6, Rato 7, 11-12 com aplicação de QC (250 μmol/L) e nos Ratos 16, 18 com aplicação de QC (500 μmol/L) | • |
| FIGURA 42 – Registro fotográfico da evolução da radiodermite evidenciando os graus de severidade, início e fim da cicatrização do Rato 2 com aplicação de DMSO e Ratos 9-10 com aplicação de QC. \mathbf{X} = não manifestou radionecrose |) |
| FIGURA 43 – Registro fotográfico da evolução da radiodermite evidenciando os graus de severidade, início e fim da cicatrização dos Ratos 13-14 com aplicação de DMSO e Ratos 19-21 com aplicação de QC. \mathbf{X} = não manifestou radionecrose | 1 |

| FIGURA 44 – Evolução da área da ferida produzido após a passagem do fio de sutura no dorso dos Ratos 4, 6 com aplicação de DMSO, Ratos 7, 11-12 com aplicação de QC (250 µmol/L) e Ratos 16, 18 com QC (500 µmol/L) | 82 |
|--|----|
| FIGURA 45 – As curvas representadas por círculos ilustram a evolução da área da radiodermite nos Rato 2 com aplicação de DMSO e Ratos 9-10 com aplicação de QC (250 μ mol/L) e as curvas representadas por losangos ilustram a evolução da radiodermite nos Ratos 13-14 com aplicação de DMSO e Ratos 19-21 com aplicação de QC (500 μ mol/L). | 82 |
| FIGURA 46 – Comparação das medianas das áreas sob a curva das feridas dos grupos controle e irradiados com aplicação de DMSO e com diferentes concentrações de QC | 83 |
| FIGURA 47 – Imagens dos cortes histológicos das peles dos ratos coradas com Picro-sírius. A: Pele controle, cicatrização da ferida após sutura; B: Regeneração da derme após radiodermite; C: Regeneração parcial da derme após radionecrose. I – região da epiderme. II – região da derme | 85 |

LISTA DE TABELAS

| TABELA 1 – Classificação da radiodermite segundo o National Cancer Institute | 39 |
|--|----|
| TABELA 2 – Taxa de dose (Gy/min) nas posições 1-4 significativas para irradiação da região dorsal do rato | 46 |
| TABELA 3 – Comparação entre as dosimetrias realizadas nos diferentes sistemas para irradiação nas respectivas posições de avaliação | 46 |
| TABELA 4 – Características dos AM fornecidos pelos fabricantes F1 a F6 | 51 |
| TABELA 5 – Comportamento da distribuição do volume aspergido por EBF-1 e D50-3 na superfície e suas respectivas áreas | 54 |
| TABELA 6 – Percentual de dose da placa de 96 poços. Os valores em negrito representam os percentuais com variação entre \pm 5% em relação ao poço referência | 70 |
| TABELA 7 – Doses nas posições relevantes no suporte de irradiação animal para exposição da pele da região dorsal | 79 |
| TABELA 8 – Classificação da radiodermite para ratos Wistar | 80 |

1 INTRODUÇÃO

A oncologia é um importante segmento da área da saúde que atua no tratamento de câncer, fazendo uso de diferentes modalidades terapêuticas, tais como: Cirurgia, Radioterapia, Quimioterapia, Terapia-alvo, Imunoterapia, Hormonioterapia, Transplante de medula óssea, etc. [1]. Entre as modalidades terapêuticas mencionadas, a radioterapia [2, 3] é aquela com maior abrangência no tratamento de pacientes com neoplasia, utilizando basicamente duas técnicas de tratamento: braquiterapia – onde a fonte de radiação fica em contato com a neoplasia ou dentro da mesma e teleterapia – onde a fonte de radiação está situada distante do paciente. Em ambas as situações a dose de radiação no volume tumoral é pré-calculada para determinado período de tempo, além disso, a eficácia terapêutica do tratamento radioterápico está sujeita ao equilíbrio entre a maximização do controle do tumor e a preservação da integridade dos tecidos sadios adjacentes [4]. No Brasil, segundo estimativa do Instituto Nacional de Câncer, para o biênio 2016/2017 ocorrerão 596.070 novos casos de câncer [5], dos quais mais de 60% destes pacientes em algum momento passará por tratamento radioterápico, isto projetará um aumento do número de pacientes que apresentarão radiodermite e consequentemente o aumento do número de radionecrose. A radionecrose, como grau mais elevado de severidade da radiodermite, pode se manifestar durante as seções de radioterapia ou após a conclusão do tratamento, em ambas as situações a qualidade de vida do paciente é comprometida [6] com alteração da imagem corporal e autoestima, levando ao isolamento social, além do custo financeiro para sua eliminação. Até o momento, a radionecrose continua a ser o principal efeito colateral que impõe limitação na eficácia dos seus benefícios do tratamento radioterápico [7].

Com base em trabalhos experimentais, exposições controladas e evidências epidemiológicas de eventos nucleares, foi possível a compreensão do processo de interação da radiação com o tecido biológico, quando foram identificadas quatro fases toxicológicas distintas da exposição à radiação, onde a fase principal, tanto do tratamento, quanto dos seus efeitos adversos, é a formação de radicais livres [**8-9**].

O controle da quantidade de radicais livres [10] em níveis não prejudiciais ao corpo humano pode ser feito com utilização de flavonoides [11-14] cuja propriedade farmacológica é atuar sobre o sistema biológico como antioxidante [15-16]. Nas últimas décadas, estudos realizados com antioxidantes demonstram que os flavonoides são capazes de minimizar os efeitos da radiação ionizante no tecido biológico [17-18].

O flavonoide quercetina é um antioxidante de baixa toxicidade e concomitância favorável no uso com outras drogas [**19-21**], resultando na possível capacidade de redução da manifestação da radionecrose. Suas propriedades antioxidantes, tais como: quelar íons e sequestrar radicais livres têm sido estudados na prevenção de doenças, ou seja, na proteção do tecido biológico.

As vias para administração (oral, tópica, injetável, etc.) de substância medicamentosa utilizam fase sólida, liquida ou pastosa. No caso da proteção cutânea, a aplicação tópica demonstra ser a via de administração mais apropriada, por distribuir a substância medicamentosa uniformemente, de forma localizada, evitando a tensão mecânica sobre a superfície [22]. Entre os vários instrumentos utilizados para aplicação tópica o aspersor manual (AM) atende as condições citados anteriormente.

As vias, apresentadas na literatura [23-27], de utilização da quercetina em pesquisa para fins terapêuticos são: intraperitoneal e oral, porém, elas não se compatibilizam com a radioterapia, pois estas vias poderão potencializar a resistência do tumor à radiação. Entretanto, a aplicação tópica da quercetina reduzirá a probabilidade desta influir diretamente no tumor durante o tratamento. Com aplicação tópica da quercetina, será possível:

- Atenuar ou eliminar os efeitos da radiodermite causados pela radiação ionizante em teleterapia;
- Utilizar doses terapêuticas elevadas com controle mais eficaz da radionecrose em tratamento radioterápico;
- Minimizar ou eliminar as terapias alternativas para controle da radiodermite e custo social;
- Melhorar a qualidade de vida do paciente.

Não foram encontrados na literatura estudos a respeito desta aplicação tópica, sendo assim será necessária uma investigação prévia "in vitro" para avaliar a toxicidade da quercetina com o objetivo de predizer os efeitos nocivos da aplicação tópica e com isso reduzir o número de animais no experimento. Além da redução do número de animais, visando o bem estar daqueles que serão utilizados, também será necessário controlar o tempo de exposição e melhor acomodação dos ratos durante o experimento [**28-29**].

Sendo a radionecrose o efeito colateral, ainda não eliminado em radioterapia, que causa comprometimento da qualidade de vida e reduz os benefícios para o paciente, neste trabalho pretendeu-se mensurar a eficácia de atenuação da radionecrose induzida em ratos Wistar com aplicação cutânea de quercetina para a prevenção de efeitos colaterais causados pela radioterapia. Viabilizando o estudo, foi utilizado um sistema de irradiação animal para rato Wistar, elaborado com base no modelo animal de radionecrose para o camundongo Nude [**30**], que proporcionará inclusive a pesquisa de novas terapias.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo principal

Avaliar a atenuação da radionecrose em ratos Wistar com aplicação cutânea de quercetina.

2.2 Objetivos secundários

- Obtenção da curva de citotoxicidade da quercetina;
- Dosimetria da irradiação da placa de cultura celular;
- Determinação da dose para irradiação in vitro;
- Determinação do momento da aplicação da quercetina visando a melhor radioproteção celular;
- Determinação da concentração de uso da mesma;
- Dosimetria da geometria dos suportes para irradiação animal;
- Construção do modelo de radionecrose animal, utilizando a região dorsal superior do ratos Wistar;
- Escolha do aspersor manual para realização da aplicação tópica da quercetina;
- Avaliação da capacidade radioprotetora da aplicação tópica da quercetina na radionecrose gerada por radiação gama por meio de acompanhamento visual, mensuração da área da ferida e analise histológica.

3 CONSIDERAÇÕES GERAIS

3.1 Radioterapia

Tumor maligno, também denominado câncer ou neoplasia maligna é caracterizado por uma proliferação anormal do tecido, que foge parcial ou totalmente ao controle do corpo, resultando em detrimento à saúde do portador. Alguns cânceres apresentam a característica de migrar para outras partes do corpo, podendo ocorrer através dos sistemas sanguíneo ou linfático, se fixando e retornando a crescer (metástase). Outras características que diferenciam os vários tipos de câncer são: velocidade da multiplicação celular e a capacidade de comprometer tecidos e órgãos adjacentes ou distantes [**31**].

Atualmente as principais causas de manifestação do câncer são atribuídas a fatores genéticos e ambientais (FIG. 1).



FIGURA 1 – Ilustração da ação ambiental (agente cancerígeno) na célula e ação individual (célula cancerígena).

Fonte: INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER, 2015. Disponível em: <www1.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=322>. Acesso em: 3 nov. 2015.

A radioterapia é caracterizada pelo uso da radiação ionizante com o fim de causar a morte celular das células cancerígenas com a minimização do dano nas células sadias. A erradicação do câncer é atingida quando a dose de radiação for letal para as células tumorais, não ultrapassando a tolerância dos tecidos sadios. Como método de tratamento local ou regional, esta pode ser indicada de forma exclusiva ou associada a outros métodos terapêuticos. A dose de radiação é pré-calculada para determinado período de tempo no volume tumoral, além disso, a eficácia terapêutica da radioterapia está sujeita ao equilíbrio entre a maximização do controle do tumor e preservação da integridade dos tecidos sadios adjacentes [**4**].

Entre as várias fontes utilizadas em teleterapia, as principais são: equipamentos de ortovoltagem com energia entre 100 e 300 kV (raio X), unidade de cobalto-60 com energia de 1,25 MeV (raios gama) e acelerador linear com dois tipos de energia (fóton de 4 a 20 MV e elétron de 4 a 22 MeV) [**32**].

Uma das técnicas de tramento muito utilizada ainda no Brasil é a teleterapia convencional que dependendo da situação clínica, pode ser executada desde que de forma apropriada. O planejamento do tratamento do paciente é desenvolvido através da delimitação do volume de tumor em radiografias simples. A delimitação da área é realizada por meio de anatomia topográfica pelo médico. A desvantagem desta é a impossibilidade de visualização do volume irradiado e dos tecidos normais.

Com o desenvolvimento tecnológico foi possível, em tratamentos radioterapicos, a concentração crescente de radiação na área de tratamento e concomitamente a diminuição da dose nas estruturas adjacentes, resultando em melhor controle do câncer e reduzindo a toxicidade do tratamento. As novas técnicas radioterápica, em grande parte, estão relacionadas aos avanços na área de informática, que permitiram o emprego de diferentes métodos de imagens e o desenvolvimento de sistemas de irradiação controlado por computador, originando diferentes técnicas de tratamento [4], tais como:

- Radioterapia conformada o planejamento é realizado através de exames de imagem do paciente que possibilitam a visualização da abragencia do volume tumoral e tecidos normais. A imagem é exportada para um sistema de planejamento que define o local e o volume dessas estruturas, bem como realiza o planejamento da dose precrita através de diferentes campos de tratamento.
- Radioterapia com intensidade modulada do feixe (IMRT) esta técnica supera as limitações da radioterapia conformada. É a técnica que modula a intensidade da radiação de cada campo de tratamento, através de diferentes formatos de subcampos (colocação de alguma forma de filtro na frente do feixe), levando-se em consideração as estruturas anatômicas que esse feixe vai atravessar. Ela permite distribuição de dose altamente conformada possibilitando doses elevadas no volume a ser tratado e redução da dose nas estruturas adjacentes;
- Radioterapia guiada por imagem (IGRT) O objetivo da IGRT é melhorar a acurácia através de imagens obtidas na máquina antes da aplicação, tornando viável a diminuição das margens ao redor do tumor e, com isso, possibilitar novas

abordagens clinicas, como o hipofracionamento e o escalonamento de dose para alguns sítios anatômicos. Esta técnica pode corrigir a localização e tamanho do volume de tratamento durante sua execução, gerando a necessidade de novos planejamentos.

 Radioterapia esterotática com dose única (radiocirurgia) ou fracionada - consiste no emprego de doses (única e elevada) de radiação dirigidas com alto grau de exatidão para câncer intracraniano e algumas doenças funcionais. Esta técnica é caracterizada pelo elevado grau precisão no posicionamento, realizada através de fixador de crânio.

Para execução destas técnicas de tratamento é necessário uma equipe multidisciplinar na execução deste procedimento, sendo sua realização direcionada pelos seguintes passos, a saber:

- Imobilização do paciente;
- Aquisição de imagens (tomografia, ressonância, etc.);
- Definição dos volumes alvos e órgãos normais nas imagens enviadas para o computador;
- Planejamento de tratamento;
- Cálculo de dose;
- Controle da qualidade;
- Verificação de posicionamento do paciente;
- Tratamento.

Até o momento, um dos fatores limitantes do tratamento radioterápico, apesar de todo avanço tecnologico, é não ter sido possível a erradicação do prejuizo causado pela radiação no decorrer ou após o tratamento. A radiação, além de promover a morte das células tumorais, atua também em tecidos sadios adjacentes ao tumor, promovendo lesão e morte dos mesmos. O aparecimento do dano celular e um processo complexo que envolve várias etapas sucessivas, sendo variável o tempo envolvido de cada etapa. Algumas são muito rápidas, frações de segundos, outras podem durar meses ou anos [**2**, **9**].

O uso da radiação ionizante em teleterapia pode ocasionar alteração cutânea denominada radiodermite, com graus diferenciados de severidade [**33-34**], sendo a radionecrose o grau mais elevado (FIG. 2D). A severidade da radiodermite pode ser

agravada por fatores não relacionados à radiação, tais como: genético, localização anatômica, ambiental, doença infecciosa, utilização concomitante de medicamento ou cosmético radiossensibilizador, contudo a dose e a taxa de dose são predominantes para sua manifestação [**35-36**].



- FIGURA 2 Graus crescentes de severidade da radiodermite. A: Grau I descamação seca, B: Grau II - descamação úmida em placas, C: Grau III - eritema rubro escuro e D: Grau IV - necrose.
- Fonte: Adaptada de INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER, 2015. Disponível em: <www.inca.gov.br/enfermagem/>. Acesso em: Acesso em: 3 nov. 2015.

3.2 Interação da radiação com o tecido biológico

Com base em trabalhos experimentais, exposições controladas e evidências epidemiológicas de eventos nucleares, foi possível a compreensão do processo de interação da radiação com o tecido biológico [**8-9**, **37**], quando foram identificados estágios toxicológicos distintos da exposição à radiação, a saber:

- Estágio físico nessa etapa, acontece a absorção da energia com a matéria viva, e ocorrem as ionizações. Com isso, aparecem átomos e moléculas ionizadas, com duração de tempo muito curta. Nessa fase, os produtos formados são altamente reativos;
- Estágio químico após a formação dos radicais livres (RLs) haverá alterações químicas ou reações químicas com moléculas vizinhas. Isso resultará na formação de produtos secundários, tendo uma duração de frações de segundo até varias horas;
- Estágio biológico as reações químicas resultantes das fases anteriores levam à formação de novas moléculas, podendo afetar alguns processos vitais para alguns sistemas biológicos;
- E por último a manifestação dos efeitos provocados pelos estágios anteriores bioquímicos, fisiológicos e morfológicos.

Na realidade para ocorrer os estágios citados anteriormente, estes dependerão da energia absorvida pelas moléculas que compõem o meio.

3.3 Radicais livres

Os radicais livres (RLs) são definidos como uma espécie que perdeu ou ganhou um elétron, ou seja, ficando com um elétron desemparelhado [**38-39**]. O número ímpar de elétrons confere aos RLs certo grau de instabilidade em termo de sua energia e cinética. Energeticamente, para alcançar a estabilidade, os RLs eliminam esse elétron da sua estrutura eletrônica, para isso, o radical é reduzido (perde um elétron) ou oxidado (ganha elétron). Além disso, um radical pode frequentemente se auto-oxidar, por meio da reação chamada dismutação, onde um dos radicais é oxidado enquanto o outro é reduzido [**40**]. Cineticamente, o fato dos RLs possuírem um elétron desemparelhado na sua última camada eletrônica favorece consideravelmente seus pareamentos com outras moléculas durante as colisões biomoleculares. A taxa da reação química, entretanto, é determinada pela eficiência das colisões, e com o aumento desse parâmetro no caso dos radicais, as reações são frequentemente mais rápidas. A presença de um elétron desemparelhado é um fator de instabilidade que determina as propriedades dos RLs. Quando o radical reage com a molécula vizinha, ela é transformada em um RL, que ira procurar um elétron para se estabilizar. Esse processo vai se perpetuando como uma reação em cadeia [**41**].

A abstração de um ou dois elétrons do oxigênio produz radicais superóxido e peróxido, respectivamente, amplamente encontrados nos complexo I e II da cadeia de transporte de elétrons na mitocôndria e pode ser produzido na taxa de 1 a 4% de cada molécula de oxigênio usada [42]. Reações atribuídas aos RLs com moléculas intracelulares resultam em alterações na vida útil destas devido ao acumulo da sequência de danos provocados pelas reações dos RLs, sendo evidente em componentes celulares ao longo da vida, tal com o colágeno, resultando na aceleração do envelhecimento [43]; danos oxidativo no DNA (onde danos no DNA mitocondrial são da ordem de 16 vezes maior do que no DNA molecular) e na glicação, uma modificação nas proteínas, resultante de reações entre a glicose e grupos de aminoácidos das proteínas [44].

3.4 Radioprotetores

Determinadas substâncias como os antioxidantes possuem a capacidade de equilibrar a quantidade de radicais livres oriundos do desequilíbrio causado pela radiação ionizante. Tais substâncias são responsáveis por proteger ou diminuir os danos causados pela radiação aos tecidos vivos, pois estabelecem ligações químicas com os radicais livres. Na atualidade é conhecido que existe uma infinidade de substâncias antioxidantes (naturais e artificiais) com potencial radioprotetor, tais como as vitaminas, proteínas, enzimas e substâncias sintéticas. Com exceção das substâncias sintéticas, muitos antioxidantes são encontrados em alimentos como frutas, vegetais e carnes [**45-49**].

3.4.1 Radioprotetor artificial

Dentre os radioprotetores sintéticos o mais conhecido é a amifostina (WR-2721), sendo seu desenvolvimento ocorrido nos anos 1950. A amifostina passou a ter destaque entre os outros compostos artificiais com sua utilização em paciente submetidos à radioterapia, além disso, apresentava efeito citoprotetor em células com concentrações até 100 vezes maior, propiciando ação protetora contra os efeitos colaterais da quimioterapia. Atualmente esta substância não tem sido utilizada na rotina clínica, predominando em estudos experimentais e clínicos [**50-52**].

3.4.2. Radioprotetor natural

Na tentativa de encontrar substâncias naturais que apresentem elevada ação antioxidante que permitam substituir as substâncias sintéticas ou fazer associações com elas, alguns fitoterápicos têm adquirido recentemente o reconhecimento como modificadores da resposta biológica. As drogas à base de plantas oferecem uma alternativa para os compostos sintéticos, sendo consideradas atóxicas ou apresentando baixa toxicidade. Atualmente tem-se observado que determinados fitoquímicos podem atuar na eliminação de radicais livres (RLs), por possuírem propriedades antioxidantes e ação imunoestimulante, que podem estar correlacionadas com um efeito radioprotetor [**53-56**].

Algumas vitaminas desempenham importante função como agentes antioxidantes, tais como: a vitamina C sendo hidrossolúvel, interage doando elétrons, permitindo à molécula participar da desoxidação das espécies reativas do oxigênio; vitamina E sendo solúvel em lipídios, atua prevenindo a peroxidação lipídica, causada pelos radicais livres em diversas membranas celulares; o betacaroteno e a vitamina A, ambos desempenham a função de depuradores eficientes dos radicais livres inativando principalmente as moléculas de oxigênio livre presentes no meio. Desta forma, diversos compostos naturais precisam ser analisados quanto à presença de moléculas que desempenhem funções antioxidantes e consequentemente radioprotetora. A atividade antioxidante protetora presente nos vegetais pode estar relacionada com a presença de compostos fenólicos que abrangem desde moléculas simples até as mais complexas. Estas moléculas estão contidas nos vegetais na forma livre ou em conjunto com glicídios e proteínas [57]. Os compostos fenólicos podem agir retirando as espécies reativas do oxigênio presentes no meio ou por meio da ação quelante sobre íons metálicos [58-59]. É sugerido que quanto maior a capacidade de doação de elétrons, maior será o potencial de atuação antioxidante dos flavonoides, que também está associado com a interação da estrutura e atividade das moléculas [49].

Os flavonoides são compostos do grupo dos polifenóis encontrados em vegetais e tem como função a proteção das plantas contra danos oxidativo. A estrutura básica dos flavonóides consiste de 15 átomos de carbonos distribuídos entre dois anéis aromáticos, interligados via carbono heterocíclico do pirano (FIG. 3).



FIGURA 3 – Estrutura molecular básica do flavonoide. Os anéis aromáticos (A e B) e um pirano (C) acoplado ao anel (A) e as posições 2´- 6´ e 2 - 8.
Fonte: PIETTA P. G. et al.

3.5 Quercetina

A quercetina é o principal flavonoide presente na dieta humana sendo encontrado em vegetais [**60-61**], além de ser lipossolúvel com capacidade de ligação com polímeros biológicos, podendo atuar na quelação de íons metálicos de transição, agindo como catalisador no transporte de elétrons e eliminação de radicais livres. A quercetina está entre os flavonoides naturais como um dos antioxidantes [**62**] que apresenta melhor ação frente às espécies reativas de oxigênio. A FIG. 4 ilustra a estrutura molecular básica da quercetina.



FIGURA 4 – Ilustração da estrutura molecular básica da quercetina. Fonte: SEREMETA D. C. H., 2014.

A molécula de quercetina (FIG. 5) apresenta três importantes componentes estruturais que estão relacionados com sua atividade antioxidante, a saber: a presença do grupo catecol, responsável pela formação de radicais fenoxil estáveis após a doação do átomo de hidrogênio (I), dupla ligação entre os carbonos que estão em conjugação como o grupo 4-carbonil, permitindo a saída de um elétron do radical fenoxil (II). E finalmente, a presença do grupamento 3-OH (III) combinado com uma dupla ligação entre carbonos [49], gerando um aumento na estabilização por ressonância dos elétrons que sofreram deslocamento na molécula.



FIGURA 5 – Ilustração da estrutura da molécula de quercetina com componentes estruturais (I, II, III) relacionados à atividade antioxidante.
 Fonte: Adaptada de SIQUEIRA W. N., 2013.

A quercetina possui elevado potencial antioxidante devido as suas propriedades oxidativas especificamente o superóxido e hidroxila, considerados espécies reativas do oxigênio de grande reatividade e relacionadas com o desencadeamento da peroxidação lipídica [63]. Estudos realizados com quercetina mostraram que esta substância possui diversas atividades biológicas, farmacológicas e medicinais relacionadas aos grupos fenólicos presentes na estrutura da molécula (FIG. 4) e uma elevada atividade antioxidante [64].

Na maioria dos casos, os flavonóides existente nas plantas estão sob a forma de glicosideo, sendo objeto de interesse contínuo propiciado por sua marcante atividade biológica. O açúcar mais comum que aparece entre os 179 glicosídeos de quercetina encontrados na natureza é o D-glicosideo, que ocorre isoladamente ou como parte de um dissacárido [65]. Tem sido mostrado que a presença deste açúcar na posição 3 da quercetina (FIG. 5) modifica consideravelmente suas as atividades bioquímicas [66]. A quercetina 3- β -D-Glicosideo é um flavonóide glicosilado (FIG. 6) que tem recebido uma grande atenção pela sua capacidade antioxidante [67], ação protetora [68], antialérgica [69] entre outras funções, que possibilita uma ampla variedade de aplicações na área farmacológica.



FIGURA 6 – Fórmula estrutural da quercetina 3-β-D-Glicosideo.

Fonte: Catalogo da SIGMA-ALDRICH BRASIL, 2015. Disponível em: <www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/17793?lang=pt®ion=BR.>. Acessado em: 27 out. 2015.

3.6 Pele

A pele é o órgão que recobre todo corpo humano, inclusive cavidades, podendo alcançar uma extensão entre 1,5 a 2 m² e pesar até 16% da massa corporal. Esta é formada pela camada externa denominada epiderme e uma camada interna denominada derme e abaixo desta se encontra a hipoderme constituída de tecido conjuntivo denso não modelado, que não faz parte da pele, servindo de união com os órgãos subjacentes (FIG. 7).

A epiderme é constituída por epitélio estratificado pavimentoso queratinizado. A ligação entre a epiderme e a derme é acentuada através de projeções do tecido conjuntivo da derme, as papilas dérmicas, que encaixam em reentrâncias da epiderme, aumentando a coesão entre as camadas [**70**]. Devido a permanente interação da pele com o meio ambiente que a circunda e as estruturas internas do corpo, esta desempenha múltiplas funções [**70-71**], tais como: a) Proteção física – constitui uma barreira de proteção para as estruturas internas do corpo e concomitantemente impede perda de água e substâncias do meio extracelular, b) Proteção imunológica – com atuação dos componentes da imunidade humoral e celular localizados na derme, c) Termorregulação – realizada pelas glândulas sudoríparas que secretam o suor que ao se evaporar, esfria a superfície córnea e vasos sanguíneos que ampliam ou diminuem o fluxo sanguíneo periférico, permitindo maior ou menor dissipação de calor, d) Percepção – através da complexa rede nervosa da pele é a receptora sensorial de temperatura, dor e tato, e) Funções metabólicas – entre as várias funções metabólicas a mais importante é a síntese da vitamina D3 pela ação da luz ultravioleta do sol sobre o percussor 7-deidrocolesterol.



FIG. 7 – Imagem ilustrativa das camadas da pele.

3.6.1 Epiderme

É a camada mais externa, compacta e impermeável da pele. Apresenta uma espessura variável não possuindo sistema de irrigação sanguínea direto, sendo nutrida pela permeação dos nutrientes procedentes da derme por capilaridade. É constituída por epitélio estratificado pavimentoso queratinizado, sendo os queratinócitos células predominantes (80%) deste epitélio e a existência de outros três tipos de células: melanócitos (13%), células de Langerhans (4%) e células de Merkel (3%) [**70-71**].

A espessura e a estrutura da epiderme dependem do local do corpo, sendo mais espessa na palma das mãos, planta dos pés e algumas articulações. As células da epiderme podem estar distribuídas em até cinco camadas distintas, no sentido do interior para superfície: camada basal ou germinativa apresenta elevada atividade mitótica sendo uma

Fonte: Adaptada de Bioderma Laboratoire Dermatologique, 2015. Disponível em: <www.bioderma.com/pt/em-contacto-com-a-sua-pele/a-pele-e-um-rgao.html>. Acessado em: 27 out. 2015.

das responsáveis pela renovação continua da epiderme; camada espinhosa tem importante função de manter a coesão entre as células da epiderme e resistência ao atrito; camada granulosa contribui na formação de barreira contra a penetração de substâncias e para tornar a pele impermeável, impedindo a desidratação do corpo; camada lúcida é constituída por células sem núcleo e organela citoplasmática com grande número de filamento com queratina e camada córnea que é a camada mais superficial constituída por células queratinizadas sem vida que descamam continuamente.

3.6.1.1 Queratinócitos

São predominantes na epiderme, sendo especializados na produção de queratina que preenche as células mais próximas da superfície da epiderme para formar a camada córnea. Os queratinócitos estão continuamente sendo descamados da superfície da epiderme, e esta população de células é constantemente renovada, por meio da atividade mitótica dos queratinócitos nas camadas basais da epiderme. Á medida que as novas células vão sendo formadas, as células da camada adjacente superior vão sendo deslocadas em direção à superfície. Os queratinócitos se diferenciam ao longo do seu percurso à superfície e acumulam no citoplasma filamentos de queratina, e finalmente, ao se aproximarem da superfície da epiderme as células morrem e descamam.

3.6.2 Membrana basal

Na superfície de contato entre as células epiteliais e o tecido conjuntivo subjacente esta localizada a lamina basal, quando observada ao microscópio eletrônico, demonstra ser constituída por uma lâmina basal e uma lâmina reticular. Lâmina basal é a porção superficial da membrana basal, formada predominantemente por fina camada de colágeno tipo IV e glicoproteínas estruturais, fibronectina, laminina e entactina. A composição molecular destes componentes varia de tecido para tecido e dentro do mesmo tecido. Outras atividades da lâmina basal são: influência a polaridade celular, promove a sobrevivência, proliferação e diferenciação das células, fixando-se a fatores de crescimento; modula o metabolismo das células e organiza as proteínas na membrana plasmática das células adjacentes [**70**].

3.6.3 Derme

É responsável por aproximadamente de 90% da espessura da pele, servindo de apoio para a epiderme e unindo a pele à hipoderme. É constituída de fibras de colágeno e

elastina dispersas em uma substância fundamental amorfa, juntamente com os fibroblastos que sintetizam o colágeno conferindo resistência e fibra de elastina que confere elasticidade a pele, e os demais componentes da matriz extracelular. Outras estruturas são os vasos sanguíneos, pelos, unhas, glândulas e as terminações nervosas sensitivas.

É na derme onde estão presentes os vasos sanguíneos que nutrem a epiderme, vasos linfáticos para remoção de toxinas, remoção de liquido, evitar edema e também os nervos e órgãos sensoriais a eles associados. Estes incluem vários tipos de sensores. A derme é subdividida em duas camadas: uma derme papilar superficial em contato com a epiderme, formada por tecido conjuntivo frouxo e uma derme reticular, constituída por tecido conjuntivo denso não modelado, onde predomina o colágeno que limita com a hipoderme. [70-71].

- Derme papilar é constituída por tecido conjuntivo frouxo que forma as papilas dérmicas. Esta camada apresenta pequenas fibras de colágeno do tipo I e III entrelaçados com fibras do sistema elástico formando uma rede frouxa. Na papila dérmica também são encontradas fibrilas especiais de colágeno, que se estendem da membrana basal para dentro da derme, fixando a derme à epiderme;
- Derme reticular constituída por tecido denso não modelado, possui espessas fibras de colágeno tipo I e fibras elásticas dispostas paralelamente à superfície. Nesta camada são encontrados os vasos sanguíneos e linfáticos, nervos e anexos cutâneos.

3.6.3.1 Fibroblastos

Os fibroblastos sintetizam o colágeno e a elastina, além dos glicosaminoglicano, proteoglicanos e glicoproteinas que farão parte da matriz extracelular. Essas células estão também envolvidas na produção de fatores de crescimento, que controlam a proliferação e a diferenciação celular, sendo as células mais comuns do tecido conjuntivo e capazes de modular sua capacidade metabólica, a qual vai se refletir na sua morfologia [**70**].

3.6.3.2 Fibras de colágeno

São fibras sintetizadas por fibroblastos e miofibroblastos, células musculares e várias células epiteliais. Como principal componente da pele, cartilagem e do osso. Os

colágenos são as proteínas mais abundantes do corpo, representando 25% da massa proteica.

O colágeno é uma estrutura longa e rígida formada por três cadeias polipeptídica (cadeias α), entrelaçadas umas às outras formando uma fita tripla helicoidal. Auxiliando a formação desta fita helicoidal, se encontra os aminoácidos prolina e glicina. O primeiro estabiliza a conformação da hélice em cada cadeia α e o segundo permite que as três cadeias α se agrupem firmemente formando assim a super-hélice final [**70-71**].

3.7 Reparo

O reparo de um tecido pode ocorrer por regeneração ou cicatrização. No processo de regeneração a proliferação das células tem o objetivo de substituir as estruturas perdidas quando há pouca lesão do estroma e do tipo celular, já na cicatrização é restabelecida a homeostasia do tecido com perda da atividade funcional pela formação de cicatriz fibrótica [**72**].

No momento da injuria tecidual tem início uma série de eventos que de forma simplista são manifestados com rubor, tumor, calor e dor. Estes sinais resultam da ativação de células nervosas, estromais, vasculares e circulatórias por estímulos físicos ou por sinalização química feita por estruturas das células rompidas, fragmento dos elementos inertes dos tecidos, proteínas séricas e ação de mediadores inflamatórios pré e pós-formados, tendo como resultado a produção de mediadores de natureza lipídica, peptídica, manifestação de proteínas de adesão para leucócitos e novos sinalizadores físico-químicos. Em continuidade, ocorre a infiltração de células anteriormente ativadas terão grande relevância no reparo [**73**].

A reparação da ferida passa pelas seguintes etapas básicas: fase inflamatória, fase proliferação e fase de maturação.

Fase inflamatória tem inicio imediatamente após a ferida, com a liberação de substâncias vasoconstritoras pelas membranas celulares. O endotélio lesado e as plaquetas estimulam a cascata da coagulação. Objetivando a hemostasia, essa cascata é iniciada e grânulos são liberados das plaquetas, as quais contêm fator de crescimento de transformação beta (TGF-β) que atraem neutrófilos para ferida [74]. O coágulo é

formado por colágeno, plaquetas e trombina com função de reservatório proteico para síntese de citocinas e fatores de crescimento. Assim a resposta inflamatória se inicia com vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular, promovendo a migração de neutrófilos para a ferida.

Os neutrófilos são as primeiras células a chegar à ferida após a lesão, aderindo à parede do endotélio mediante ligação com os receptores da membrana. Estes produzem radicais livres que auxiliam na destruição bacteriana e são gradativamente substituídos por macrófagos. Os macrófagos migram para a ferida 2 a 4 dias após a lesão, sendo as principais células antes dos fibroblastos migrarem e iniciarem a replicação. Os macrófagos são fundamentais na finalização do desbridamento iniciado pelos neutrófilos e contribui para secreção de citocinas e fatores de crescimento, além de contribuírem na angiogênese, fibroplasia e síntese de matriz extracelular [**74**], fundamentais para a transição para a fase proliferativa.

 Fase proliferação é composta de três eventos importantes que sucedem o período de maior atividade da fase inflamatória: <u>angiogênese</u>, <u>fibroplasia</u> e <u>epitelização</u>. Este fase caracteriza-se pela formação de tecido de granulação, que é constituído por um leito capilar, fibroblastos, macrófagos, um frouxo arranjo de colágeno, fibronectina e ácido hialurônico.

A <u>angiogênese</u> é a formação de novos vasos necessários para manter o processo de cicatrização da ferida. Estes vasos são formados a partir de brotos endoteliais sólidos, que migram no sentido da periferia para o centro da ferida sobre uma rede de fibrina depositada no leito da ferida. Os mediadores químicos originados dos macrófagos ativos estimulam a migração e mitose de células endoteliais. Além da nutrição do tecido, os novos vasos ajudam no aporte de macrófagos e fibroblastos para o local da ferida.

A <u>fibroplasia</u> ocorre após o trauma, células mesenquimais quiescentes e esparsas no tecido normal, são transformadas em fibroblastos e direcionadas para inflamação, onde se dividem e produzem os componentes da matriz extracelular. Os fibroblastos só aparecem na área da ferida após a realização da higienização da área da ferida pelos leucócitos polimorfonucleares, sendo sua função principal a síntese de colágeno ainda na fase celular da inflamação. O colágeno é uma proteína de alto peso molecular, composta de glicina, prolina, hidroxiprolina, lisina e hidroxilisina
responsáveis pela força da cicatriz. A síntese de colágeno é dependente da oxigenação das células, hidroxilação da prolina e lisina, sendo essa reação medida por uma enzima produzida pelo próprio fibroblasto na presença de coenzimas, ferro, testosterona, tiroxina, proteínas e zinco. O colágeno é responsável pela sustentação e pela força tensil da cicatriz, sendo produzido e degradado continuamente pelos fibroblastos. Inicialmente, a síntese de colágeno novo é a principal responsável pela força da cicatriz, sendo substituída ao longo de semanas, pela formação de ligações cruzadas entre os feixes de colágeno.

A <u>epitelização</u> ocorre precocemente. Se a membrana basal estiver intacta, as células epiteliais migram em direção superior, e as camadas normais da epiderme são restauradas em três dias. Se a membrana basal for lesada, as células epiteliais das bordas da ferida começam a proliferar na tentativa de restabelecer a barreira protetora [**74-75**].

A matriz extracelular ou substância fundamental substitui o coágulo depositado no leito da ferida logo após o trauma. Sua principal função é a restauração da continuidade do tecido lesado, funcionando como um arcabouço para a migração celular. Os fibroblastos são as maiores fontes de proteínas da matriz, onde irão ordenar os feixes de colágeno produzidos, também, pelos próprios fibroblastos, além de ser estrutura para os novos vasos. A matriz extracelular é constituída de várias proteínas e colágeno, proteoglicanos, água e eletrólitos.

• Na fase de maturação a ferida passa por um processo de contração, através do movimento das bordas para o centro da ferida, reduzindo o tamanho da cicatriz. Este processo é importante na cicatrização das feridas, principalmente nas abertas. Porém, ocorrendo de forma exagerada e desordenada causa defeitos cicatriciais importantes causados pela diferenciação dos fibroblastos em miofibroblastos, estimulados por fatores de crescimento. No ser humano, a maturação tem início durante a 3ª semana, sendo caracterizada pelo aumento da resistência sem aumentar a quantidade de colágeno. O aumento da resistência deve-se à remodelagem das fibras de colágeno, com aumento das ligações transversas e melhor alinhamento do colágeno, ao longo das linhas de tensão. A fase de maturação dura toda a vida da ferida, embora o aumento da força tensão se estabilize, após um ano, em 70 a 80% da pele intacta.

3.8 Queimadura

No caso da ação de agentes térmicos ou radioativos na pele a complicação mais severa é a queimadura. Esta é caracterizada pela desnaturação e destruição de constituinte celulares da pele, podendo haver perda de substancia e solução de continuidade da mesma. A gravidade da queimadura depende do alcance da profundidade na pele, extensão da área atingida e localização [**76**]. As queimaduras são classificadas em:

- Primeiro grau: envolve apenas a epiderme, caracterizada por uma área avermelhada com dor leve a moderada. Não comprometimento das funções da pele com reparo acontecendo em até uma semana.
- Segundo grau: produz danos à epiderme e derme com formação de bolhas, eritema, dor e edema. As bolhas se formam quando há a separação entre a epiderme e a derme e estão associadas com uma acumulo de fluido no interstício do tecido. Estruturas anexas geralmente não são lesadas. A epiderme é regenerada pela migração de células a partir das bordas da ferida e do tecido epitelial presente nos folículos pilosos (caso não tenham sido destruídos). O período para cicatrização ocorre entre 3 e 4 semanas, caso se manifeste alguma infecção.
- Terceiro grau: quando a epiderme, derme e as estruturas associadas são destruídas. Nenhuma dor é sentida na região de uma queimadura de espessura total, pois as terminações sensoriais dos nervos são destruídas. A pele só pode ser regenerada a partir dos bordos da ferida e, se a área da queimadura for grande, isto pode ser um processo lento. Existe uma perda constante de fluido corporal a partir da área danificada e a possibilidade de infecção é elevada [77].

Queimaduras causadas por radiação (radiodermite) apresentam diferenças marcantes do ponto de vista fisiopatológico, clinico e evolução, em relação às queimaduras térmicas. A resposta da pele, a níveis elevados de radiação, geralmente segue um padrão característico determinado pela radiossensibilidade da população de células envolvidas, qualidade da radiação, padrão temporal de lesão e reparação. O curso de tempo pode variar dependendo das características das doses empregadas e a condição do paciente [**78**].

3.9 Reparo após efeito secundário da radiação

A partir do momento em que ocorre a interação da radiação com a pele, pode ocorrer um efeito, denominado radiodermite, que proporcionará complicações com graus diferenciados de severidade relacionados à dose da radiação [**34**]. A radiodermite poderá variar de um simples eritema cutâneo, identificado por uma coloração avermelhada da pele, até a radionecrose caracterizada pela destruição da pele e tecidos adjacentes, podendo ocorre em grande extensão e profundidade [**36**].

A radiodermite gerada nos tecidos é dividida em aguda e tardia [**79**]. Esta morbidade aguda da pele é classificada em graus de severidade [**33**], sendo as principais alterações encontradas, variando de eritema até radinecrose, esta última caracterizada com lesão mais grave. O grau da lesão muda de acordo com a dose ou taxa de dose, tempo de exposição, qualidade da radiação e condições clínicas do paciente.

As feridas histológicas se iniciam com redução das mitoses na camada basal e edema celular, causando alterações importantes no tecido. As alterações são interdependentes, particularmente as vasculares, que geram lesões indiretas em todos os outros tecidos e são marcantes na fase tardia, externando o espessamento e calcificação das paredes vasculares. Em outros tecidos é observada a fibrose do tecido adiposo subcutâneo, retardo no crescimento e dor óssea, osteoradionecrose e fraturas patológicas entre outros. Os músculos estriados sofrem distúrbio metabólico reversível alguns dias após a irradiação. Os danos angiomesenquimais produzem a lesão tardia, levando a insuficiência vascular, proliferação de colágeno e estrangulação nervosa [**36**].

Entre as várias classificações utilizadas para radiodermite, aquela mais aceita é do *National Cancer Institute* (NCI) [**33**]. A classificação dos graus de severidade da radiodermite é ilustrada na TAB. 1. A reação da pele a doses elevadas de radiação predominará um padrão que dependerá da radiossensibilidade do tecido irradiado, diagnóstico precoce e estado clinico do paciente.

| Grau I | Grau II | Grau III | Grau IV | |
|-------------------------------------|---|--|---|--|
| Eritema fraco ou descamação seca | Eritema de evolução moderada a rápida; descamação úmida e irregular, confinada a dobras e pregas da pele; edema moderado | Descamação úmida diferente dobras cutâneas e vincos; sangramento induzido por menor trauma ou abrasão | Necrose da pele ou ulceração da derme de espessura total; sangramento espontâneo a partir do sitio envolvido | |

TABELA 1 – Classificação da radiodermite segundo o National Cancer Institute.

Fonte: Adaptada de BERNIER J. et al. 2008.

3.10 Radiação ionizante

A radiação ionizante (RI) é definida como "qualquer partícula ou radiação eletromagnética que, ao interagir com a matéria, ioniza seus átomos ou moléculas" [80]. A RI pode ser dividida em corpuscular e eletromagnética [81].

3.10.1 Radiação corpuscular

Consiste em partículas elementares, tais como:

- Partículas alfa (α) são átomos de hélio duplamente ionizado, com carga positiva. Devido a sua alta transferência linear de energia (LET), esta partícula cede a sua energia rapidamente para o meio, tornando muito limitado o seu poder de penetração;
- Partícula beta (β) são eletrons ou positrons de elevada energia cinética emitida pelos núcleos de alguns radionuclídeos. A formação da partícula β pelos radionuclídeos denomina-se decaimento β. Pode-se conceituar a partícula como um elétron de origem nuclear com carga positiva (β⁺) ou negativa (β⁻). Dependendo da sua energia a partícula β pode alcançar de 1 a 2 cm no tecido biológico.

3.10.2 Radiação eletromagnética

São ondas eletromagnéticas de alta energia (grande poder de penetração) de origem nuclear, geradas por isótopos radioativos ou da interação de uma partícula com um átomo. A radiação eletromagnética (gama) de origem nuclear é produzida pelo excesso de energia no seu núcleo (estado excitado de energia), que ao passar para um estado de menor energia emitirá um fóton. Já no caso da interação da partícula de alta energia (elétrons com grande energia cinética) que interage com a camada eletrônica, a radiação eletromagnética é produzida com a desaceleração desta partícula pelo átomo.

Os mecanismos de lesão celular estão relacionados à transferência linear de energia (LET), fracionamento e radiossensibilidade do tecido, entretanto, a dose e taxa de dose são predominantes neste efeito. Quando a energia é absorvida pelo tecido, existe a probabilidade de interagir com estruturas primordiais da célula, tal como o DNA, sendo assim, é possível a manifestação de dois tipos de ação.

- Ação direta: é quando a energia da radiação é absorvida pelo DNA da célula, provocando um dano diretamente na estrutura dessa macromolécula;
- Ação indireta: é quando essa energia pode ser absorvida também por moléculas adjacentes ou vizinhas às macromoléculas-alvo, formando então os radicais livres, capazes de lesar o DNA.

Assim, e possível afirmar que o efeito biológico global e dos efeitos provocados pelas ações diretas e indiretas, em que diversos fatores podem interferir, tais como: a energia empregada, o tipo de tecido, etc.

3.11 Histologia

Estuda os tecidos do corpo e como eles se organizam para constituir órgãos. O procedimento mais usado no estudo de tecidos ao microscópio consiste na preparação de cortes histológicos.

No entanto, na maioria dos casos os tecidos são espessos e não permitem a passagem adequada da luz para formação da imagem; antes de serem examinados no microscópio devem ser realizados cortes histológicos muito delgados que são colocados sobre lâmina de vidro. Os cortes são obtidos por micrótomos, entretanto, antes os tecidos necessitam passar por vários tratamentos descritos a seguir.

- Fixação tem vários objetivos, dentre estes é evitar a digestão dos tecidos por enzimas ou em bactérias, endurecer os fragmentos e preservar a estrutura do tecido;
- Desidratação ocorre com a realização de vários banhos com solução crescente de etanol;
- Clareamento é realizado com a substituição do etanol por substância miscível intermediária, tanto em etanol como parafina ou resina. Na inclusão da parafina a substância intermediária mais comumente usada é o xilol. Quando os fragmentos de tecidos são imersos em solvente orgânico, elas ficam transparentes. A seguir são colocados em parafina derretida entre 56-60 °C, ocasionando a evaporação do solvente orgânico, e os espaços existentes dentro do tecido ficam preenchidos com parafina;
- Microtomia os fragmentos de tecido envolto em parafina são laminados no micrótomo na espessura almejada. Após são colocados em água quente para

retirada da parafina e posteriormente colocado sobre lâmina de vidro para coloração;

- Coloração o passo anterior à coloração é o banho com xilol para retirada de vestígios de parafina e imersão em soluções decrescente de etanol até a hidratação, para então ser usado um ou mais corantes específicos para evidenciar e diferenciar os componentes do tecido. Entre os corantes mais utilizados: a combinação de hematoxilina e eosina (HE) é a mais usada, onde a hematoxilina cora em azul ou violeta o núcleo das células e outras estruturas ácidas, a eosina cora o citoplasma e colágeno em rosa, tricrômica de Masson cora o núcleo da célula de castanho escuro a preto e o citoplasma cora com vermelho brilhante ou rosa, além de diferenciar colágeno de músculo e o Picro-sirius associado à luz polarizada é utilizado na diferenciação de colágeno.
- Montagem o corte é desidratado em soluções crescente de etanol, banho de xilol e coberto com lamínula, podendo então ser visualizado no microscópio óptico [70].

4 ESTUDOS PRELIMINARES

4.1 Modelo de radionecrose animal

4.1.1 Elaboração do sistema para irradiação animal

Com a existência de poucas técnicas para inibir o processo de necrose cutânea induzida (radionecrose) por radiação ionizante foi elaborado um suporte para irradiação animal (SIA) para ratos Wistar com base na experiência do modelo animal de radionecrose de camundongo Nude [**30**] e aferido por meio de um mapeamento dosimétrico.

Para fins da padronização e dosimetria de irradiação, foi considerado "sistema para irradiação animal (SIA)" o conjunto formado pelo imobilizador animal (IA), duas blindagens de chumbo e sua respectiva posição angular.

4.1.2 Dosimetria do SIA

A geometria de irradiação é constituída de três SIA_e SIA_{ref.} SIA_d iguais com seus respectivos deslocamentos angulares θ_e , $\theta_{ref.} e \theta_d$ para cada plano mediano da fonte, onde os subíndice <u>e</u>, <u>ref.</u> e <u>d</u> identificam as posições esquerdo, referência e direito com relação à fonte do irradiador (FIG. 8 e 9). Nestas figuras são mostrados 8 tijolos de chumbo com chevron (TCC), 5 x 10 x 12 cm³, posicionados entre a guia metálica da fonte do irradiador e o imobilizador animal (IA) com 2 TCC posicionado atrás IA formado por: cilindro de Polyvinyl chloride (Policloreto de vinila ou PVC) com 5 orifícios (8 mm de ϕ) ao longo de sua área lateral, 7,2 cm de $\phi_{externo}$, 19,5 cm de altura e duas tampas de borracha. O mapeamento dosimétrico foi realizado no irradiador Panorâmico (YOSHIZAWA) com fonte de ⁶⁰Co, tendo a superfície lateral do IA e a face, 5 x 10 cm², dos TCC entre a fonte e o IA tangentes ao plano mediano da fonte (PMF). As leituras das taxas de dose (TDs) foram medidas nos planos axiais nas posições de **1-4** nas alturas de 10,0 e 13,5-15,0 cm, em relação ao plano da mesa de irradiação, distante 18,7 cm da fonte do irradiador. As TDs foram obtidas com o eletrômetro Keithley modelo 617, diodo de Silício modelo SFH00206 e pelo *software* LabVIEWTM desenvolvido no IPEN/CTR.



FIGURA 8 – Vista de perfil do SIA_{ref}. Os círculos laranja indicam diferentes alturas dos tubos de quartzo com orifício para exposição da pele do rato. O retângulo tracejado em vermelho delimita os componentes do SIA..



FIGURA 9 – Vista superior do SIA_{ref.}. Deslocamentos angulares $\theta_d(90^\circ)$ do SIA_{d.}, $\theta_{ref.}(0^\circ)$ do SIA_{ref.} (coincidente com o PMF) e $\theta_e(270^\circ)$ do SIA_e. Os números de **1-4** identificam posições ocupadas pelo diodo (retângulo vermelho) durante a aferição da TD. O retângulo tracejado em vermelho delimita os componentes do SIA.

4.1.3 Resultado da dosimetria do SIA

Os valores das TDs presentes na TAB. 2 das Posições **2** não apresentaram variações significativas com relação à sua taxa de dose média (TDm) entre 13,5 a 15,0 cm de altura (FIG. 8), isto possibilitou a utilização de um valor fixo de TDm na irradiação dos animais ao longo do SIA. A variação entre as TDm das Posições **1** e **2** foram inferiores a 6,5%, sendo então fixada a TDm (1,277 Gy/min) da Posição **2** como valor de referência do experimento. A redução da TD no plano axial entre as Posições **2** e **3** (FIG. 9 e TAB. 2) foram superiores a 93%, assegurando a integridade física do rato durante a irradiação da pele da região dorsal. Os TCCs posicionados entre a guia metálica e o IA (FIG. 9) proporcionam proteção ao rato com relação à radiação primária e os TCCs posicionados na parte posterior do IA serviram como suporte mecânico e atenuação da radiação secundária.

| · · · · · · · · · · · · · · · · · · · | au regiue dorbur d | 0 1000 | | |
|---------------------------------------|--------------------|-----------|-----------|-----------|
| Altura (cm) | Posição 1 | Posição 2 | Posição 3 | Posição 4 |
| 15,0 | 1,367 | 1,275 | 0,087 | 0,000 |
| 14,5 | 1,355 | 1,278 | 0,089 | 0,000 |
| 14,0 | 1,353 | 1,264 | 0,083 | 0,000 |
| 13,5 | 1,386 | 1,291 | 0,078 | 0,000 |
| Média | 1,365 | 1,277 | 0,084 | - |
| Desvio | 0,013 | 0,010 | 0,004 | - |

TABELA 2 – Taxa de dose (Gy/min) nas posições **1-4** significativas para irradiação da região dorsal do rato.

A comparação dosimétrica entre os sistemas para irradiação do ratos Wistar e camundongos Nude, este último com correção teórica [82] para a mesma data da realização do ratos Wistar, esta descrita na TAB. 3.

TABELA 3 – Comparação entre as dosimetrias realizadas nos diferentes sistemas para irradiação nas respectivas posições de avaliação.

| | | 3 | 1 | 1 3 | 3 | | |
|--------|-------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|--|--|
| Animal | Altura (cm) | Taxa de dose (Gy/min) | | | | | |
| Wistar | 10 | Posição 1 1,399 | Posição 2 1,277 | Posição 3 0,079 | Posição 4 0,000 | | |
| Nude | 10 | Posição <u>1</u> 1,355* | Posição <u>2</u> 0,514* | Posição <u>3</u> 0,019* | Posição <u>4</u> 0,014* | | |

*valores corrigidos.

As diferenças na forma externa e tamanho dos imobilizadores dos ratos Wistar e camundongos Nude (FIG. 10) ocasionaram limitações na comparação entre as TDs no plano axial. A comparação somente foi possível entre as Posições 2 (Wistar) e $\underline{1}$ (Nude), pois ambas posições são tangentes ao plano mediano da fonte do irradiador, passando a ser as posições de referencia para comparação entre os SIAs.



FIGURA 10 - A: IA do rato Wistar e **B**: IA do camundongo Nude. Os marcadores em vermelho (1-4) indicam as posições ocupadas pelo diodo durante o mapeamento da TD.

4.1.4 Irradiação do ratos Wistar

Três **Ratos a-c** machos com idade de 4, 20, 9 semanas e pesando 294, 385 e 372 g foram mantidos em gaiolas individualizadas, ambiente climatizado (22 °C), luminosidade controlada com períodos de 12 horas de claro/escuro e alimentados sem restrição de água e ração, nas dependências do Biotério do IPEN. Os procedimentos adotados para o experimento foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) do IPEN, registrado sob o número 89/11/CEUA-IPEN/SP. Antes da irradiação, os ratos foram pesados, anestesiados (0,3 mL de xilazina e 0,4 mL quetanina) na região intramuscular da coxa e tricotomizados na região dorsal superior com o tricotomizador MULTIGRON PLUS (PHILIPS). Os ratos foram posicionados no IA e pinçada a pele da região dorsal através do tubo de quartzo a 13,5 cm do plano de irradiação da mesa e fixada por um ponto de sutura fixado no IA, sendo posteriormente irradiada com dose única de 85 Gy uma área de pele de 350 mm². Ao final da irradiação os ratos retornaram para o biotério em gaiolas individualizadas, sendo acompanhados a cada dois dias por meio de registro fotográfico, câmera digital DSC-W30 (SONY), da região dorsal irradiada e mensurada a área da radiodermite evidenciando a radionecrose até sua cicatrização.

4.1.5 Obtenção da radionecrose

O surgimento da radiodermite ocorreu após o 7° dia para os **Ratos a-c** com extensão máxima da radionecrose do **Rato a** no 16° dia e nos **Ratos b-c** no 18° dia após a irradiação. A cicatrização dos **Ratos a** e **c** ocorreram no 25° dia e no **Rato b** no 60° dia (FIG. 11) e na FIG. 12 é mostrada a extensão máxima da radionecrose nos ratos.



FIGURA 11 – Crescimento percentual da área da radiodermite dos Ratos a-c. Os pontos laranja identificam o inicio da radiodermite (7º dia) e os pontos vermelhos representam o dia de extensão máxima da radionecrose. O final de cada curva (azul, lilás, verde) indica o dia da cicatrização dos Ratos a-c respectivamente.

Na FIG. 12 é ilustrado o momento de maior extensão da radionecrose nos

Ratos a-c.



FIGURA 12 – É mostrada a extensão máxima da radionecrose na região dorsal do **Rato a** no 16° dia, **Rato b** no 18° dia e **Rato c** no 18° dia após a irradiação.

4.1.6 Conclusão sobre o modelo de radionecrose

Os resultados indicam que com dose de 85 Gy foi possível obter uma radionecrose cutânea, mantendo o rato saudável, sendo que a variação de massa dos ratos (294, 385 e 372 g) não foi significativa no processo de cicatrização da radionecrose. A idade parece ter maior influencia no processo de cicatrização, pois o **Rato b** tinha 20 semanas e os **Rato a** e **Rato c** tinham 4 e 9 semanas de idade, respectivamente. Durante o

período de experimento a única alteração apresentada foi o aparecimento da radionecrose, sendo assim, foi possível a obtenção do modelo de radionecrose para rato Wistar.

Os animais apresentaram bom estado de saúde sem aparecimento de sequelas na área irradiada até a realização da eutanásia.

Além disso, foi obervada a necessidade de aprimoramento do SIA referente às condições de bem estar do rato durante o processo de irradiação, otimização das dimensões e do número de blindagens e a posição angular dos SIAs em relação a fonte.

4.2 Estudo da variabilidade dos Aspersores

4.2.1 Administração de medicamento

A administração de medicamentos pode ser realizada por meio de diferentes vias: oral, sublingual, retal, intravenosa, subcutânea, intramuscular, intra-arterial, intratecal, intraperitoneal, absorção pulmonar e aplicação tópica, sendo a aplicação tópica caracterizada pela ação em área determinada e atuação direta [22]. Entre os vários instrumentos utilizados na aplicação tópica o aspersor manual (AM) possui grande relevância, por não produzir tensão mecânica sobre a superfície, realiza aspersões com volume praticamente constante e distribui uniformemente o medicamento sobre a superfície. As especificações técnicas do AM fornecidas pelo fabricante são parciais ou não estão disponíveis, nesta última justificada pelo comprometimento de segredo industrial.

Não sendo encontrada na literatura informação ou legislação específica para um manuseio confiável do AM, foram estabelecidas aferições com base nos critérios da ISO 9000 [83]. Para determinar as condições mínimas para utilização deste aspersor foram arbitradas as seguintes aferições: a primeira foi a identificação da repetibilidade do volume produzido pelo aspersor e a segunda foi a determinação da distância do centro aspersor manual a superfície aspergida (DCAMSA) que possibilite uma distribuição uniforme do liquido aspergido sobre a superfície.

4.2.2 Avaliação do aspersor manual

Foram avaliados aspersores manuais (AM) de seis fabricantes (9 modelos com 5 amostras por modelo) com base na ISO 9000 [**83**]. Os líquidos utilizados para aspersão foram água ultrapura processada pelo purificador Purelab Option-Q (ELGA LabWaterv) e soro fisiológico 0,9% (EQUIPLEX).

Primeira aferição foi a mensuração da repetibilidade do aspersor da seguinte forma: foi mensurada a massa do AM com a balança Analytical Plus (OHAUS) antes e após a realização de uma aspersão, sendo o procedimento de pesar e aspergir repetido 81 vezes. A massa do volume aspergido foi obtida com a diferença de massa (Δ m) entre duas aspersões consecutivas [**84**] e o volume aspergido foi obtido com a razão entre Δ m e densidade do liquido aspergido. As mensurações foram realizadas em três dias nas seguintes condições: ambiente fechado, mesmo operador e temperatura constante do ambiente. Não havendo informação na literatura sobre o valor aceitável para variação do volume (Δ V) aspergido, optou-se por utilizar como variação aceitável volume de ± 10% como foi apresentado na TAB. 4, 6º linha. Finalmente foi obtido um gráfico do volume aspergido em função do número de acionamentos.

Segunda aferição foi a obtenção da distribuição uniforme do volume aspergido sobre uma superfície da seguinte forma: aspersão de hematoxilina em superfície não dispersante (papel sulfite) com distância do centro do aspersor manual a superfície aspergida (DCAMSA) variando de 30, 50 e 70 mm. Esta ultima aferição foi realizada apenas para aspersores que demonstraram repetibilidade na primeira aferição.

As características dos aspersores manual aferidos estão presentes nas 5° e 6° linhas da TAB. 4.



*Informação verbal do fabricante no Brasil.

4.2.3 Resultado da aferição dos aspersores manuais

Nos 45 aspersores avaliados foram identificadas 4 diferentes características nas quais 2 aspersores com repetibilidade (RPT) no Grupo 1, 37 aspersores com falta de repetibilidade (FRP) no Grupo 2, 5 aspersores produziram apenas esguicho (NPA) no Grupo 3 e 1 aspersor quebrou durante o experimento (QDA) no Grupo 4. Na FIG. 13 é representada a distribuição dos aspersores segundo suas condições de funcionamento.



FIG. 13 – Resultado da aferição dos 45 aspersores. Grupo 1: 2 AM com repetibilidade, Grupo 2: 37 AM sem repetibilidade, Grupo 3: 5 AM com esguicho, Grupo 4: 1 AM quebrou.

4.2.4 Comportamento do volume aspergido pelos aspersores manuais

A FIG. 14 ilustra o comportamento do volume aspergido pelos aspersores (EBF-1 e D50-3) do Grupo 1, que apresentaram repetibilidade.



FIGURA 14 – Comportamento do volume aspergido com soro fisiológico (♦) e água (■), A: aspersor EBF-1 e B: D50-3, em função do nº de acionamento.





FIGURA 15 – Comportamento irregular do volume aspergido com água, C: aspersor COM-4 e D: aspersor EPY-3, em função do número de acionamentos.

Entre os 45 AM avaliados apenas EBF-1 e D50-3 demonstraram condições de uso por apresentarem repetibilidade nos volumes aspergidos. Na FIG. 14A os 5 primeiros volumes aspergidos por EBF-1 não são considerados aceitáveis para utilização, pois evidenciam variações significativas em relação aos demais volumes, de modo semelhante os 7 primeiros volumes aspergidos por D50-3 não são considerados (FIG. 14B).

4.2.5 Análise estatística dos aspersores manuais

Nas FIG. 16 e 17 são mostradas as distribuições do volume aspergido referente aos aspersores EBF-1 e D50-3 respectivamente. Além disso, o número ($\underline{\mathbf{n}}$) de volume analisado foi menor, causado pela eliminação das primeiras aspersões.



FIGURA 16 – Distribuição dos volumes aspergidos por EBF-1.



FIGURA 17 – Distribuição dos volumes aspergidos por D50-3.

A previsão de ser realizada uma aspersão pelo aspersor EBF-1 com um volume de 141 μ L e erro ± 2,5 μ L e o aspersor D50-3 um volume de 191 μ L e erro de ± 5,7 μ L, ambas terão uma confiança de 95%.

A diferença na dispersão entre EBF-1 e D50-3, foi possivelmente causada pelo maior número de manuseio de D50-3. Os valores de *outlier* em ambas as figuras são atribuídos a falhas do operador durante o experimento, além disso, as variações de volume (ΔV) destes aspersores são menores que 6%.

4.2.6 Uniformidade do volume sobre a superfície

Na TAB. 5 são apresentadas as áreas resultantes das aspersões com a distância entre o centro do AM e a superfície aspergida de 30, 50 e 70 mm com os aspersores EBF-1 e D50-3.

| EDI-1 e D30-3 ha supernete e suas respectivas areas. | | | | | | | |
|--|---|----------------------|----------------------|--|--|--|--|
| Aspersor | Distância entre o centro do aspersor e a superfície | | | | | | |
| Азрегзог | 30 mm | 30 mm 50 mm | | | | | |
| EBF-1 | 0 | 8 | N | | | | |
| | 784 mm² | 1650 mm ² | 2368 mm ² | | | | |
| D50-3 | 1130 mm ² | 2491 mm ² | 3645 mm ² | | | | |

TABELA 5 – Comportamento da distribuição do volume aspergido porEBF-1 e D50-3 na superfície e suas respectivas áreas.

4.2.7 Conclusão sobre a variabilidade dos aspersores

Entre os 45 AM avaliados apenas EBF-1 e D50-3 demonstraram condições de uso por apresentarem repetibilidade nos volumes aspergidos. Os 5 primeiros volumes aspergidos por EBF-1 não são considerados (FIG. 14A) aceitáveis para utilização, pois evidenciam variações significativas em relação aos demais volumes, de modo semelhante os 7 primeiros volumes aspergidos por D50-3 não são considerados (FIG. 14B). Os valores de *outlier* nas FIG. 16 e 17 são atribuídos a falhas do operador durante o experimento, além disso, a ΔV destes aspersores foi \leq a 6% do volume aspergido.

Inicialmente as aspersões nas diferentes distâncias apresentaram uma área superior a 350 mm² (item 4.1.3), entretanto, as aspersões em distâncias superiores a 30 mm demonstram uma distribuição irregular da aspersão, logo, concluí-se que ambos aspersores podem ser usados à distância de 30 mm.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Curvas de citotoxicidade

Os testes de citotoxicidade foram realizados para determinar o limiar de toxicidade da quercetina $3-\beta$ -D-Glicosideo (SIGMA-ALDRICH) e influência do seu diluente dimetilsulfóxido durante o armazenamento.

5.1.1 Diluição da quercetina

A quercetina 3- β -D-Glicosideo (QC) foi diluída primeiramente em dimetilsulfóxido (DMSO) obtendo-se a solução mãe SM(1) = 0,5 mol/L e as próximas diluições foram em meio de cultura celular, obtendo-se SM(2) = 20 mmol/L (20 μ L SM(1) + 480 μ L de K⁺) e SM(3) = 2 mmol/L (50 μ L de SM(2) + 450 μ L de K⁺).

As soluções foram utilizadas para preparar as diferentes diluições para os experimentos com base na literatura [**17, 21, 85-88**] ou para detectar a influência do DMSO na estocagem. As concentrações utilizadas variaram de 1 a 1000 μ mol/L, sendo a estocagem realizada em gás inerte, seguindo instruções da SIGMA-ALDRICH e temperatura de – 75°C.

5.1.2 Meio de cultura utilizado

Os meios de cultura foram denominados K+ (queratinócitos) e D10 (fibroblastos), ambos preparados no Laboratório de Cultura Celular do CTR/IPEN, com a seguinte composição:

- K+ é composto por meio DMEM (GIBCO 12800-017) e F12 (GIBCO 21700075) na proporção de 1:2, respectivamente, acrescido de 4 mmol/L L-Glutamina (GIBCO 25030-081), 100 U/mL penicilina, 100 µg/mL estreptomicina e 0,25 µg/mL anfotericina B (Invitrogen 15240-062), 10% de Soro Fetal Bovino (Hyclone, Fetal Clone III, Thermo Scientific), adenina (0,18 mmol/L), hidrocortisona (0,4 µg/mL), T3 (20 pmol/L), TC (0,1 nmol/L), insulina de pâncreas bovino (5 µg/mL) e EGF (10 ng/mL).
- D10 é composto por meio DMEM (GIBCO 12800-017) adicionado de 4 mmol/L L-Glutamina (GIBCO 25030-081), 100 U/mL penicilina, 100 μg/mL

estreptomicina e 0,25 μg/mL, anfotericina B (Invitrogen 15240-062) e 10% de Soro Fetal Bovino (GIBCO 16030-074).

5.1.3 Determinação da concentração não tóxica da QC

5.1.3.1 Queratinócitos

Inicialmente foram preenchidos todos os poços com 50 μ L de meio de cultura K+ e adicionados 25.000 células (alta densidade) de queratinócitos HK481 por poço nos 60 poços centrais e incubada a 37 °C a 5% de CO₂. Após 24 horas de cultivo, o meio de cultura foi removido e adicionado 100 μ L das diluições (50, 75, 100, 200, 250, 500, 1000 μ mol/L) de QC e DMSO, sendo deixado em contato por 24 horas e após iniciado o teste de viabilidade celular.

5.1.3.2 Fibroblastos

Seguindo o protocolo, BALB/c NRU Cytotoxicity Test Method n° 07-4519, foram preenchidos todos os poços com 50 μ L de meio de cultura D10 e adicionados 10.000 células BALB/c-3T3 (ATCC, CCL 163) [**89**] por poço nos 60 poços centrais e incubada a 37 °C a 5% de CO₂. Após 24 horas de cultivo, o meio de cultura foi removido e adicionado 100 μ L das diluições (75, 150, 250 e 750 μ mol/L) de QC e DMSO, sendo deixado em contato por 1 ou 24 horas e após iniciado o teste de viabilidade celular.

5.1.4 Leitura da Viabilidade Celular

Para aferição da viabilidade celular, foram removidos os meios de cultura com as diluições colocadas anteriormente e substituídos por meio de cultura adicionado de 20% do composto tetrazólio 3-(4,5-di-metiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2H-tetrazólio (MTS) e 1% de fenazina metasulfato (PMS) com incubação por 3 horas para posteriormente ser feita a leitura no espectrofotômetro com filtro de 490 nm.

5.2 Irradiação celular

5.2.1 Dosimetria da Placa de 96 poços

Dosímetros de alaninas da AERIAL, com 3 mm³ (FIG. 18), foram posicionados nos 96 poços da placa. O poço referência E7 (FIG. 19), cor vermelha, foi

posicionado a 17,7 cm da fonte do irradiador gama Panorâmico (YOSHIZAWA) a 13,5 cm de altura em relação ao plano de irradiação da mesa e irradiadas com dose de 85 Gy.

As doses nos poços foram aferidas mediante leituras dos sinais *Electronic Paramagnetic Resonance* [**90-91**] no espectrômetro MiniScope (MT MAGNETTECH) utilizando software dedicado AerEDE da AERIAL[®]. Os parâmetros de medida empregados no espectrômetro foram: campo magnético de 3358 G, em intervalo de 30 G, potência de micro-ondas de 10 mW e tempo de varredura de 12 segundos. Em todas as leituras foram utilizadas amostras de referência de 100 Gy.



FIGURA 18 – Vista superior da dimensão do dosímetro de alanina da AERIAL utilizada na dosimetria.
Fonte: Autor da tese.



FIGURA 19 – Posição do poço referência () na dosimetria da placa de 96 poços. Fonte: Autor da tese.

5.2.2 Proteção celular pela quercetina

A escolha das condições de dose para irradiação, momento de aplicação e concentração da QC, necessárias para maximização da proteção das células no processo de irradiação foi realizada segundo o fluxograma da FIG. 20.



FIGURA 20 – Fluxograma de alternativas que foram avaliadas para obtenção da melhor condição de proteção da QC nas células, durante o processo de irradiação.

Estes experimentos foram realizados utilizando os fibroblastos BALB/c-3T3 (ATCC, CCL 163), mantendo as mesmas condições de cultivo do item 5.1.3.2, utilizando apenas os poços das placas com variação dosimétrica de \pm 5%. A coloração com MTS seguiu o protocolo do item 5.1.4. A avaliação estatística dos ensaios *in vitro* nos itens 5.1.3 e 5.2.2 foram realizadas por meio da análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey.

5.3 Elaboração do modelo de radionecrose animal

Com base no modelo animal de radionecrose para camundongos Nude [**30**] foi obtido um modelo animal de radionecrose para ratos Wistar, como descrito no item 4.1, sendo constatada a necessidade de mudanças no SIA para aprimoramento da dosimetria, melhor acomodação dos animais e irradiação da pele animal. As mudanças feitas são listadas a seguir:

- Acréscimo de orifícios ao longo do imobilizador;
- Redução do número de blindagens;
- Mudança na espessura da blindagem;
- Escolha das angulações entre os PMF;
- Mudança do sistema de dosimétrico para mensuração da dose.

5.3.1 Elaboração do suporte para irradiação animal

A partir da experiência obtida com suporte para irradiação de camundongos Nude [**30**] em trabalhos realizados no Laboratório de Tecido Biológicos do CTR/IPEN foi elaborado um SIA para rato Wistar, sendo mantida a tangência do campo de radiação na superfície do IA e blindagem.

5.3.2 Imobilizador animal do rato Wistar

É constituído de um cilindro de PVC com 7,2 cm de diâmetro externo, 19,5 cm de altura e duas tampas de borracha para contenção, as quais permitem o confinamento adequado do rato. O IA é dotado de seis orifícios, com 8 mm de diâmetro que permite pinçar através do tubo de quartzo a porção de pele que será irradiada. O imobilizador do ratos Wistar é aproximadamente três vezes maior que o imobilizador do camundongo Nude (FIG. 21).



FIGURA 21 – A: imobilizador animal do camundongo Nude e B: imobilizador animal do rato Wistar.
Fonte: Autor da tese.

5.3.3 Geometria de irradiação dos SIAs

A geometria de irradiação (FIG. 22) é constituída por três SIAs semelhantes denominados: SIA_{ref}, SIA_d e SIA_e, onde os índices (ref., d, e) representam as posições referência, direita e esquerda ocupadas pelos sistemas para irradiação animal (SIAs) em relação à fonte de cobalto-60. O SIA é constituído por duas blindagens de chumbo: bloco **A**, 9 x 10 x 20 cm³, posicionado entre a guia metálica da fonte do irradiador Panorâmico e o IA; bloco **B**, 5 x 10 x 20 cm³, posicionado na parte posterior do IA. A face do bloco **A**, 9 x 20 cm², e a superfície lateral do IA são tangentes ao plano mediano da fonte (PMF) [**92**], representado pela linha tracejada com deslocamento angular (θ_{ref} , θ_d , e θ_e) obtido no sentido horário. Foram posicionadas 20 alaninas no interior (posições **3-7**) e 12 alaninas no seu exterior (posições **1-2**) do IA, em planos axiais perpendiculares ao longo do IA em alturas 10-15 e 19,5 cm em relação ao plano de irradiação da mesa. A distância de 17,7 cm entre a fonte do irradiador e a posição **2** ocupada pela alanina.



FIGURA 22 – Ilustração da vista superior da geometria de irradiação. Os números de **1-7** indicam as posições ocupadas pelas alaninas (retângulos vermelhos) durante a irradiação no IA. O deslocamento angular $\theta_e(265,5^\circ)$, $\theta_{ref.}(18^\circ)$, $\theta_d(96^\circ)$ do PMF de cada SIA e os blocos de chumbo **A** e **B** também são apresentados.

Fonte: Autor da tese.

5.3.4 Dosimetria da geometria de irradiação dos SIAs

As pastilhas alaninas foram fixadas nas posições de **1-7** em planos axiais, perpendicular no IA e irradiadas com dose única de 85 Gy nas alturas de 10-15 e 19,5 cm. A distância **a** representa a altura do tubo de quartzo, entre as posições de **1-2** (FIG. 22), que identifica a posição [**93-94**] ocupada pela porção de pele a ser irradiada e as posições **3-7** identificam os pontos considerados significativos para integridade física [**80, 95-96**] do

rato durante a irradiação (FIG. 22 e 23). A leitura dos dosímetros de alaninas foram realizadas no espectrômetro MiniScope com parâmetros idênticos aos utilizados na obtenção de dose na placa de 96 poços (item 5.2.1).



FIGURA 23 – A: Vista superior dos SIAs com o posicionamento dos dosímetros de alaninas nas alturas de 10-15 cm nas posições externas 1-2, sendo as posições internas 3-7 ilustradas na FIG. 22 e B: Vista de perfil do SIA com fixação do fio de sutura.

Fonte: Autor da tese.

5.3.5 Irradiação da pele da região dorsal superior do rato

Os procedimentos adotados para utilização dos **Ratos 1-21** foram os mesmos aprovados pelo CEUA para os ratos pilotos (item 4.1.4).

Os vinte e um ratos Wistar (**Ratos 1-21**) machos tiveram como procedimento comum a permanência em gaiolas individualizada em ambiente climatizado (21 °C) com luminosidade controlada com período de 12 horas de claro e 12 horas de escuro, sendo alimentados sem restrição com água e ração no biotério do IPEN/CNEN-SP.

Todos os ratos foram sujeitos a seguinte condição de pré-irradiação (CPI): inicialmente pesados, anestesiados (0,4 mL quetanina, 0,3 mL xilazina e 0,2 mL apromazin) na região intramuscular da coxa, após o inicio do relaxamento foram tricotomizados na região dorsal superior com MULTIGRON PLUS, aspergidos com solução, posicionados no imobilizador animal, pinçada 350 mm² de pele através do tubo de quartzo, sendo fixada com fio de sutura (FIG. 23**B**) e irradiados com dose única de 85 Gy.

5.3.5.1 Determinação da radionecrose no estudo piloto com os Ratos a-c

As condições para obtenção da radionecrose nos **Ratos a-c** foram descritas no item 4.1. O acompanhamento após a cicatrização da radionecrose foi realizado uma vez por semana até a realização da eutanásia [**97**].

5.4 Efeito da aplicação in vivo de QC

5.4.1 Irradiação dos ratos com aplicação de QC

Os vinte e um ratos (**Ratos 1-21**) foram divididos em dois grupos, a saber: no 1° grupo **Ratos 1-12** e 2° grupo **Ratos 13-21**. As particularidades das CPI dos **Ratos 1-21** foram: idade de 8 semanas, massa de 277 ± 19 g, anestesiados com 0,4 mL quetamina, 0,3 mL xilazina, 0,2 mL apromazin e aspergidos com soluções de DMSO e QC em soro fisiológico 0,9% (EQUIPLEX) na região dorsal superior com o AM.

Os **Ratos 1-12** foram subdivididos em dois subgrupos: no primeiro subgrupo os **Ratos 1-6** foram aspergidos com solução de DMSO, sendo os **Ratos 1-3** irradiados e **Ratos 4-6** não irradiados. No segundo subgrupo os **Ratos 7-12** foram aspergidos com solução de QC (250 µmol/L), sendo os **Ratos 9-10** irradiados e os **Ratos 7, 11-12** não irradiados.

Os **Ratos 13-21** foram subdivididos em três subgrupos: no primeiro subgrupo os **Ratos 13-15** foram aspergidos com solução de DMSO e irradiados, no segundo subgrupo os **Ratos 16-18** foram apenas aspergidos com QC (500 μ mol/L) e não irradiados e o subgrupo três os **Ratos 19-21** aspergidos com solução de QC (500 μ mol/L) e irradiados.

5.4.2 Procedimento após o período de irradiação

A região dorsal dos ratos foi limpa com soro fisiológico para retirada dos vestígios das soluções aspergidas e os mesmos colocados em decúbito ventral sobre uma faixa térmica (BIOTERM) a 38 °C (FIG. 24) até o final da ação anestésica. A redução da temperatura corporal dos ratos durante os períodos pré e pós-irradiação [**98**] foi minimizada mantendo as salas de preparo e irradiação com temperatura maior ou igual a 29 °C. Com a conclusão da anestesia dos ratos, estes retornaram para o biotério.



FIGURA 24 – Posição dos ratos sobre a faixa térmica após a finalização da irradiação até o final da ação anestésica.

5.4.3 Avaliação da proteção pela QC na pele da região dorsal do rato irradiado

A avaliação aconteceu em duas fases: na primeira fase foi realizado o registro fotográfico diário da evolução da radiodermite, mensuração da área da ferida e análise da evolução da ferida e na segunda fase foi retirada uma biopsia de $2,5 \times 1,5 \text{ cm}^2$ de pele da área correspondente à ferida, após 48 horas da sua cicatrização. Como controle, nos ratos não irradiados a biópsia foi no local da passagem do fio de sutura. Após a retirada da pele os ratos foram eutanasiados e as amostras enviadas para análise histológica.

5.4.3.1 Registro fotográfico da região de radionecrose

A partir do primeiro dia após a irradiação foi iniciado o registro da radiodermite da pele dos ratos, utilizando o sistema para obtenção de imagem (NIKON) com a distância câmera-mesa fixa (FIG. 25), além disso, para mensurar a extensão da ferida que demonstrou alteração devido a radiação e o fio de sutura foi utilizado o *software ImageJ* [**99**].



FIGURA 25 – Da esquerda para direita é ilustrada a vista frontal e perfil do sistema de obtenção de imagem da região dorsal do rato.

5.4.3.2 Analise histológica da pele

Concluído o registro de cicatrização, com identificação visual, foi realizada após 48 horas a remoção de amostras de pele com 2,5 x 1,5 cm² da região dorsal dos **Ratos 1-21**, tendo como referência para retirada o ponto onde foi passado o fio de sutura. Após a remoção da pele os ratos foram eutanásiados com anestésico e dióxido de carbono [**97**].

As amostras foram fixadas em paraformaldeído (4% em tampão de cacodilato de sódio – pH 7,2) por 72 horas, lavadas em PBS (3 vezes em 10 minutos cada). Desidratadas em soluções crescentes de álcool 70% ate álcool absoluto, sendo a diafanização em xilol realizada em três etapas de 30 minutos. Os fragmentos diafanizados foram colocados em parafina liquida e mantidos em estufa a 60 °C por duas horas. Após o banho de parafina, o material foi emblocado em parafina derretida. Os blocos foram resfriados e mantidos em temperatura ambiente. Os cortes dos blocos foram realizados no micrótomo Leica RM2255 (Leica Microsystens) com espessura de 5 μ m, e pescados em banho histológico a 40 °C com lâminas convencionais EasyPath (Erviegas).

As laminas foram desparafinizadas em estufa a 60 °C, seguindo de três banhos de cinco minutos em xilol, e quatro banhos em álcool absoluto. Posteriormente, as laminas foram imersas em hematoxilina de Mayer (Merck) por quatro minutos, mergulhadas rapidamente em tampão diferenciado (álcool 70°), lavadas em água corrente e coradas em eosina (Merck) por quatro minutos. Após a coloração, as laminas foram lavadas e desidratadas com quatro banhos de álcool absoluto e três banhos de xilol. Após secagem as laminas foram montadas em resina de Permount (Fisher Scientific).

Estes procedimentos foram realizados nos Laboratórios de Patologia da Faculdade de Odontologia da USP e no Centro de Biotecnologia do IPEN/USP.

A coloração com o corante Picro-sírius Red foi feita pelo biólogo Paulo César Simões no Laboratório de Histotecnologia do CTCMol/Bioquímica/UNIFESP (Universidade Federal de São Paulo).

6 RESULTADOS

6.1 Citotoxidade da Quercetina

Nos primeiros experimentos não foi evidenciada uma concentração citotóxica da QC, resultados estes não condizentes com a literatura. Para afastar a possibilidade de uma possível instabilidade química da QC, a sua integridade foi confirmada por meio de Espectrofotometria, Espectroscopia RAMAN e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), onde os resultados confirmaram a quercetina não estava degradada, mas sim em quantidade inferior àquela designada pelo fabricante (APÊNDICE A).

Foi concluído que houve uma redução de 30% na massa do recipiente em relação ao especificado pela SIGMA-ALDRICH, sendo assim, para os novos experimentos a QC foi pesada e realizada novas diluições de SM(1), SM(2) e SM(3).

6.1.1 Determinação da concentração não tóxica de QC em queratinócitos

No experimento (FIG. 26A) a partir de SM(2) foram testadas concentrações de 50, 75, 100 e 250 μ mol/L, observando que para valores inferiores 100 μ mol/L não foram detectados valores de viabilidade celular diferentes do controle, entretanto, foi obtido uma variação da viabilidade celular para concentração de 250 μ mol/L (89%). Foi realizado experimento com concentrações de 100 a 1000 μ mol/L (FIG. 26B), obtendo-se certa variação de viabilidade celular desde a concentração de 100 μ mol/L (84,9%). Em todos os experimentos foi utilizado o tempo de contato de 24 horas e leitura após outras 24 horas.



FIGURA 26 – Percentual de viabilidade da QC dos queratinócitos. A: Concentrações variando de 50 a 250 µmol/L e B: Concentrações variando de 100 a 1000 µmol/L. As linhas tracejadas representam a variação do controle.

6.1.1.1 Estatística das curvas de viabilidade celular da QC e DMSO em queratinócitos

Na FIG. 26A1 a concentração de 250 µmol/L de QC apresentou variabilidade celular significativa em relação ao seu controle e na FIG. 26B1 as concentrações de QC apresentaram variabilidades celular diferente em relação ao seu controle, já nas FIG. 26A2 e 26B2 as viabilidades celular das concentrações de DMSO demonstram estar dentro da variação do seu controle, conforme descrição estatística apresentada a seguir (FIG. 27 e 28).



FIGURA 27 – Distribuição da viabilidade celular em queratinócitos. A1: Concentrações de QC e A2: Concentrações de DMSO ambas variando de 50-250 µmol/L, B1: Concentrações de QC e B2: Concentrações de DMSO ambas variando de 100 a 1000 µmol/L.

A análise de variância constatou que ao nível de 5% de significância não houve diferença significativa entre as concentrações de DMSO (FIG. 26A2 e 26B2) e seus respectivos controles com confiança de 95%.

A análise de variância constatou que ao nível de 5% de significância, pelo menos uma das concentrações de QC (FIG. 27A1) difere do seu controle com confiança de

95%. O teste de Tukey confirmou uma diferença entre a concentração QC (250 μ mol/L) e seu controle com confiança de 95% (FIG. 28).



FIGURA 28 – A linha tracejada (cor laranja) identifica a concentração de QC (250 µmol/L) que difere do seu controle.

6.1.2 Determinação da concentração não tóxica de quercetina em fibroblastos

Após o contato da QC com os fibroblastos por 1 e 24 horas não foram detectados valores de viabilidade celular diferentes do controle, mesmo com tempo de cultivo de 7 dias (FIG. 29).



FIGURA 29 – Percentual de viabilidade da QC para diluição SM(2) para concentrações variando de 75 a 750 µmol/L. As linhas tracejadas representam a variação do controle.

6.1.2.1 Análise estatística das curvas do percentual de viabilidade dos fibroblastos

As viabilidades celulares das concentrações de QC com cultivo de 2 dias (FIG. 30C2) e 7 dias (FIG. 30C3 e 30C4) demonstram estar dentro da variação do controle. Já a viabilidade celular da concentração de 150 µmol/L de QC com cultivo de 2 dias (FIG. 30C1) apresentou variabilidade celular em relação ao seu controle .



FIGURA 30 – Distribuição de viabilidade celular dos fibroblastos. C1 e C3: Concentrações de QC variando de 75 a 750 μmol/L, C2 e C4: Concentrações de QC com 75 e 150 μmol/L.

A análise de variância constatou que ao nível de 5% de significância não houve diferença significativa entre as concentrações de QC com 1 h/leitura 7dias, 24 h/leitura 7dias, 24 h/leitura 2dias (FIG. 30**C2**, FIG. 30**C3**, FIG. 30**C4**) e seus respectivos controles com 95% de confiança.

A análise de variância indica que ao nível de 5% de significância, pelo menos uma das concentrações de QC (FIG. 30C1) difere do seu controle com confiança de 95%. O

teste de Tukey confirmou uma diferença entre a concentração de 150 µmol/L de QC em relação ao seu controle com 95% de confiança (FIG. 31).



FIGURA 31 – A linha tracejada (cor laranja) identifica a concentração de QC (150 µmol/L) que difere do seu controle.

6.2 Irradiação das células

6.2.1 Dosimetria da Placa de 96 poços

O percentual de dose da placa foi obtido com a normalização das doses dos poços em relação ao poço referencia E7 (FIG. 9), sendo considerados percentuais de dose aceitáveis aqueles com variação de \pm 5% [**96**] em relação ao percentual do poço referencia (TAB. 6).

TABELA 6 – Percentual de dose da placa de 96 poços. Os valores em negrito representam os percentuais com variação entre ± 5% em relação ao poço referência.

| | | ICICIC | Jine ia. | | | | | | | | | |
|---|-------|--------|----------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
| А | 63,4 | 64,6 | 65,9 | 65,9 | 67,1 | 67,1 | 67,1 | 67,1 | 65,9 | 65,9 | 64,6 | 62,2 |
| В | 70,7 | 72,0 | 73,2 | 72,0 | 73,2 | 72,0 | 74,4 | 73,2 | 73,2 | 72,0 | 72,0 | 69,5 |
| С | 78,0 | 79,3 | 81,7 | 81,7 | 80,5 | 80,5 | 81,7 | 81,7 | 80,5 | 79,3 | 79,3 | 75,6 |
| D | 85,4 | 86,6 | 89,0 | 89,0 | 90,2 | 90,2 | 90,2 | 89,0 | 89,0 | 86,6 | 86,6 | 84,1 |
| Ε | 92,7 | 97,6 | 98,8 | 100,0 | 100,0 | 100,0 | 100,0 | 100,0 | 98,8 | 97,6 | 96,3 | 92,7 |
| F | 102,4 | 106,1 | 111,0 | 111,0 | 109,8 | 109,8 | 108,5 | 109,8 | 107,3 | 103,7 | 103,7 | 101,2 |
| G | 113,4 | 117,1 | 118,3 | 122,0 | 123,2 | 122,0 | 122,0 | 120,7 | 119,5 | 114,6 | 114,6 | 111,0 |
| Η | 125,6 | 129,3 | 132,9 | 135,4 | 135,4 | 136,6 | 139,0 | 136,6 | 134,1 | 129,3 | 126,8 | 123,2 |

Sendo assim, para os experimentos a seguir foram semeadas células somente nos poços E2 a E11.

6.2.2 Definição da dose de irradiação

No primeiro e segundo experimentos com queratinócitos foram utilizadas doses de 85 a 500 Gy, as quais não produziram inativação significativa após cultivo de 2 dias, este problema foi posteriormente identificado como causado por irregularidades no fluxo de CO₂. A partir deste momento, para evitar a variação de resultados, típica de culturas primárias, optou-se por utilizar linhagem pré-estabelecida de fibroblastos murinos BALB/c 3T3, verificando também, a viabilidade celular após cultivo de 7 dias.

Dois dias após a irradiação, a viabilidade dos fibroblastos foi de 73,1%; 73,7% e 74,1%, para as doses de 85, 100 e 150 Gy, respectivamente. Após 7 dias de cultivo, estes valores foram de 50,8%; 49,9% e 48,6% (FIG. 32).



FIGURA 32 – Percentual de viabilidade dos fibroblastos irradiados com doses de 85, 100 e 150 Gy após 2 e 7 dias de cultivo. As linhas tracejadas representam a variação do controle.

Na FIG. 32 é mostrado que os fibroblastos apresentaram maior sensibilidade à radiação foram aqueles cultivados por 7 dias com aproximadamente 50% de morte celular para as três doses.

6.2.2.1 Análise estatística das doses de irradiação

Pelo resultado obtido na FIG. 33**D1** e 33**D2** ambas apresentam uma redução na viabilidade celular em relação aos seus respectivos controles para as doses de 85, 100 e 150 Gy, contudo, a redução da viabilidade celular foi maior para células cultivadas por 7 dias.



FIGURA 33 – Distribuição da viabilidade celular dos fibroblastos. **D1** e **D2**: Doses de irradiação (85, 100 e 150 Gy) com cultivo de 2 e 7 dias respectivamente.

A análise de variância indica que ao nível de 5% de significância, pelo menos uma das concentrações de QC (FIG. 33**D2**) difere do seu controle com confiança de 95%. O teste de Tukey (FIG. 34) mostra que as doses (85, 100 e 150 Gy) são estatisticamente iguais com confiança de 95%.

As doses escolhidas foram 100 e 150 Gy por assegurar a uniformidade da resposta celular.



FIGURA 34 – A linha tracejada (cor laranja) identifica a equivalência estatística entre as doses de irradiação após 7 dias de cultivo.

6.2.3 Determinação do momento de aplicação da QC

A QC foi aplicada com concentrações de 75 e 150 μmol/L, segundo as condições do momento de aplicação (fluxograma, FIG. 10), resultando em dois momentos, 1 hora antes e 1 hora depois da irradiação, na maximização da proteção (FIG. 35).



FIGURA 35 – Percentual de viabilidade dos fibroblastos irradiados a 100 e 150 Gy, adição de concentrações de 75 e 150 µmol/L e variação do tempo de contato. As linhas tracejadas representam a variação do controle.
6.2.3.1 Análise estatística do momento de aplicação da QC

Apenas o grupo irradiado com 150 Gy e aplicação de 75 µmol/L (FIG. 36E3) foi o único que apresentou proteção para todos os momentos de aplicação da QC, já os demais grupos não apresentaram proteção no momento de aplicação de 24 horas (antes ou depois).



FIGURA 36 – Distribuição da viabilidade celular dos fibroblastos com contato 24h e 1h antes e 1h e 24h após a irradiação.

A análise de variância indica que ao nível de 5% de significância, pelo menos um dos percentuais de viabilidade celular para concentrações de 75 e 150 µmol/L difere do percentual de viabilidade celular sem QC com confiança de 95%. A representação gráfica do teste de Tukey (FIG. 37) mostra que os percentuais de viabilidade celular para 1 hora antes e depois são estatisticamente iguais com confiança de 95%.



100 Gy 150 µmol/L

FIGURA 37 – A linha tracejada (cor laranja) identifica a equivalência estatística entre os instantes de 1 hora antes e depois da aplicação da QC.

Como os instantes de aplicação da QC para 1 hora antes e 1 hora depois são estatisticamente iguais. A escolha do momento da aplicação da QC visando a melhor proteção foi 1hora antes, pois possibilita melhor controle operacional.

6.2.4 Concentração ideal da QC para proteção celular

Levando em consideração que basta 1 hora de contato da quercetina com as células, para a radioproteção das mesmas, foram testadas concentrações de 75, 150, 250 e 750 µmol/L e verificado o seu potencial protetor da irradiação, após 7 dias (FIG. 38).



FIGURA 38 – Percentual de viabilidade dos fibroblastos irradiados a 100 e 150 Gy, adição de concentrações de 75 a 750 µmol/L. As linhas tracejadas representam a variação do controle.

A melhor dose para observar a radioproteção foi a de 150 Gy. Nesta dose não foram observadas variações do porcentual de viabilidade celular nas concentrações testadas (75, 150, 250 e 750 μmol/L), porém, para cada concentração, em relação ao seu controle não irradiado, foi observado um aumento de 22,5%; 19,9%; 24,8% e 23,3%, respectivamente.

6.2.4.1 Análise estatística das concentrações de QC

Pelo resultado obtido na FIG. 39**F1** a concentração de 150 μ mol/L não demonstrou proteção significativa em relação ao seu controle, além disso, as outras concentrações (75, 250 e 750 μ mol/L) demonstraram maior proteção em relação ao controle. Já em 39**F2** as concentrações 75, 250 e 750 μ mol/L demonstraram proteção praticamente igual e superior ao seu controle.



FIGURA 39 – Distribuição da viabilidade celular dos fibroblastos para concentrações de 75 a 750 μmol/L irradiadas com dose de 100-150 Gy.

As análises de variância constatou que ao nível de 5% de significância pelo menos uma das concentrações (75, 150, 250 e 750 μ mol/L) de 39**F1** e 39**F2** difere do controle com confiança de 95%. Usando o teste de Tukey foram identificadas as diferenças entre pares de concentrações utilizadas para irradiação de 100 e 150 Gy.



FIGURA 40 – As linhas tracejadas (cor laranja) identificam a equivalência estatística entre as concentrações (75 a 750 µmol/L) de QC.

Como as concentrações são estatisticamente iguais entre si, assim sendo, foram arbitradas concentrações não limítrofes de 250 e 500 µmol/L.

6.3 Padronização do modelo de radionecrose animal

Para gerar radionecrose na região dorsal do ratos Wistar foi necessário a repadronização do modelo animal de radionecrose obtido no item 4.1 com base nas mudanças sugeridas no item 5.3 (5.3.1 a 5.3.4).

6.3.1 Dosimetria da geometria de irradiação

Na TAB. 7 as angulações θ_{ref} , θ_d , θ_e propiciaram a minimização da contribuição da radiação secundária entre os SIAs. A variação da dose ao longo dos orifícios (alturas de 10-15 cm) da posição **2** possibilitou o uso de qualquer destes orifícios sem variação significativa na dose em qualquer altura. As doses obtidas nas posições consideradas relevantes para obtenção da radionecrose (posições **1** e **2**) e integridade física do rato (posições **3-7**). Doses das posições **1** e **2** inferiores a 85 Gy foram causadas pela proximidade das pastilhas de alanina com a blindagem **A** (FIG. 22 e 23A). As doses médias nas posições **1** (3° e 4° colunas) apresentam pouca variação entre elas, isto possibilita a substituição destas pela média das doses da posição **1** nos SIAs. A redução da dose média na posição **3** (interna), em relação à posição **2** (externa), nos IA_{ref.}, IA_e e IA_d foi 88%, 89% e 85% respectivamente. As doses baixas nas posições de **4-7** (internas) não são consideradas significativas para efeito de radioproteção [**80**, **95**], além disso, as posições **6-7** podem ser desconsideradas, já que o focinho do rato não alcança 17 cm de altura quando posicionado no interior do IA.

| Angulação de | Altura | Altura Dose (Gy) nas posições de aferição | | | | | | |
|-----------------------------|-------------------|---|----|----|---|---|---|---|
| irradiação do SIA | (cm) | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 |
| | 15 | 69 | * | 5 | 3 | 3 | - | - |
| | 14 | 79 | 69 | 7 | 4 | 3 | - | - |
| | 13 | 82 | 65 | 9 | 3 | 3 | - | - |
| | 12 | 81 | 72 | 8 | 4 | 3 | - | - |
| $\theta_{\rm e} = 265, 5^0$ | 11 | 80 | 72 | 7 | 4 | 3 | - | - |
| č , | 10 | 78 | 70 | 7 | 3 | 3 | - | - |
| | 19,5 | - | - | - | - | - | 4 | 4 |
| | Média | 78 | 70 | 8 | 4 | 3 | - | - |
| | $\sigma_{ m d}$ | 5 | 3 | 1 | 1 | 0 | - | - |
| | 15 | 77 | 61 | 7 | 3 | 3 | - | - |
| | 14 | 77 | 64 | 8 | 4 | 3 | - | - |
| | 13 | 78 | 63 | 8 | 4 | 3 | - | - |
| | 12 | 79 | 66 | 9 | 4 | 3 | - | - |
| $\theta_{\rm ref.} = 18^0$ | 11 | 78 | 64 | 8 | 4 | 3 | - | - |
| | 10 | 78 | 63 | 8 | 4 | 4 | - | - |
| | 19,5 | - | - | - | - | - | 4 | 4 |
| | Média | 78 | 64 | 8 | 4 | 3 | - | - |
| | σ _{ref.} | 1 | 2 | 1 | 0 | 0 | - | - |
| | 15 | 78 | 67 | 9 | 3 | 3 | - | - |
| $\theta_d = 96^0$ | 14 | 78 | 68 | 8 | 4 | 3 | - | - |
| | 13 | 77 | 70 | 11 | 4 | 3 | - | - |
| | 12 | 79 | 69 | 11 | 3 | 3 | - | - |
| | 11 | 75 | 69 | 10 | 3 | 3 | - | - |
| | 10 | 77 | 67 | 10 | 3 | 3 | - | - |
| | 19,5 | - | - | - | - | - | 4 | 4 |
| | Média | 77 | 68 | 10 | 3 | 3 | - | - |
| | σ _e | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | - | - |

TABELA 7 – Doses nas posições relevantes no suporte de irradiação animal para exposição da pele da região dorsal.

* Valor perdido.

6.3.2 Estudo piloto da irradiação dos Ratos

A irradiação da região dorsal dos ratos foi realizada segundo os itens 4.1.4 a 4.1.6.

6.3.3 Avaliação da proteção pela QC

Foi avaliada por meio de acompanhamento fotográfico, mensuração da área da ferida, análise da tendência de evolução da ferida e análise histológica utilizando a coloração com Picro-sírius.

6.3.3.1 Acompanhamento fotográfico da ferida



6.3.3.1a Acompanhamento fotográfico da ferida dos ratos não irradiado

FIGURA 41 - Acompanhamento fotográfico das feridas com aplicação de DMSO nos Ratos 4, 6, Rato 7, 11-12 com aplicação de QC (250 µmol/L) e nos Ratos 16, 18 com aplicação de QC (500 µmol/L).

6.3.3.1b Acompanhamento fotográfico dos ratos irradiados no primeiro experimento.

Na impossibilidade de classificar a radiodermite em 4 graus, como para os humanos [33], foi elaborada uma nova classificação (TAB. 8) que definisse a radiodemite dos ratos em 3 graus.

| TABELA 8 – Classificação da radiodermite para ratos Wistar. | | | | | |
|---|--|----------------------|--|--|--|
| Grau 1 | Grau 2 | Grau 3 | | | |
| Eritema fraco ou descamação seca. | Eritema de evolução moderada a rápida; descamação úmida; sangramento induzido por menor trauma ou abrasão. | Radionecrose da pele | | | |

As FIG. 42 ilustra o acompanhamento fotográfico da evolução da radiodermite nos Ratos 2, 9-10, com manifestação de radionecrose apenas no Rato 2 no 13º dia após a irradiação e ação protetora da QC nos Ratos 9-10.

| Aplicação | Rato | Grau 1 | Grau 2 | Grau 3 | Início da cicatrização | Cicatrizado |
|------------------|------|--|---------|---------|---------------------------|-------------|
| DMSO | 2 | 4° dia | 9° dia | 13° dia | 15° dia | 28° dia |
| | | 1/2 | N.S. | | | 4. |
| QC 250 µmol/L | 9 | 6° dia | 9° dia | | 18° dia | 38° dia |
| | | a construction of the second s | Ry | Χ | 0 | 2 |
| | 10 | 7º dia | 14º dia | | 19° dia | 37° dia |
| | | and the second | ng. | Χ | 1000 | 1 th |

FIGURA 42 – Registro fotográfico da evolução da radiodermite evidenciando os graus de severidade e cicatrização do Rato 2 com aplicação de DMSO e Ratos 9-10 com aplicação de QC. X = não manifestou radionecrose.

6.3.3.1c Acompanhamento fotográfico dos ratos irradiados no segundo experimento.

A FIG. 43 ilustra o acompanhamento fotográfico da evolução da radiodermite

- nos Ratos 13-14, 19-21, com manifestação da radionecrose nos Ratos 13-14, 19 no 13°, 13°
- e 11º dia respectivamente após a irradiação e ação protetora da QC nos Ratos 20-21.

| Aplicação | Rato | Grau 1 | Grau 2 | Grau 3 | Início da cicatrização | Cicatrizado |
|------------------|------|--------|---------|---------|---------------------------|-------------|
| DMSO | 13 | 4º dia | 7º dia | 13° dia | 15° dia | 30° dia |
| | 14 | 5° dia | 9º dia | 13° dia | 15° dia | 28° dia |
| QC 500 µmol/L | 19 | 5° dia | 9º dia | 11º dia | 15° dia | 36° dia |
| | 20 | 7º dia | 12° dia | Χ | 15° dia | 41° dia |
| | 21 | 4º dia | 10° dia | Χ | 14º dia | 64° dia |

FIGURA 43 – Registro fotográfico da evolução da radiodermite evidenciando os graus de severidade, início e cicatrização dos Ratos 13-14 com aplicação de DMSO e Ratos 19-21 com aplicação de QC. X = não manifestou radionecrose.

6.3.3.2 Mensuração da área da ferida dos ratos

6.3.3.2a Mensuração da ferida dos ratos não irradiado

A ferida gerada pelo ponto de sutura nos **Ratos 4, 6-7, 11-12, 16, 18** (ratos controle) apresentaram períodos de cicatrização praticamente iguais. Na FIG. 44 é ilustrado o crescimento da ferida produzida pelo fio de sutura.



FIGURA 44 – Evolução da área da ferida dos ratos não irradiados produzida pelo fio de sutura no dorso dos Ratos 4, 6 com aplicação de DMSO, Ratos 7, 11-12 com aplicação de QC (250 μmol/L) e Ratos 16, 18 com QC (500 μmol/L).

6.3.3.2b Mensuração da radiodermite dos ratos irradiados

A FIG. 45 ilustra a evolução da área da radiodermite até sua cicatrização nos **Ratos 2, 13-14** e **Ratos 9-10, 19-21** com e sem aplicação de soluções de QC.



FIGURA 45 – As curvas representadas por círculos ilustram a evolução da área da radiodermite nos Rato 2 com aplicação de DMSO e Ratos 9-10 com aplicação de QC (250 μmol/L) e as curvas representadas por losangos ilustram a evolução da radiodermite nos Ratos 13-14 com aplicação de DMSO e Ratos 19-21 com aplicação de QC (500 μmol/L).

6.3.3.3 Análise da evolução da ferida

Não foi possível estabelecer uma relação estatística confiável entre os grupos de ratos neste experimento com \mathbf{n} pequeno (7 ratos controle divididos em 3 grupos e 8 ratos

irradiados divididos em 3 grupos) proporcionado por morte durante o experimento. Contudo, foi possível estebelecer uma relação entre os grupos de ratos, sujeitos às diferentes aplicações (QC e DMSO) por meio do cálculo das medianas das áreas obtidas sob a curva de mensuração da ferida (FIG. 44 e 45) e estabelecer um diagrama de dispersão (FIG. 46) para representar a possível tendência do processo de cicatrização.



FIGURA 46 – Comparação das medianas das áreas sob a curva das feridas dos grupos controle e irradiados com aplicação de DMSO e com diferentes concentrações de QC.

As observações dos ratos não irradiados (controle) indicam que a mediana das respectivas áreas sob as curvas variam de 29 a 125 mm² com confiança de 99%, concluindo que a cicatrização foi igual para todos os grupos controle. Por outro lado a mediana das áreas sob as curvas dos grupos irradiados com aplicação de DMSO varia de 2828 a 3670 mm² com confiança de 75%, com aplicação de QC (250 μ mol/L) a mediana varia de 1461 a 1937 mm² com confiança de 50% e com aplicação de QC (500 μ mol/L) a mediana varia de 4254 a 7035 mm² com confiança de 75%, estes valores baixo de confiança dos grupos irradiados foram devido ao **n** pequeno (FIG. 46), pode ser concluído que grupo de ratos aspergidos com QC (250 μ mol/L) apresentaram uma tendência de cicatrização mais eficiente que o grupo de ratos aspergidos com QC (500 μ mol/L).

6.3.3.4 Analise histológica da pele

Foram feitos cortes histológicos da região das peles dos ratos não irradiados (controles), da pele dos ratos irradiados que não manifestaram radionecrose e daqueles que manifestaram radionecroses, 2 dias após a cicatrização das mesmas. Para uma visualização da recuperação da derme e da epiderme, inicialmente as mesmas foram coradas com o corante Picro-sírius.

Na FIG. 47 pode-se observar um exemplo de cada tipo de regeneração, evidenciando uma epiderme mais espessa tanto após a radiodermite quanto após a radionecrose, com relação ao controle de pele regenerada após a ferida provocada pela sutura. Após a radiodermite, pode-se observar uma derme mais homogênea, comparável ao controle, porém ainda sem a formação dos anexos (FIG. 47**B**). Após a radionecrose, pode-se notar que a regeneração da derme não foi completa.



Pele Controle

Regeneração após radionecrose (Grau 3)

FIGURA 47 – Imagens dos cortes histológicos das peles dos ratos coradas com Picro-sírius. A: Pele controle, cicatrização da ferida após sutura; B: Regeneração da derme após radiodermite; C: Regeneração parcial da derme após radionecrose. I região da epiderme. II – região da derme.

7 DISCUSSÃO

A radioterapia é uma modalidade de tratamento que faz uso da radiação ionizante para erradicação de tumor maligno (câncer), tendo como ação concomitante a redução dos danos causados ao paciente. O tratamento radioterápico é realizado por meio da aplicação de dose de radiação ionizante com duas finalidades principais: i) paliativa, com aplicação de dose única ou pequeno fracionamento da dose para melhorar a qualidade de vida do paciente e ii) curativa, quando é considerada a principal terapia a ser empregada no tratamento do paciente com aplicação de dose fracionada, além disso, podendo ser utilizada em conjunto com outras terapias [2-4]. A radiodermite tem sido um fator limitante do benefício deste tratamento com graus de severidade [33] que está relacionado à localização anatômica, tipo de tecido e da dose prescrita para o tratamento [2]. O emprego de software para planejamento do tratamento e aceleradores lineares com diferentes qualidades de radiação [4] não eliminou os efeitos da radiodermite, dentre estes o de maior severidade, a radionecrose, sendo mais evidente em tratamentos com doses elevadas [35-36].

A produção de radicais livres relacionados à interação da radiação ionizante com o tecido biológico [8-9-37] pode ter como alternativa de controle o uso da QC como radioprotetor do tecido, levando em consideração que esta tem sido amplamente estudada como agente antioxidante e captador de radicais livres [18-21].

Não sendo encontradas na literatura concentrações ideais para aplicação tópica da QC foram desenvolvidos experimentos para determinar a melhor concentração não tóxica para queratinócitos e fibroblastos. Em estudos similares encontrados na literatura [**17, 21, 86-87**], observou-se que valores acima de 70 µmol/L iniciavam a apresentar certa toxicidade para as células, no entanto, no primeiro experimento (gráficos não apresentados) não foi possível reproduzir este resultado. Para entender o motivo da discordância entre os valores obtidos nas nossas condições, daqueles esperados da literatura, foram realizados testes para aferição da estabilidade da QC (APÊNDICE A) e concluído que havia uma redução de 30% na massa em relação ao valor nominal do fabricante. Após a pesagem da QC foram repetidos os experimentos de citotoxicidade, com novas diluições. Nos experimentos com queratinócitos (FIG. 26**A**) foram avaliadas concentrações de 50, 75, 100 e 250 µmol/L, observando que para valor menor que 100 µmol/L a viabilidade celular não foi diferente do controle, contudo, havendo variação de viabilidade celular somente para a concentração de 250 µmol/L (89%) e no experimento com concentrações 100 a 1000 µmol/L (FIG. 26**B**) as

reduções de viabilidade celular encontrada para valores maiores 100 µmol/L se mantiveram em torno de 80% até a última concentração estudada. Já com fibroblastos as concentrações estudadas foram de 75 a 750 µmol/L não manifestaram toxicidade (FIG. 29), mesmo com 7 dias de cultivo após o contato com QC.

Com a dosimetria da placa de 96 poços (TAB. 6) foram determinados os poços com menor variação de dose, para determinação dos locais de cultivo celular, para os experimentos previstos no fluxograma (FIG. 20), ou seja, definição da dose de irradiação que provocasse um dano celular, momento da aplicação e concentração da QC, com intenção de favorecer melhor condição de proteção das células no processo de irradiação.

Não sendo manifestada a sensibilidade dos queratinócitos à dose de 85 Gy no primeiro experimento para da aplicação da QC, foi necessário estabelecer uma curva de percentual de sensibilidade dos queratinócitos em função da dose de irradiação. Inicialmente foram realizados 2 experimentos utilizando doses de 85 a 500 Gy, sem morte significativa após 48 horas. A partir deste momento, para evitar a variação, de resultados, típica de culturas primárias, optou-se por utilizar linhagem pré-estabelecida de fibroblastos murinos Balb/c 3T3 e a partir dados da citotoxicidade obtidos para estas células, verificando também, a viabilidade celular após 7 dias (FIG. 32). Segundo os resultados obtidos, pode-se determinar que os fibroblastos foram mais sensíveis à radiação, em qualquer das doses estudas de 85, 100 e 150 Gy, com 50% de morte celular verificada após 7 dias de cultivo.

Diante do resultado apresentado na FIG. 35, os melhores momentos para aplicação da quercetina são 1 hora antes ou imediatamente depois da irradiação, mantendo-a em contato por 1 hora. Entretanto, para a padronização dos experimentos "in vivo" optamos pela aplicação 1 hora antes, pois este procedimento possibilita o melhor controle operacional na aplicação da mesma.

Apesar das concentrações de 250 e 750 µmol/L apresentarem proteção equivalente (FIG. 38), não foi utilizada a concentração de 750 µmol/L por esta ser três vezes maior, e os resultados dos testes *in vitro* são apenas indicativos, podendo não ser reproduzidos nos testes *in vivo*, principalmente quando se trata de envolvimento metabólico como é a formação da radionecrose.

Inicialmente a radionecrose gerada na pele do rato seria obtida no irradiador com fontes colimadas de cobalto-60 [**100**], entretanto, a falta de otimização de parâmetros de radioproteção para operacionalização deste não possibilitou sua utilização. A alternativa para solucionar o problema, foi fazer uso da experiência obtida com o modelo de radionecrose para camundongos Nude [**30**], em trabalhos realizados no Laboratório de Tecidos Biológicos do CTR/IPEN para produzir um sistema para irradiação animal (SIA) de ratos Wistar (item 4.1) a ser utilizado no irradiador Panorâmico com fonte de cobalto-60. Não sendo necessária a utilização de animal imunodeprimido foram possibilitados cuidados envolvendo baixo custo de manutenção, entre outras vantagens, além da facilidade de manipulação fora do ambiente estéril.

Inicialmente foram usadas 10 blindagens 5 x 10 x 12 cm³ para a geometria de proteção dos animais (FIG. 8), não sendo possível obter homogeneidade de resultados, foram desenvolvidas novas blindagens específicas para a geometria desejada, de $9 \times 10 \times 20 \text{ cm}^3$ para a posição frontal e $5 \times 10 \times 20 \text{ cm}^3$ para a geometria (ou posterior) em relação ao IA (FIG. 22). A otimização do número de blindagens (FIG. 23) proporcionou redução significativa de incerteza no posicionamento dos dosímetros de alanina com o campo de radiação coincidente com o PMF (FIG. 22 e 23), a redução de 1,0 cm na face da blindagem **A**, voltada para o PMF (FIG. 22) possibilitando a diminuição do tempo de irradiação [**82**] sem comprometimento da integridade física dos ratos, também foi obtida redução da dose média entre as posições interna e externa no IA_e, IA_{ref}. e IA_d entre 85 e 89% (TAB. 7). A mudança na angulação do PMF de -90°, 0°, 90° (FIG. 9) para 18°, 96°, 265,5° (FIG. 22 e TAB. 7) resultou na atenuação da radiação secundária entre os SIAs.

As modificações no número de orifícios ao longo do IA (FIG. 21), em relação ao imobilizador inicial (FIG. 8), proporcionou uma melhora para acomodar a porção de pele da região dorsal (durante o período de imobilização) conforme o tamanho do rato, além disso, a semelhança na geometria entre os IAs possibilitou estabelecer uma relação entre doses em posições equivalentes de **1-7** de mesma altura entre os SIA_e, SIA_{ref.} e SIA_d (TAB. 7). As doses médias das posições **1** e **2** praticamente iguais entre os IAs (TAB. 7) possibilitou a irradiação simultânea de 3 ratos com mesma dose. A mudança da sonda dosimétrica de diodo de silício de cálcio (item 4.1.2) para pastilha de Alanina na dosimetria (FIG. 22 e FIG. 23A) proporcionou a medida da dose em um volume praticamente pontual nas posições de **1-7**.

Para determinar as condições de obtenção do modelo animal de radionecrose, foi elaborado inicialmente um experimento piloto com 3 animais, utilizando a geometria pré-estabelecida e uma dose única de 85 Gy. Apesar das variações de área da ferida e tempo de recuperação cicatricial entre os animais, foi estabelecido o modelo (FIG. 11), com o início da radiodermite no 7° dia e aparecimento da radionecrose, com sua extensão máxima variando entre o 16° e o 18° dias (FIG. 12). A diferença de 35 dias entre o período de cicatrização dos **Ratos a**, **c** em relação ao do **Rato b**, provavelmente foi causada pelo fato do **Rato b** ter 24 semanas na data da irradiação, enquanto os outros dois tinham menos de 12 semanas. Sendo este o protocolo do estudo piloto, optamos por otimizar a disponibilidade de animais do biotério, e esta diferença de idade não foi inicialmente levada em consideração.

Após todos os parâmetros definidos, os ratos Wistar foram irradiados em duas etapas, para avaliação da proteção da quercetina. Sendo que na primeira etapa foi utilizada uma concentração de 250 µmol/L e na segunda uma concentração de 500 µmol/L, ambas utilizando aspersores manuais com válvulas padronizadas (item 4.2).

A avaliação inicial foi por meio de imagens fotográficas, tanto dos animais irradiados, quanto dos seus respectivos controles (não irradiados). Para eliminar a possibilidade de ferida ter sido provocada pelo fio de sutura, os controles foram acompanhados diariamente, sendo que a houve uma pequena ferida no ponto de sutura (variando de 2 a 13 mm²) e a evolução da cicatrização destas feridas demonstra períodos de cicatrização praticamente iguais, entretanto, os **Ratos 4**, **12**, **18** apresentaram feridas maiores em relação aos demais ratos, tendo como possível causa as tentativas para passar o ponto de sutura na pele da região dorsal ou pela movimentação dos **Ratos 4**, **12** no interior do IA devido ao tempo reduzido da anestesia em relação ao tempo de permanência no IA. A cicatrização da ferida dos **Ratos 16**, **18** ocorreu em período semelhante dos **Ratos 6-7**, **11** (FIG. 41).

Os baixos valores das áreas das feridas e o breve período de cicatrização (FIG. 44) da região dorsal dos ratos não irradiados com e sem aplicação de QC não apresentaram diferenças no processo de cicatrização da pele nos primeiro e segundo experimentos.

Não havendo na literatura uma especificação para radionecrose em rato Wistar foi estabelecida uma classificação (TAB. 8) com base no modelo humano [**33**] com 3 graus de severidade, pois com a rápida evolução da radiodermite, não houve a possibilidade de fazer distinção entre alguns dos graus de severidade, devido a estes ocorrer nos ratos em pequenos intervalos de tempo.

Com relação aos ratos irradiados, os primeiros indícios de radiodermite nos **Ratos 2, 9-10** foram praticamente iguais independo da aplicação de QC. Com a evolução da ferida, segundo os graus definidos na TAB. 8, foi obervada radionecrose no **Rato 2** com

aplicação de DMSO e não foi observada radionecrose nos **Ratos 9-10** com aplicação de QC na concentração de 250 µmol/L (FIG. 42).

Os primeiros indícios de radiodermite nos **Ratos 13-14, 19-21** foram praticamente iguais independo de a aplicação ser com DMSO ou QC. Ainda seguindo a obervada radionecrose nos **Ratos 13-14** com aplicação de DMSO e **Rato 19** com aplicação de QC (500 µmol/L). Não foi observada radionecrose nos **Ratos 20-21** (FIG. 43).

Mesmo com a realização de melhorias, no processo de irradiação, das condições de bem estar [28-29] dos Ratos 1-21 em relação ao experimento piloto (item 4.1.3), tais como: controle da temperatura ambiente (sala de preparo e de irradiação), aprimoramento da condição de acomodação durante o período de imobilização, elevar o tempo de anestesia para superar o tempo necessário de irradiação, não foram capazes de minimizar o número de mortes dos ratos. A morte dos ratos durante os experimentos foram causadas pelo período prolongado na posição vertical no interior do IA, já que o tempo efetivo nesta posição dos Ratos 1-21 foi acrescido de 20% em relação ao tempo de irradiação do experimento piloto, devido à redução da atividade da fonte do irradiador.

Foram medidas diariamente as áreas correspondentes à área da ferida de cada animal, gerando gráficos da sua evolução (FIG. 44 e 45). Apesar dos picos não poderem ser correlacionados, pode-se principalmente observar certa correlação entre as áreas abaixo de cada curva, sendo para isso necessário um estudo estatístico.

Os resultados obtidos com os testes *in vitro* (item 6.2) possibilitou a redução dos animais, entretanto, como explicado anteriormente, durante a realização dos experimentos ocorreu um número de mortes dos animais além do esperado, como consequência a analise estatística ficou restrita ao valor pequeno de **n**. Porém foi possível obter tendências da cicatrização para os grupos controle e irradiados. Com relação ao grupo não irradiado (**n** = 7 e 3 subgrupos) a cicatrização é igual para todos com uma confiança de 99% (FIG. 46). Com relação aos ratos irradiados (**n** = 8 e 3 subgrupos), aqueles que foram aspergidos com QC (250 μ mol/L) apresentam uma cicatrização mais eficiente, com confiança de 50%, e os aspergidos com QC (500 μ mol/L) apresentaram uma cicatrização menos eficiente, com confiança de 75%. Os valores de confiança baixo são consequência de **n** pequeno.

Com o intuito de verificar o rearranjo final da regeneração, tanto da ferida provocada pela radiodermite, quando pela radionecrose, foi feita uma biópsia do local, após dois dias da visualização da cicatrização. Após a obtenção dos cortes histológicos, os mesmo foram inicialmente corados com o corante Picro-sírius, para a melhor observação do estágio de regeneração das fibras de colágeno na derme (FIG. 47), nesta avaliação

preliminar, pode-se observar que a derme (II) neo formada após a radiodermite, apesar de ainda não possuir os anexos da pele, tem uma distribuição homogênea de fibras de colágeno (FIG. 47**B**), semelhantes àquela formada no rato controle, na cicatrização após a ferida provocada pela sutura (FIG. 47**A**). Já na pele regenerada após a radionecrose, observa-se um rearranjo dérmico incompleto (FIG. 47**C**), indicando um retardo na recuperação da mesma. Apesar desta coloração ser específica para as fibras de colágeno, é possível verificar que os animais que sofreram ou radiodermite ou radionecrose, desenvolveram uma epiderme mais espessa que a dos animais controle (E).

Estes estudos ainda devem ser complementados com a coloração com tricrômio de Masson, com um estudo histomorfométrico mais aprofundado e principalmente com imunohistoquímica com anticorpo anti colágeno IV para diferenciar a cicatrização de uma radionecrose, daquela após uma radiodermite.

Apesar da incerteza histológica, podemos inferir com os demais resultados obtidos nos primeiro e segundo experimentos que os ratos aspergidos com QC não apresentaram radionecrose, caracterizando efeito protetor da QC, com exceção o **Rato 19**. Neste animal podem ter ocorrido dois fatores principais, o primeiro é que o fato de aumentar a concentração de quercetina, apesar dos estudos *in vitro* indicar esta possibilidade, provavelmente não protegem o animal dos efeitos secundários da irradiação, de maneira eficaz. O segundo fator é que este animal recebeu apenas uma aspersão de QC antes de ser acondicionado no IA e provavelmente a manobra de acondicionamento pode ter retirado parte da solução aspergida. Após esta observação, os outros animais receberam uma segunda aspersão após o acondicionamento no IA.

8 CONCLUSÃO

O objetivo principal de avaliação da atenuação da radionecrose em ratos Wistar, com a aplicação cutânea de quercetina, foi atingido lenvando-se em consideração que:

Foi obtida a curva de citotoxicidade da quercetina para queratinócitos e fibroblastos, comprovando que até a concentração de 1000 µmol/L, a mesma não afetou a viabilidade celular com indices variando de 100 a 80% em relação ao controle.

A dosimetria da irradiação da placa de cultura celular propiciou que os *testes in vitro* com células irradiadas pudessem ser efetuados com, no mínimo um n = 10, com variação de $\pm 5\%$.

Os testes *in vitro* da proteção celular da quercetina puderam ser realizados com doses de 100 e 150 Gy.

Foi estabelecido que a quercetina deve ser aplicada 1 hora antes da irradiação das células ou dos animais.

Para a proteção celular, as melhores concentrações da quercetina foram estabelecidas entre 250 a 750 µmol/L.

A dosimetria com dosímetro de alanina confirmou que a geometria do suporte para irradiação animal assegura a exposição apenas da porção de pele da região dorsal superior pinçada para fora do imobilizador, mantendo protegido o restante do corpo do rato.

Com a exposição de 350 mm² da pele do rato foi obtida radionecrose na região dorsal superior com dose única de 85 Gy sem o comprometimento da saúde do animal, com extensão máxima ocorrendo a partir 16º dia e cicatrização, em média, no 25º dia.

Os aspersores manuais existentes no mercado não são aferidos e necessitam ser testados antes do uso, sendo que das 45 válvulas de seis diferentes fabricantes, apenas duas puderam ser utilizadas por apresentarem reprodutibilidade no processo de aspersão, com volumes de EBF-1 (141 \pm 2,5 µL) e D50-3 (191 \pm 5,7 µL).

O acompanhamento fotográfico e mensuração da área mostrou uma tendencia de cicatrização da ferida mais eficaz para a concentração de 250 μ mol/L em relação a concentração de 500 μ mol/L e por meio da análise histológica foi observado um aumento da espessura da epiderme tanto após a radiodermite, quanto após a radionecrose (FIG. 47**B** e 47**C**), com regeneração da radiodermite sem a formação de anexos e a regeneração parcial da radionecrose.

9 ANEXO

ANEXO 1 – Aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais



Comitê de Ética no Uso de Animais

Parecer - Projeto Nº 89/11/CEUA-IPEN/SP

Com base nos pareceres apresentados pelos relatores, o protocolo de pesquisa: "MENSURAR A EFICÁCIA DE ATENUAÇÃO DA RADIODERMITE INDUZIDA EM RATOS WISTAR COM APLICAÇÃO CUTÂNEA DE QUERCETINA" de responsabilidade da pesquisadora DRA. MÔNICA BEATRIZ MATHOR foi considerado APROVADO.

Tendo em vista a legislação vigente, devem ser encaminhados, a este Comitê, relatórios anuais (parciais ou finais, dependendo da duração do projeto) referentes ao andamento da pesquisa. Após o término da pesquisa, uma cópia do trabalho deve ser encaminhada a este CEUA

São Paulo, 22 de agosto de 2011

Profa. Dra. Nanci do Nascimento Coordenadora do CEUA/IPEN

IPEN-CNEN/SP COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS Av Prof Lineu Prestes, 2242 - Cidade Universitária - CEP 05508-000 - São Paulo - SP Telefone: (011) 3133-9698 - Fax (011) 3133-9709 E-mail: nnascime@ipen.br

10 APÊNDICE

APÊNDICE A – Avaliação da Estabilidade de QC

A aferição da provável instabilidade química da QC foi realizada utilizando três técnicas: Espectrofotometria, Espectroscopia Raman, Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, na primeira dissolução de 50 mg nominais de QC e 50 mg de QC efetivamente pesada.

1 Espectrofotometria

As soluções de QC em DMSO e em meio de cultura para queratinócitos foram mensuradas nas concentrações molar de 0,5 mol/L (solução mãe SM(1)), 20 mmol/L (da sol. SM(2)) da diluição para determinação dos picos característicos nos diferentes comprimentos de onda [**101**] ilustrado na FIG. 1A.



FIGURA 1A – Espectro das amostras: (A) concentração de SM(2) com 20 mmol/L recongelada, (B) concentração de SM(2) com 20 mmol/L congelada uma única vez, (C) concentração SM(1) com 0,5 mol/L recongelada e (D) concentração SM(1) com 0,5 mol/L congelada uma única vez.

O espectro de varredura na região do ultravioleta entre 245 e 470 nm realizado no espectrofotômetro SHIMADZU UV 160IPC, identificou os picos que caracterizam a QC, entretanto, não foram identificados outros picos que pudessem caracterizar a instabilidade da QC, caracterizando a formação de novos compostos nas amostras (A), (B), (C) e (D), como subprodutos da QC (FIG. 1A).

2 Espectroscopia Raman da QC sólida

O espectrômetro Raman XploRA (HORIBA) foi utilizado para determinar a identidade química e estrutural da QC pesada e possíveis produtos da sua instabilidade. Foram identificados os picos de 400 cm⁻¹ (posição 1) e 1600 cm⁻¹ (posição 2), os quais caracterizam a QC, entretanto outros picos do espectro não foram analisados por falta da biblioteca de identificação de estruturas (FIG. 2A).



FIGURA 2A – Composição do espectro Raman, região 200-2000 cm⁻¹, da QC sólida obtido com laser 750 nm, objetiva 50x e potência de 100 mW.

3 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

As análises foram realizadas no cromatográfico Agilent Technologies 1260 Infinity (AGILENT TECHNOLOGIES) com objetivo de separar e identificar os compostos presentes na massa (0,1736 mg) de QC pesada (sólida) e da aliquota 10 μ L de SM(1) com concentração molar nominal de 0,5 mol/L. Foi utilizada a coluna Prodigy 5 μ m ODS3 (C18) com 250 x 4,6 mm (PHENOMES Ltd. UK) com fluxo de 1 mL/min. a 25 °C. Para a fase móvel foi utilizada acetonitrila grau HPLC (D) e ácido fórmico a 0,5% (A), ambos da MERCK, com os seguintes gradientes de eluição: 0-5 min. 90% de A e 10% de D, 15 min. 80% de A e 20% de D, 25 min. 75% de A e 25% de D, 33 min. 65% de A e 35% de D, 38 min. 50% de A e 50% de D, 43 min. 10 de A e 90% de D, 44 min. 10% de A e 90% de D, 45 min. 90% de A e 10% de D.

3.1 Cálculo da pureza da QC sólida

Foi diluída em metanol grau CLAE 0,1736 mg de QC sólida e realizada a passagem de um volume de injeção de 5 μ L mensurando uma massa de 7,95434 \times 10⁻¹ μ g e a identificação de dois compostos (FIG. 3A). A partir da massa mensurada foi calculada a pureza da QC em 91,6% que está dentro do intervalo de pureza especificado pela SIGMA-ALDRICH (\geq 90%).



FIGURA 3A – Compostos identificados no espectro da QC sólida: **a**: Quercetina 3-β-D-glicosídeo e **b**: Aglicona.

3.2 Cálculo da quantidade de QC em SM(1)

De 10 μ L de QC a 0,5 mol/L em DMSO da dissolução das 50 mg nominais foi analisado um volume de injeção 2 μ L (diluído 10x) mensurando uma massa de 2,94950x10⁻¹ μ g. A partir da massa mensurada, na CLAE, foi calculada a pureza da QC da dissolução em 63,5% (considerando a quantidade de 50 mg de QC indicada pela SIGMA-ALDRICH). Para chegar ao índice de pureza de 90,7%, a quantidade de quercetina contida na dissolução seria aproximadamente 35 mg. A passagem dos 2 μ L a 0,5 mol/L resultou na identificação de apenas dois compostos (FIG. 4A) confirmando sua estabilidade.



FIGURA 4A – Compostos identificados no espectro da QC da primeira dissolução: **c**: Quercetina 3-β-D-glicosídeo e **d**: Aglicona.

Os testes realizados com a QC apresentaram sinais de estabilidade nos itens 3.1 e 3.2. Foi concluído que a falta do limiar de citotoxidade para QC foi causado pela redução de 15 mg do valor nominal declarado pelo fabricante, resultando em concentrações 30% menor daquela almejada para o experimento. A FIG. 5A apresenta o percentual de concentração molar efetivo da QC das primeiras diluições usadas nos experimento (vermelho) e a concentração molar calculada (azul) para 35 mg de QC (item 3.1).



FIGURA 5A – Percentual efetivo da concentração molar utilizada na segunda diluição (azul) e percentual efetivo de concentração molar da primeira diluição (vermelho).

11 REFERÊNCIA

- 1 INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. **Tratamento do câncer.** Rio de Janeiro: INCA, 2015. Disponível em: <www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/mifos/site/ tratamento>. Acesso em: 3 nov. 2015.
- 2 CHAO K. S. C.; PEREZ C. A.; BRADY L. W. **Radiation Oncology:** Management Decisions. 3rd ed. Philadelphia: Ed. Lippincott Williams & Wilkins, 2011.
- 3 SALVAJOLI J. V.; SOUHAMI L; FARIA S. L. Radioterapia em Oncologia. 2º ed. São Paulo, SP: Editora Atheneu, 2013.
- 4 SÃO PAULO, SP. Sociedade Brasileira de Radioterapia, São Paulo. Técnicas de Radioterapia. Disponível em: http://www.sbradioterapia.com.br. Acesso em: 3 abr. 2015.
- 5 INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. Incidência de câncer no Brasil. Disponível em: http://www.inca.gov.br/estimativa/2016/estimativa-2016-v11.pdf ou http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/cidadao/principal/agencia-saude/21003inca-estima-que-havera-596-070-novos-casos-de-cancer-em-20162016. Acesso em: 12 mar. 2016.
- 6 BLECHA F. P. and GUEDES M. T. S. Treatment of radiodermatitis in cancer patients: support for nursing intervention, **Rev. Bras. Cancerol.**, v. 52, n. 2, p. 151-163, 2006.
- 7 DÖRR W. and HENDRY J. H., Consequential late effects in normal tissues. **Radiother Oncol**, v. 61: p. 223-234, August 2001.
- 8 INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY. Cytogenetic for Analysis for Radiation Dose Assessment. Vienna, Austria, 2001. (TRS n° 405)
- 9 PEREIRA. M. F., Radiologia Odontológica e Imagionologia. 2º ed. Rio de Janeiro: Ed. Santos, cap. 2, Efeitos Biológicos e Radioproteção. p. 14-23, 2013.
- 10 EFRAIN OLSZEWER, **Radicais livres em Medicina.** 2º ed. São Paulo: Fundação BYK, 1995.
- 11 MORAES, F. P., COLLA, L. M., Alimentos Funcionais e Nutracêuticos: Definições, Legislação e Benefícios à Saúde. Rev. Bras. Farm., v. 3, n. 2, p. 109-122, 2006.
- 12 TURNER N. D., BRABY L. A., FORD J., LUPTONJ. R. Opportunities for Nutritional Amelioration of Radiation-Induced Cellular Damage. Nutrition, v. 18, p. 904-912, 2002.
- 13 BEHLING E. B., SENDÃO M. C., FRANCESCATO H. D. C., ANTUNES L. M. G., BIANCHI M. L. P. Flavonoide Quercetina: Aspectos Gerais e Ações Biológicas. Alim. Nutr., Araraquara, v. 15, n. 3, p. 285-292, 2004.

- 14 BELLITZ H. D., GROSCH W., SCHIEBERLE P. Food Chemistry. 3 ed. Germany: Spring-Verlag, 2004. Cap. 18, p. 822-834.
- 15 DAJAS F. Life or death: Neuroprotective and anticancer effects of quercetin. J. Ethnopharmacol, v. 143, p. 383-396, 2012.
- 16 SHIMOI K., MASUDA S., SHEN B., FURUGORI M., KINAC N. Radioprotective Effects of Antioxidative Plant Flavonoids in Mice. Mutat. Res. v. 350, p. 153-161, 1995.
- 17 KUHLMANN M. K., HORSCH E., BURKHARDT G., WAGNER M., KÖHLER H., Redauction of cisplatin toxicity in cultured renal tubular cells by the bioflavonoid quercetin. **Arch. Toxicol**. v. 72, p. 536-540, 1998.
- 18 GIEHL M. R., BOSCO S. M. D., LAFLOR C. M., WEBER B. Eficácia dos flavonóides da uva, vinho tinto e suco de uva tinto na prevenção e no tratamento secundários de aterosclerose. Sci. Med. v. 17, n. 3, p. 145-155, 2007.
- 19 ACAMPORA A. J. Efeitos da quercetina na cicatrização de ferida cirúrgica contaminada em ratos Wistar. Arq. Catarin. Med. v. 36, n. 1, p. 69-75, 2007.
- 20 GOMATHI K., GOPINATH D., AHMED M. R., JAYAKUMAR R. Quercetin incorporated matrices for dermal wound healing processes in rat. **Biomaterials**. v. 24, p. 2767-2772, 2003.
- 21 BAHL M. M. Avaliação do Potencial Neuroprotetor do Zinco e da Quercetina em Modelos de Isquemia e Estresse Oxidativo. 2007. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC.
- 22 VIAS DE ADMINISTRAÇÃO DE MEDICAMENTOS. Disponível em: http://www.ebah.com.br/content/ABAAABIh0AH/farmacologia-vias-administraca o>. Acesso em 04/12/2014.
- 23 KYLE J. A. M., SHARP L., LITTLE J., DUTHIE G. G., MCNEILL G.; et al. Dietary flavonoid intake and colorectal cancer: a case–control study. Br. J. Nutr. v. 103, p. 429-436, 2010.
- 24 BARRENETXE J., GRIJALBA A., MARTINEZ-PENUUELA J. M., MARZO F., URDANETA E.. Effect of dietary quercetin and sphingomyelin on intestinal nutrient absorption and animal growth. Br. J. Nutr. v. 95, n. 3, p. 455-461, 2007.
- 25 PIERINI R., GEE J. M., BELSHAW N. J., JOHNSON I. T. Flavonoids and intestinal cancers. **Br. J. Nutr.** v. 99, p. 53-59, 2008.
- 26 MOREIRA A. C. J., O envolvimento do Óxido Nitroso na Hipertensão Portal Ação da Quercetina. 2004. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do sul – Rio Grande do Sul, RS.

- 27 FILHO A. W. Potencial Analgésico de Flavonoides: Estudo do mecanismo de ação da quercetina. 2005. Dissertação (Mestrado) Universidade do Vale do Itajaí. Rio Grande do Sul.
- 28 RUSSEL W. M. S., BURCH R. L. The Principles of Humane Experimental Technique: Ed. FRAME, 2009.
- 29 CAZARIN K. C. C.; CORRÊS C. L.; ZAMBRONE F. A. D. Redução, refinamento e substituição do uso de animais em estudos toxicológicos: uma abordagem atual. **Rev. Bras. Cienc. Farm**. v. 40, n. 3, p. 289-299, 2004.
- 30 MOSCA, R. C., FERREIRA D. C., NAPOLITANO C. M., SATIN S. P., MATHOR M. B., A New Animal Model to Mimic Radiotherapy ⁶⁰Co Cutaneous Injury. Anais VIII Congresso Internacional Sociedade Brasileira de Biociências Nucleares – SBBN 2012.
- 31 INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. O que é o câncer. Rio de Janeiro: INCA, 2015. Disponível em: <www1.inca.gov.br/ mifosti_view.asp?id=322>. Acesso em: 3 nov. 2015.
- 32 INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. Ações de enfermagem para o controle do câncer: Uma proposta de integração ensino-serviço. Rio de Janeiro: INCA, 2015. Disponível em: <mif://www.inca.gov.br/enfermagem/ >. Acesso em: 3 nov. 2015.
- 33 BERNIER J.; BONNER J.; VERMORKEN J. B.; BENSADOUN R. J.; DUMMER R.; GIRALT J.; KORNEK G.; HARTLEY A.; MESIA R.; ROBERT C.; SEGAERT S. And ANG K. K. Consensus guidelines for the management of radiation dermatitis and coexisting acne-like rash in patients receiving radiotherapy plus EGFR inhibitors for the treatment of squamous cell carcinoma of the head and neck. Ann. Oncol. v. 19: p. 142-149, 2008.
- 34 INTERNATIONAL COMMISSION ON RADIOLOGICAL PROTECTION. Diagnosis and Treatment of Radiation Injuries. Safety Report Series n° 2 – Vienna, Austria, 1998.
- 35 ANDRADE C. B. V., Avaliação de alterações morfológicas da pele após lesão radioinduzida em ratos Wistar. 2010. Dissertação (Mestrado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ.
- 36 BARROS P. B. B., LEAL P. R. A., Ulceras Complexas por Radionecrose Fisiopatologia, Diagnóstico e Tratamento. Rev. Soc. Bras. Cir. Plást. São Paulo, v. 18, n 11.3 p. 17-26 set/dez, 2003.
- 37 ERIC J. HALL, AMATO J. GIACCIA. **Radiobiology for the Radiogist**. Philadelphia, PA: 7 ed. Lippincott Williams & Wilkins, 2012.
- 38 BUECHTER, D. D. Free radicals and oxygen toxicity. **Pharm. Res.**, v. 5, p. 253-260, 1988.

- 39 HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. The importance of free radicals and catalytic metal ions in human diseases. **Mol. Aspects Med.**, v. 8, p. 189-193, 1985.
- 40 VALKO, M.; LEIBFRITZ, D.; MONCOL, J.; CRONIN, M.T.D.; MAZUR, M.; TELSER, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **Int. J. Biochem. Cell Biol.**, v. 39, p. 44-84, 2007.
- 41 PIERREFICHE, G.; LABORIT, H. Oxygen free radicals, melatonin, and aging. **Exp. Gerontol.**, v. 30, p. 213-227, 1995.
- 42 BRAND, M.D.; AFFOURTIT, C.; ESTEVES, T.C.; GREEN, K.; LAMBERT, A.J.; MIWA, S., PAKAY, J.L.; PARKER, N. Mitochondrial superoxide: production, biological effects, and activation of uncoupling proteins. Free Radic. Biol. Med., v. 37, p. 755-767, 2004.
- 43 TESTON A. P., NARDINO D., PIVATO L., Envelhecimento cutâneo: Teoria dos radicais livres e tratamentos visando a prevenção e o rejuvenescimento. UNINGÁ Review. v. 1, p. 71-84, 2010.
- 44 HARMAN, D.; BIRDSALL, J. Free radical theory of aging. Mut. Res., v. 275, p. 257-266, 1992.
- 45 ARUOMA, O. I. Characterization of drugs as antioxidant prophylactics. Free Radic. Biol. Med., v. 20, n. 5, p. 675-705, 1996.
- 46 XING-QIAN Y., JIAN-CHU C., DONG-HONG L., PING J., JOHN S., SOPHIA X., DAN W., JIAN-GUO X., YUKIO K. Identification of bioactive composition and antioxidant activity in young mandarin fruits. **Food Chem.** v. 124, n. 1561-1566, 2011.
- 47 OLIVEIRA A. C.; VALENTIM I. B.; FONSECA M. O. Fontes vegetais naturais de antioxidantes, **Quim. Nova**, v. 32, n. 3, p. 689-702, 2009.
- 48 HOSSEINIMEHR, S. J. Trends in the development of mifostinative agents. **Drug. Disc. Today**, v. 12, p. 794-805, 2007.
- 49 SIQUEIRA W. N. Estudo do efeito radioprotetor do flavonoide quercetina sobre linfócitos humanos. 2013. Dissertação (Mestrado) Universidade Federal de Pernambuco Pernambuco, PE.
- 50 LINDERGAARD, J. C.; GRAU, C. Has the outlook improved for amifostine as a clinical radioprotector? **Radiother. Oncol.**, v. 57, p. 113-118, 2000.
- 51 MARCU, L. G. The role of amifostine in the treatment of head and neck cancer with cisplatin-radiotherapy. **Eur. J. Cancer Care**, v. 18, p. 116-123, 2009.
- 52 SASSE, A. D.; CLARK, L. G.; SASSE, E. C.; CLARK, O. A. Amifostine reduces side effects and improves complete response rate during radiotherapy: results of a meta-analysis. **Int. J. Radiat. Oncol.**, v. 64, p. 784-791, 2006.

- 53 KITTS, D. D.; WIJEWICKREME, A. N.; HU, C. Antioxidant properties of a North American ginseng extract. **Mol. Cell. Biochem.**, v. 203, p. 1-10, 2000.
- 54 BALIGA M. S.; RAO, S. Radioprotective potential of mint: a brief review. J. Cancer Res. Ther., v. 6, n. 3, p. 255-262, 2010.
- 55 ARORA, R.; GUPTA, D.; CHAWLA, R.; SAGAR, R.; SHARMA, A.; KUMAR, R. et al. Radioprotection by plant products: Present status and future prospects. Phytother. Res., v. 19, p. 1-22, 2005.
- 56 SAMARTH, R.M.; KUMAR, A. Radioprotection of Swiss albino mice by plant extract Mentha piperita (Linn.). J. Radiat. Res., v. 44, p. 101-109, 2003.
- 57 KENNEDY, D. O.; WIGHTMAN, E. L. Herbal extracts and phytochemicals: plant secondary metabolites and the enhancement of human brain function. Adv. Nut. Res. V. 2, n. 1, p. 32-50, 2011.
- 58 GUO, J. J.; HSIEH, H. Y.; HU C. H. Chain-breaking activity of carotenes in lipid peroxidation: A theoretical study. **J. Phys. Chem.**, v. 113, p. 15699-15708, 2009.
- 59 PERRON, N. R.; BRUMAGHIM, J. L. A review of the antioxidant mechanisms of polyphenol compounds related to iron binding. Cell. Biochem. Biophys, v. 53 p. 75-100, 2009.
- 60 CAO, J.; ZHANG, Y.; CHEN, W.; ZHAO, X. The relationship between fasting plasma concentrations of selected flavonoids and their ordinary dietary intake. Br. J. Nutr., v. 103, p. 249-255, 2010.
- 61 SEREMETA D. C. H. Avaliação da potencial atividade antioxidante da quercetina no processo de fotodegradação do óleo de linhaça, 2014. Dissertação de (Mestrado) Universidade Estadual de Ponta Grossa, PR.
- 62 PIETTA, P. G. Flavonoids as antioxidants. J. Nat. Prods. v. 63, n. 7, p. 1035-1042, 2000.
- 63 GAVELOVÁ, M.; HLADÍKOVÁ. J.; VILDOVÁ, L.; NOVOTNÁ, R.; VONDRÁCEK, J.; KRCMÁR, P.; MACHALA, M.; SKÁLOVÁ, L. Reduction of doxorubicin and oracin and induction of carbonyl reductase in human breast carcinoma MCF-7 cells. Chem. Biol. Interact., v. 176, p. 9-18, 2008.
- 64 MOON, S. K.; CHO, G. O.; JUNG, S. Y.; GAL, S. W.; KWON, T. K.; LEE, Y. C.; 66MADAMANCHI, N. R.; KIM, C. H. Quercetin exerts multiple inhibitory effects on vascular smooth muscle cells: role of ERK 1/2, cell-cycle regulation, and matrix metalloproteinase – 9. Biochem. Biophys. Res. Commun., v. 301, n. 4, p. 1069-1078, 2003.
- 65 CORNARD J. P., BOUDT A. C., MERLIN J. C. Theoretical investigation of the molecular structure of the isoquercitrin molecule. J. Mol. Struct. v. 508, p. 37-49, 1999.

- 66 LEE S. J., SON K. H., CHANG H. W., DO I. C., JUNG K. Y., KANG S. S., KIM H. P. Anti-inflammatory Activity of Naturally Occurring Flavone and Fiavonol Glycosides. Arch. Pharm. Res. v. 16, n. 1, p. 25-28, 1993.
- MAGALINGAM K. B., RADHAKRISHNAN A., HALEAGRAHARA N.
 Protective effects of flavonol isoquercitrin, against 6-hidroxy dopamine (6-OHDA)
 induced toxicity in PC12 cells. BMC Res. Notes. p. 1-8, 2014.
- 68 WANG C., Li J., ZHONG L., ZHANG X., YU S., LIANG X., DING F., WANG Z. Isoquercetin protects cortical neurons from oxygen-glucose deprivation induced injury via suppression of TLR4-NF-kB. Neurochem. Int., v. 63, p. 741-749, 2013.
- 69 ITOH T., OHGUCHI K., NAKAJIMA C., OYAMA M., LINUMA M., NOZAWA Y., AKAO Y., ITO M. Inhibitory effects of flavonoid glycosides isolated from the peel of Japanese persimmon (*Diospyros kaki Fuyu*) on antigen-stimulated degranulation in rat basophilic leukaemia RBL-2H3 cells. Food Chemistry. v. 126, p. 289-294, 2011.
- 70 JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 11^a ed., Rio de Janeiro, RJ: Guanabara-Koogan, 2012.
- 71 KIEERSZENBAUM A. L., TRES L. L., Histologia e Biologia Celular: Uma Introdução à Patologia, 3° ed., Sistema Tegumentar: Rio de Janeiro: Editora SAUNDERRS, 2012.
- 72 BALBINO C. A., PEREIRA L. M., CURI R. Mecanismo envolvido na cicatrização. Ver. Bras. Ciênc. Farm. v. 41, n. 1 jan/mar, 2005.
- 73 SINGER, A. J., CLARK, R. A. F., Cutaneous wound healing. New Engl. J. Med., v. 341, p. 738-746, 1999.
- 74 CAMPOS A. C. L., BORGES-BRANCO A., GROTH A. K. Broughton G,. Cicatrização de feridas. **ABCD Arq. Bras. Cir. Dig**. v. 20, n. 1, p. 51-58, 2007.
- 75 LAWRECE W. T., DIEGELMANN R. F., Growth factors in wound healing. Clin. Dermatol, v. 12, n. 1, p. 157-169, 1994.
- 76 COTRAN, R.S., KUMAR, V., COLLINS, T. Robbins Pathologic Basis of Disease, 6th Ed. W. B. Saunders Company, 1999.
- 77 DENMAN, P.K.; MCELWAIN, D.L.; HARKIN, D.G.; UPTON, Z. Mathematical modelling of aerosolised skin grafts incorporating keratinocyte clonal subtypes. Bull Math Biol. vol. 69, n. 1, p. 157-79, 2007, Epub 20 Out 2006.
- 78 MOSCA R. C. Modelo de Radionecrose Cutânea Induzida em Camundongos Nude (Nu/Nu) para Desenvolvimento de Terapias Regenerativas Baseadas em Substitutos Dermo-Epidérmicos Humanos. 2014. TESE (Doutorado) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo, SP.

- 79 ZHAO W., ROBBINS M. C. R., Inflammation and Chronic Oxidative Stress in Radiation-Induced Late Normal Injury: Therapeutic Implications. Curr. Med. Chem. v. 16, p. 130-134, 2009.
- 80 COMISSÃO NACIONAL DE ENERGIA NUCLEAR. Diretrizes Básicas de Proteção Radiológica. CNEN-NN-3.01- Março/2014.
- 81 OKUNO E., YOSHIMURA E, **Física das Radiações**. São Paulo: Editora Oficina de Textos, 2010.
- 82 JAEGER, R. G. Shielding Fundaments and Methods. Berlin Heidelberg New York: Springer-Verlag, 1968. (Engineering Compendium on Irradiation Shielding, v.1).
- 83 ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. Sistema de gestão da qualidade Requisitos: Rio de Janeiro: ABNT, 2008. (NBR ISO 9001).
- 84 HARRIS D. C. Análise química quantitativa. Rio de Janeiro. RJ: LTC, 2005. Ferramentas do Ofício. p. 25-48.
- 85 BAHL M. M., Avaliação do potencial neuroprotetor do zinco e quercetina em modelos de isquemia e estresse oxidativo. 2007. Dissertação (Mestrado) Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC.
- 86 ORZECHOWSKI A, GRZELKOWSKA K., KARLIK W., MOTYL T. Effect of Quercetin and DMSO on Skeletal Myogenesis from C2C12 Skeletal Muscle Cells with Special Reference to PKB/Akt Activity, Myogenin and Bcl-2 Expression. Basic Appl. Myol. v. 11, n. 1, p. 31-44, 2001.
- 87 THANGASAMY T., SITTADJODY S., LANZA-JACOBY S., WACHSBERGER P. R., LIMESAND K. H., BURD R. Quercetin Selectively Inhibits Bioreduction and Enhances Apoptosis in Melanoma Cells That Overexpress Tyrosinase. Nutr Cancer. v. 59, n. 2, p. 258-268, 2007.
- 88 CHUN-MING S., LINA H., YU-CHIH L., WEN-SEN L., WEI-FUNG B., SHU-HUI J.. Concentration-dependent differential effects of quercetin on rat aortic smooth muscle cells. Eur. J. Pharmacol. v. 496, p. 41-48, 2004.
- 89 ECVAM-Recommended Test method Protocol BALB/c NRU Cytotoxicity Test Method nº 07-4519, 2006.
- 90 REGULLA D. F., DEFFENERN U. Dosimetry by ESR Spectroscopy of Alanine, Int. J. Appl. Radiat. Is, v. 33, n. 11, p.1101-1114 (1982).
- 91 BOHRER A. C. A., Comparação dos sistemas dosímetricos da ALANINA e do Filme Radiocrômico B3 na irradiação industrial por feixe de Elétrons. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ (2011).

- 92 ALVES, N. M.; MOSCA R. C.; FERREIRA D. C.; SOMESSARRI E. S. R.; SILVEIRA C. G.; BUENO C. C.; MATHOR M. B. Comparison of Dosimetric Mapping of Radiation Induced skin Ulcer Animal Model in Nud and Wistar Rat. Anais XI International Nuclear Atlantic Conference – INAC 2013.
- 93 INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY. Radiation Oncology Physics. A Handbook for Teachers and Student, cap. 7, Clinical Treatment Planning in External Photon Beam Radiotherapy, p. 251. Vienna, Austria, 2005.
- 94 FERREIRA, D. C. Desenvolvimento e Calibração de um sistema dosimétrico de rotina em processamento por irradiação. 2013. Tese (Doutorado) – Instituto de Pesquisas Energética e Nucleares, São Paulo, SP.
- 95 INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY. Radiation Protection and Safety of Radiation Sources: International Basic Safety Standers. Vienna, Austria, 2012. (No GSR Part 3)
- 96 INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY. Absorbed Dose Determination in External Beam Radiotherapy. Vienna, Austria, 2006. (TRS n° 398)
- 97 BRASIL. **Procedimentos para o uso científico de animais.** Decreto nº 563, Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovação, Comunicação e Informática, 2008.
- 98 COLMAN D.; MELO C. B. F.; BRIOSCHI M. L.; SILVEIRA F.; JÚNIOR M. C.; BARBOSA M. C. Análise da Redistribuição de Calor com Agentes Inalatórios, em Ratos Submetidos a Laparatomia e Pneumoperitônio, através da Termografia Infravermelha. **Rev. Bras. Anestesiol.** v. 52: n. 3, p. 307-315, 2002.
- 99 SOFTONIC INTERNATIONAL S. L. Image Processing and Analysis in Java, Softonic, http://www.softonic.com.br. Acesso em: 17 nov. 2015.
- 100 MOSCA, R. C., ZEITUNI C. A., MATHOR M. B. Irradiador multipropósito com fontes colimadas de ⁶⁰Co. Anais X International Nuclear Atlantic Conference – INAC 2011.
- 101 LOMBARD K. A., GEOFFRIAU E. And PEFFEY E., Flavonoid Quantification in Onion by Spectrophotometric and High Performance Liquid Chromatography Analysis. **HortScience**. v. 37, n. 4, p. 682-685, 2002.