

OSVALDO DI HIPOLITO JUNIOR

**CONTRIBUIÇÃO AO ESTUDO DOS EFEITOS DA RADIAÇÃO X
SOBRE AS ENZIMAS GLUCOSE 6-FOSFATO DESIDRO-
GENASE (G6PD) E SUPERÓXIDO DISMUTASE (SOD)
DE CRISTALINO DE RATOS**

Tese apresentada à Faculdade de
Odontologia de Piracicaba, da
Universidade Estadual de Campi-
nas, para obtenção do grau de
Doutor em Ciências. Área de
Concentração: Farmacologia.

PIRACICABA - SP
1988

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

Aos meus pais,

pelo carinho e apoio que sempre me deram;

à Ana Lucia, minha esposa,

pela compreensão e desprendimento;

aos meus filhos, Luciana, Rosana e Vinicius,

pelo estímulo que para mim representam,

DEDICO ESTE TRABALHO

Ao Prof. Dr. JAIME APARECIDO CURY pela orientação segura
deste trabalho, nosso reconhecimento.

Ao Prof. Dr. NIVALDO GONÇALVES, o nosso agradecimento
pela oportunidade que nos proporcionou de ingressar na carreira uni-
versitária, nosso respeito.

A_G_R_A_D_E_C_I_M_E_N_T_O_S

À Diretoria da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, representada pelo seu Diretor, Prof. Dr. SIMONIDES CONSANI, nossa respeitosa homenagem;

Aos Professores da área de Farmacologia-Anestesiologia e Terapêutica, pela oportunidade que nos deram de frequentar o curso de Pós-Graduação, nossa gratidão;

Ao Biomédico CESAR ANTONIO B.SANCHES, por franquear o uso do Laboratório Clínico PREVLAB, onde realizamos parte desta pesquisa;

Ao Professor Doutor JOSÉ FRANCISCO HOFLING pelo empréstimo do aparelho de eletroforese.

Ao Estatístico RONALDO SEICHI WADA, pelas sugestões e execução da análise estatística;

Ao Cirurgião Dentista ANTONIO LUIZ RODRIGUES JUNIOR e ao Senhor IVES ANTONIO CORAZZA, pelos trabalhos de elaboração e digitação computadorizada deste trabalho;

À Bibliotecária IVANY DO CARMO GUIDOLIN GEROLA, pela gentil colaboração relativa às referências bibliográficas;

Aos funcionários MOACYR RANGEL PEETZ, MOYSÉS JOSÉ MARIA DA SILVA e WALDOMIRO VIEIRA FILHO, pela efetiva colaboração durante a colheita de material para este trabalho.

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO	8
------------------	---

CAPÍTULO II

REVISTA DA BIBLIOGRAFIA	12
-------------------------------	----

CAPÍTULO III

PROPOSIÇÃO	31
------------------	----

CAPÍTULO IV

MATERIAL E MÉTODOS	33
--------------------------	----

CAPÍTULO V

ANÁLISE DOS DADOS	42
-------------------------	----

CAPÍTULO VI

DISCUSSÃO	58
-----------------	----

CAPÍTULO VII

CONCLUSÕES	70
------------------	----

CAPÍTULO VIII

RESUMO	72
--------------	----

CAPÍTULO IX

SUMMARY	74
---------------	----

CAPÍTULO X

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	76
----------------------------------	----

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO

I N T R O D U Ç Ã O

A descoberta da radiação X em 1895, por Wilhelm Conrad Röntgen, proporcionou considerável progresso à ciência em geral, e em particular à área de saúde, onde houve um avanço significativo, tanto no auxílio ao diagnóstico como na terapêutica de inúmeras doenças.

Contudo, o que constatamos nesses quase cem anos de emprego da radiação X, é que essa mesma fonte de energia que tantos benefícios vem nos proporcionando, quando adequadamente empregada, também pode produzir efeitos deletérios de alta gravidade, embora as consequências danosas surjam, em geral, de forma lenta e silenciosa.

Essa dualidade de resultados é decorrente de inúmeras situações que podem ter basicamente duas causas fundamentais: de um lado a falta de conhecimento pleno dos efeitos da radiação ionizante, do outro, o descuido e até o desprezo dos operadores dos aparelhos radiográficos pelas normas de segurança.

A literatura é farta em registros de sequelas decorrentes da exposição à radiação X, que ocorreram desde praticamente a sua descoberta. Por exemplo, STONE (43), em 1952, relata um caso de dermatite provocada pela exposição a essa radiação, em um fabricante de tubos a vácuo, de nome EMIL H. GRUBBE, ainda em 1896, portanto apenas um ano após a descoberta dos raios X. Muitos outros acontecimentos semelhantes a esse, poderíamos mencionar, onde vidas foram sacrificadas em prol do desenvolvimento dessa energia. Porém, tais ocorrências foram compreensíveis, devido à falta de um conhecimento maior dessa energia, que ainda estava no início de seu desenvolvimento técnico.

Contudo, o que causa espanto é o fato de que, ainda hoje, presenciemos casos de pacientes que são submetidos a exames radiográficos sem que sejam tomados maiores cuidados quanto às melhores condições operacionais da aparelhagem e mesmo sem a devida proteção de regiões críticas do seu corpo.

Certamente muito mais que desconhecimento, como no passado, fica evidenciada a negligência dos profissionais, fazendo com que freqüentemente o paciente receba doses de radiação elevadas, sem necessidade.

Isto fica evidenciado nos inúmeros relatos que podemos encontrar na literatura especializada. Um deles é o de KOPF e colaboradores (29), em 1967, que fazem uma revisão de casos em que a radioterapia empregada no tratamento de neoplasias malignas de pálpebras resultou também em lesões próximas à área irradiada. Esses autores sugerem a utilização de uma proteção por eles idealizada, que tem por finalidade resguardar as áreas próximas ao alvo de radiação.

Outra situação também preocupante é a relacionada com as radiografias de rotina solicitadas pelos especialistas das áreas de saúde, e que, como sabemos, são realizadas com muita freqüência.

Embora, neste caso, as doses de radiação sejam pequenas quando comparadas às doses terapêuticas, ainda não se tem pleno conhecimento dos seus efeitos nos tecidos por ela atravessados. Certamente, não iremos notar, em geral, nenhuma modificação macroscópica nos tecidos irradiados. Contudo, o mesmo não podemos afirmar com relação às estruturas celulares e seus componentes estruturais.

Neste campo, merece especial atenção o comportamento das proteínas, quando são atingidas pela radiação X, e em particular o da-

no que essas radiações podem causar nas enzimas, que tão importante papel desempenham na mediação das reações presentes nos tecidos.

Uma das áreas que merece grande cuidado frente aos efeitos colaterais da radiação ionizante, durante as tomadas de radiografias, é a do cristalino, uma vez que as proteínas aí presentes, como acentuam DOVRAT & GERSHON (16), em 1981, são intensamente vulneráveis, podendo sofrer vários tipos de danos, dado o longo período de vida que apresentam e a deficiência, ou mesmo ausência, de possibilidade de renovação.

São cada vez mais freqüentes os casos de perda relativa ou mesmo total da visão, como decorrência de injúrias oculares, entre as quais aquelas provenientes de radiações ionizantes ocupam um lugar não desprezível.

Sensibilizado e preocupado com esses fatos, procuramos realizar o presente estudo, na tentativa de obter uma avaliação de algumas possíveis variações enzimáticas ocorrentes em cristalinos, relacionadas com o emprego da radiação X.

CAPÍTULO II

REVISTA DA BIBLIOGRAFIA

REVISTA DA BIBLIOGRAFIA

Durante a consulta a publicações referentes ao assunto que nos propusemos estudar, pudemos constatar o grande número de trabalhos referentes à atividade da glucose-6-fosfato desidrogenase (G6PD) em diversos tecidos. Porém, poucos foram aqueles em que se estudou o efeito da radiação ionizante sobre enzimas em cristalinos, tanto em humanos como em animais de laboratório.

Quanto a atividade da superóxido dismutase (SOD), a impressão que ficou da revista da bibliografia é que essa enzima foi ainda menos pesquisada do que a anterior, no que se refere à sua correlação com efeitos danosos provindos das radiações ionizantes.

Entretanto, antes de relatarmos propriamente os trabalhos que se referem diretamente aos estudos das avaliações enzimáticas, conviria fazer uma breve referência a trabalhos sobre os efeitos da radiação ionizante sobre tecidos vivos.

Mesmo antes da 2a. Guerra Mundial, cientistas e radiologistas se interessaram, de forma crescente, pelo assunto; porém não há dúvida de que os catastróficos efeitos, tanto a curto como a longo prazo, da radiação das bombas lançadas sobre Hiroshima e Nagasáki chamaram dramaticamente a atenção do mundo para a importância do assunto.

Como é de amplo conhecimento, a radiação ionizante apresenta efeitos lesivos, atuando em particular como um agente cataratogênico. Isto deveria fazer com que fossem tomados maiores cuidados na proteção dos olhos durante os exames radiográficos, bem como nos tratamentos radioterapêuticos.

Em 1956, BUDOWSKI e colaboradores (10) realizaram um estudo no qual avaliaram a quantidade de radiação que 40 pacientes receberam na cabeça e abdômen, durante exames radiográficos da boca (14 radiografias periapicais). As radiografias foram sensibilizadas por um aparelho radiográfico que operou com 65 kVp, 10 mA, filtração de 0,5 milímetros de alumínio e um total de 41 segundos de exposição. Para a região da cabeça utilizaram um dosímetro de câmara de ionização Victoreen, e obtiveram uma média da ordem de 61,1 R correspondente às várias regiões radiografadas. Os autores concluíram que esta dose está longe de ser insignificante, tomando por base a dose de eritema, que varia entre 300 a 400 R.

Contudo, essa dose mínima de eritema foi reavaliada por RICHARDS & ARBOR (39), em 1957, quando constataram ações lesivas mesmo para níveis de radiação sensivelmente mais baixos. Três em cada quatro indivíduos que estes autores estudaram, do total de vinte e nove, desenvolveram área de eritema na porção flexora do braço, quando submetidos a uma dose de apenas 165 R.

A partir de trabalhos semelhantes a este, nos quais estudos mais precisos mostraram resultados bem diferentes dos anteriormente encontrados, é que pesquisadores de diferentes centros científicos intensificaram sua preocupação em reexaminar as doses de radiação até então conhecidas, e que não haviam recebido atenção maior, quanto à possibilidade de virem a causar danos ponderáveis aos tecidos.

No tocante às doses e aos efeitos da radiação ionizante que incide no globo ocular, a principal preocupação é quanto ao comportamento do cristalino frente a esse agente agressor.

Em 1957, MERRIAN & FOCHT (33) realizaram um levantamento bibliográfico visando um conhecimento melhor quanto aos efeitos da radiação ionizante na produção de catarata. Baseados em dados colhidos em pesquisas, esses autores estabeleceram a dose entre 750 a 950 R, em um período de 3 semanas a 3 meses, para que 65% dos cristalinos humanos irradiados desenvolvessem catarata. Afirmam ainda que, nos casos onde a dose chega a ser de 1150 R, independente do período de tempo, fatalmente esses pacientes desenvolveriam tal patologia.

RICHARDS & ARBOR (40), reavaliaram em 1958, os resultados de BUDOWSKY e colaboradores (10), quando da determinação da dose total de radiação incidente na face, em exame radiográfico da boca (14 radiografias). Utilizando os mesmos fatores que BUDOWSKY, isto é, 65 kVp e 10 mA, RICHARDS & ARBOR empregaram um aparelho com uma filtração de 2,25 milímetros de alumínio e um total de 28 segundos de exposição. A somatória da radiação que a face recebeu foi da ordem de 23,8 R, sendo a região da pele acima dos pré-molares superiores aquela que recebeu a maior quantidade de radiação, 6,5 R.

Analisando e comparando os dados de BUDOWSKY e colaboradores (10) com os de RICHARDS & ARBOR (40), BJÄRNGARD e colaboradores (6) em 1960, não encontraram uma explicação para a grande diferença entre os resultados das duas pesquisas, não acreditando que isto se devesse unicamente às diferenças de filtração e dos tempos de exposição empregados pelos autores. BJÄRNGARD e colaboradores resolveram então executar a mesma avaliação dosimétrica realizadas nas pesquisas

anteriores. Empregaram um aparelho radiográfico que trabalhou com 60 kVp, 10 mA, uma filtração de 1,2 milímetros de alumínio e tempo de exposição total de 30,5 segundos. A dosimetria foi realizada também com uma câmara de ionização, encontrando estes autores uma dose total, incidente na superfície da pele da ordem de 26 rad, e, para a região do olho, 1500 mrad. Tais resultados foram bem mais próximos aos de RICHARDS & ARBOR (40).

Em 1964, PARKER e colaboradores (37) analisaram os efeitos ionizantes da radiação em regiões próximas aos olhos de 85 pacientes submetidos a radioterapia. Ao final do estudo, admitiram dificuldade na interpretação dos resultados e citam algumas variáveis, que dificultaram a análise: dose total absorvida, forma de administração, tipo de radiação ionizante, idade do paciente, intervalo de observação após o tratamento e resposta sistêmica do organismo frente ao agente agressor.

Esses autores ainda citam casos de diminuição de acuidade visual devido à formação de catarata, dentre todos os casos estudados. Um deles apresentou esse quadro dois anos após receber 3.570 rads e o outro depois de três anos e meio com a dose de 3.900 rads.

Outros relatos tem sido feitos nesse sentido, com o desenvolvimento de catarata após exposições ionizantes. GRÜTZNER (24), em 1966, refere-se a uma senhora que entrou em contato com radiação X durante a 2a. Guerra Mundial em um centro de controle de cartas ao estrangeiro. Após vários anos de progressivo embaçamento do cristalino, essa senhora apresentou, em 1958, catarata em ambos os olhos. Este autor disse explicitamente que deseja relatar o caso porque a causa do processo era algo insólito.

EDBROOK & EDWARDS (17), em 1967, ressaltaram que outros tipos de radiações podem ter efeito cataratogênico, citando dois antigos autores, HEISTER (26) e PLENK (38) que, já em 1739 e 1778 respectivamente, relataram casos de catarata em pessoas que olharam o sol por longos períodos.

Um estudo bem elaborado foi realizado por CASARETT (11), em 1968, no qual observou cristalinos expostos à radiação ionizante. Esse autor concluiu que o período latente entre a irradiação e a opacidade do cristalino, característica clínica da catarata, pode variar de meses ou até anos, e que o grau de intensidade da opacificação também pode ser variável. Doses excessivas para uma espécie de animal, como 15 rad aproximadamente, aumentam a incidência de catarata em camundongos. Já para o homem essa dose crítica é da ordem de 20 a 45 rads.

O mesmo autor afirmou que quando as doses são fracionada, ocorre um retardamento do processo de opacificação. Quanto ao efeito das diferentes intensidades empregadas, salienta que as doses baixas produzem principalmente injúrias em células individuais do epitélio do cristalino, proporcionando um decréscimo da atividade mitótica das células germinativas, ao passo que as doses altas rompem as estruturas celulares podendo tornar o cristalino completamente opaco.

Em 1971, ISMAIL e colaboradores (28) estudaram o efeito ionizante das radiações X e γ , em cristalino de cobaias, em diferentes períodos pós irradiação. Esses animais sofriam previamente injeção intraperitonal de fosfato radioativo (^{32}P) e em seguida eram irradiados com doses que podiam variar entre 400 a 1000 R.

Os animais foram sacrificados de duas a oito semanas após esse tratamento, chegando os autores às seguintes conclusões:

- 1) A dose de radiação e o período pós-irradiação apresentam um importante papel no desenvolvimento da catarata.
- 2) Uma dose entre 100 e 400 R de radiação X ou , em um período de 2 semanas após a irradiação, não foi suficiente para produção de catarata.
- 3) A prolongação do período de pós-irradiação de duas para oito semanas, com aplicações das mesmas doses, resultou no desenvolvimento de catarata.
- 4) Os resultados revelaram a existência de uma relação entre o desenvolvimento de catarata e a atividade funcional específica do cristalino. O desenvolvimento de catarata foi correlacionado à maior captação de ^{32}P no cristalino irradiado, em relação aos controles. Isto pode ser atribuído à estimulação mitótica das células irradiadas, levando à incorporação de uma quantidade maior de fósforo radioativo.

O aumento da captação do ^{32}P pode ser também devido a um aumento da permeabilidade das membranas celulares após a irradiação.

- 5) O ^{32}P pode ser usado como um traçador para detecção de danos no cristalino no período de pós-irradiação.

Finalmente aqueles autores concluíram que os mais altos níveis de captação do ^{32}P foram encontrados 96 horas após a injeção do referido isótopo.

ISHERWOOD e colaboradores (27), em 1975, atentos para possíveis danos a que o cristalino fica sujeito nos exames neuro-radiológicos, sugeriram o uso de óculos protetores para reduzir o efeito das altas doses de radiação, principalmente nas tomografias do rochedo e angiografias cerebrais.

Particularmente para radiografias intra-bucais (oclusal e periapical), FREITAS (20), em 1976, desenvolveu um trabalho em que determinou, por meio de dosímetros termoluminescentes, as doses de radiações incidente em órgãos críticos de pacientes edentados e crianças com dentição mista. Em adultos, a média de radiação incidente sobre o cristalino, quando a técnica empregada era a oclusal superior, foi de 0,175 rad. Para as radiografias periapicais, a média incidente sobre o cristalino foi de 0,444 rad.

MOOS (34), em 1977, fez uma análise das doses de radiação para tomografias multidimensionais da cabeça. Concluiu que para os olhos a quantidade de radiação absorvida varia conforme a técnica empregada e a distância que esta região ficava do tubo de raios X. Quando os olhos estavam próximos do tubo, a dose absorvida foi de 24.280 mR. Para os casos em que houve necessidade de um número máximo de exposições, a dose de radiação chegou a 33.970 mR. Entretanto, na publicação disponível o autor não menciona maiores dados sobre o número de radiografias e distâncias entre o olho e o tubo de raios X.

Ainda no ano de 1977, BERGSTRÖM¹¹ e colaboradores (5), com auxílio de um "phantom", simularam situações muito próximas àquelas encontradas "in vivo" e estudaram as doses de radiação em várias técnicas radiográficas. Para tanto, utilizaram dosímetros de câmara de ionização e termoluminescentes. Nas radiografias laterais, a região do

globo ocular recebeu 0,5 rad, e 0,7 rad para as radiografias antero-posteriores. Quando o globo ocular foi protegido por uma lâmina de vidro plumbífero de um milímetro de espessura, as doses passaram a ser de 0,05 rad para as radiografias laterais, e de 0,06 rad para as anteroposteriores.

Em 1982, BóSCOLO e colaboradores (8), utilizando os dosímetros termoluminescentes de fluoreto de lítio 700, determinaram, entre outros achados, o quanto de radiação as regiões de íris e cristalino recebem em um exame radiográfico intra-bucal, de boca toda. O aparelho de raios X operou nas condições 65 kVp, 10 mA, 1,5 milímetro de alumínio como filtro e um tempo de 1 segundo de exposição. Nessas condições, os autores registraram a média de 1,354 R para a região de íris e cristalino.

DI HIPOLITO e colaboradores (15), em 1985, desenvolveram uma pesquisa na qual avaliaram doses de radiação incidente em órgãos críticos de pacientes e operador, durante a tomada de radiografias cefalométricas. Cada paciente foi submetido a duas exposições radiográficas, com o emprego dos seguintes fatores: 85 kVp, 15 mA e 4/10 de segundos de exposição; 70 kVp, 15 mA e 1,2 segundos de exposição. Os dosímetros de fluoreto de lítio 700 registraram para a região de íris e cristalino, do lado direito, 7,73 mR; e 1,63 mR para a região de íris e cristalino do esquerdo, na condição de 70 kVp, 15 mA e 1/2 segundos.

Quando as condições operacionais do aparelho passaram para 85 kVp, 15 mA e 4/10 de segundos, os dosímetros termoluminescentes registraram médias de 6,33 mR para a região de íris e cristalino do lado direito, e 2,19 mR para o lado esquerdo.

Quanto ao enfoque do efeito ionizante da radiação X nas estruturas do cristalino, procuraremos nos cingir, nessa revisão bibliográfica aos trabalhos que abordam principalmente os aspectos bioquímicos, em particular relacionados com a atividade G6PD e da SOD.

A atividade da SOD no organismo, como relatam LESSI e colaboradores (30), em 1986, foi descrita inicialmente por McCORD & FRIDDOVICH (32), no ano de 1969, em pesquisa sobre as propriedades e processos de isolamento desse enzima. A partir daí, vários autores tem se dedicado ao estudo dos mecanismos bioquímicos e fisiológicos desse enzima.

Prosseguindo as pesquisas sobre correlações entre substâncias proteicas do olho e catarata, DILLEY (14), em 1975, estudou os agregados de proteínas em cristalinos humanos. Encontrou valores da ordem de 0,1% de agregados de proteínas de alto peso molecular no total de proteínas solúveis, permanecendo esta porcentagem constante com o decorrer dos anos. Já para os indivíduos com catarata, a porcentagem é mais alta, representando 8,5% do total das proteínas solúveis. Segundo o autor, estes valores são menores do que os citados na literatura, e não apoia a sugestão de que a agregação de proteína possa ser a causa da catarata.

Em 1976, CHAN & SHUKOVSKY (12) avaliaram as prováveis seqüelas em pacientes que foram submetidos a tratamento de tumores malignos da cavidade nasal, recebendo doses de 6.000 rads durante 6 meses. De acordo com esses autores, nem sempre foram observados efeitos como a perda de visão e outras complicações, apesar de o globo ocular estar totalmente incluído na área de radiação.

Do total de 22 pacientes que receberam somente radiação, 2/3 não relataram maiores dificuldades visuais após o tratamento. Entretanto, nos casos (18 pacientes) em que foi usado 5-fluoracil (5-FU) como quimioterapia paralela à radioterapia, a perda de visão foi bem maior, e todos os pacientes, no prazo de 2 anos, apresentaram complicações oculares ou mesmo cegueira.

O cristalino do globo ocular se caracteriza por apresentar na sua composição uma alta porcentagem de proteínas, dentre elas a γ -cristalina que foi fracionada por WAGNER & FU (44), em 1978. Esses autores isolaram daquela proteína, do cortex do cristalino de rato, seis subfrações que foram denominadas "subfração a", "subfração b" ... "subfração f". A "subfração a", a primeira a ser eluída, constitui 11% do total, e as outras subfrações 33, 25, 13, 12 e 6%, respectivamente.

Após a indução de catarata nos ratos, através da administração de galactose, os autores observaram uma diminuição em 10% de

γ -cristalina em relação aos cristalinos controle. Depois de ocorrido o processo cataratogênico, as porcentagens das referidas frações se apresentaram assim distribuídas: 5, 27, 41, 13, 12 e 2%, respectivamente.

Em 1978, GUPTA & BAWA (25) estudaram a atividade da G6PD em testículos de ratos tratados com doses de radiação gama da ordem de 720 e 2000R, incidentes no corpo inteiro. Ambas as doses estimularam a atividade enzimática. Contudo, quando a dose empregada foi a sub-letal, de 720 R, o aumento enzimático ficou mais evidente.

Após a dose letal de 2000 R, a atividade enzimática aumentou 1,8 vezes no 7º dia, e depois declinou até próximo ao nível do grupo controle. Entretanto, no grupo em que foi aplicada a dose sub-letal, a atividade enzimática aumentou continuamente durante todo o período de observação.

Quando os autores administraram actinomicina D, 24 horas após a irradiação, a atividade de G6PD foi consideravelmente diminuída do 15º ao 30º dia após a irradiação. Entretanto, quando o actinomicina D foi administrado 18 horas antes do sacrifício dos ratos, isto é, no 27º dia, somente 30% da atividade enzimática induzida foi abolida.

Os autores também procuraram investigar os efeitos da aplicação da testosterona nos ratos irradiados. Quando os ratos dos dois grupos receberam pequenas doses de testosterona (0,7 mg), a atividade da G6PD foi reduzida no grupo de ratos controle, porém os irradiados não apresentaram variações da enzima. Contudo, quando grandes doses de testosterona foram administradas (2,5 e 5,0 mg), a atividade da enzima foi diminuída tanto nos ratos irradiados como no grupo controle.

GIBLIN e colaboradores (22), em 1978, estudaram em cristalinos de coelhos com catarata induzida por meio de radiação X, a quantidade e o possível mecanismo de formação dos agregados de proteínas de alto peso molecular (APM).

A fração de proteína de APM (peso molecular $> 4 \times 10^6$ daltons) foi isolada por meio de cromatografia de filtração em gel e constitui aproximadamente 18% do total da porção protéica solúvel. Esta proporção foi verificada tanto no núcleo como no cortex dos cristalinos.

A concentração de grupos sulfidrilos (-SH) por miligrama de proteína na fração APM foi 3 vezes maior do que em α -cristalino normal.

Os autores ainda constataram que 50% da concentração total dos radicais -SH, contidas nas proteínas de APM, encontravam-se oxidadas. Este fato foi verificado somente quando o cristalino apresentava uma completa opacidade, típica do estágio final da catarata.

Verificaram também que essa proteína de APM é composta tanto pela α como pela β -cristalina unidas por ligações intermoleculares de dissulfeto.

Prosseguindo os estudos, GIBLIN e colaboradores (23), em 1979, pesquisaram os efeitos da radiação X na atividade de sete enzimas, em cristalinos de coelhos albinos, com idade de 5 semanas. Um olho recebeu uma única dose de 2000 rad e o outro, protegido por uma blindagem, serviu como controle. Quatro das sete enzimas estudadas apresentaram diminuição em suas atividades: G6PD, hexoquinase, gliceraldeído fosfato desidrogenase e fosfofrutoquinase.

A atividade da G6PD, a primeira enzima do desvio da hexose monofosfato (HMS), diminui gradualmente nos cristalinos após a irradiação X. De acordo com o gráfico apresentado pelo autor, essa diferença do irradiado em relação ao controle vai aumentando de modo contínuo e quase uniforme, durante todo o tempo do experimento que chegou ao máximo 7 semanas. Tomando-se por base um cristalino, houve 25% de decréscimo na atividade desta enzima ao fim de 4 semanas, e diminuição de 35% ao final de 7 semanas após a radiação. Baseando-se na unidade de peso úmido, o decréscimo na atividade da G6PD foi de 20 a 27% para 4 e 7 semanas, respectivamente, após a radiação.

A relativa inativação observada na G6PD (27% de decréscimo de atividade, na base de peso líquido) pode não ser suficiente para levar a uma diminuição da atividade do HMS. Outros fatores podem estar presentes, tais como: diminuição da atividade da hexoquinase, diminuição do nível de NADP+, ou possivelmente uma diminuição na captação da glicose.

Em 1979, SONKA (42) realizou um estudo da atividade da G6PD em fígado de ratos irradiados. O autor utilizou um aparelho de raios X Makrofos 250 nas seguintes condições: 250 kVp, 15 mA, filtro 0,5 milímetros de alumínio, com distância focal 100 centímetros e colimador de 7,8 milímetros. Durante a irradiação, os ratos foram mantidos individualmente em gaiolas plásticas recebendo uma dose de 10 R/minuto, num total de 800 R.

A atividade enzimática da G6PD foi acompanhada por 7 dias. Imediatamente após a irradiação ocorreu um leve aumento da atividade dessa enzima, que, 24 horas depois, apresentou uma progressiva diminuição.

Os menores valores distanciaram-se 40% dos valores controles, e isto ocorreu no 4º dia após a irradiação. A partir do 5º dia, a tendência foi um aumento da atividade da enzima G6PD.

Assim, baseado em seus achados, o autor considera que tais mudanças na atividade da G6PD e da via das pentoses fosfato (PPP - Pentose Phosphate Pathway) são capazes de influenciar algumas células básicas, como aquelas presentes na síntese protéica e divisão celular. As pentoses produzidas via PPP são utilizadas nas sínteses de RNA e DNA. A redução extra-mitochondrial de NADP^+ via PPP é indispensável na transformação de folatos em tetraidrofolatos e conseqüentemente para a síntese de purina e pirimidina.

SONKA ainda considera que o aumento imediato do nível de G6PD não está de acordo com a diminuição da concentração de NADPH. Nesses experimentos, a diminuição do NADPH estabilizou-se desde o 1º dia após a irradiação, e o autor acredita que isto pode ser devido não apenas à diminuição da atividade da G6PD, mas também a um aumento de oxidação da NADPH por peróxidos e radicais livres.

BANKS e colaboradores (2), em 1979, analisando os dados relativos ao estudo que realizaram na produção de catarata induzida por radiação, consideraram fator importante a idade do animal na evolução da moléstia. Animais jovens desenvolveram catarata com maior frequência do que aquela observada em animais mais velhos. A razão parece estar relacionada ao número de mitoses danificadas durante a exposição ionizante.

FUKAMI (21), em 1980, também estudando os efeitos da radiação em cristalinos de ratos, atribuiu à insuficiência circulatória dos capilares, que fornecem nutrição à íris e ao corpo ciliar, como

fator preponderante na produção de catarata. Entretanto, diz não poder negar que a cataratogênese seja uma consequência direta da radiação.

Na Tailândia, PANICH & NAKORN (37), em 1980, avaliaram a quantidade de G6PD em eritrócitos de indivíduos com catarata senil. Em 338 homens que apresentaram catarata senil, 5,92% possuíam deficiência da G6PD, enquanto que 446 outros homens de um grupo controle mostraram uma carência de 6,9% dessa enzima.

O resultado entre 201 mulheres com catarata senil foi de 16,29% de insuficiência de G6PD. O grupo controle para as mulheres foi de 200 indivíduos com deficiência de 14% dessa enzima.

Baseados nesses achados, os autores concluem que na Tailândia a deficiência de G6PD em geral não é um fator cataratogênico.

ORZALESE e colaboradores (35), em 1981, encontraram uma significativa deficiência da G6PD nos eritrócitos de 210 pacientes homens portadores de catarata, em comparação a outros 672 indivíduos controles. Os autores sugerem que a diminuição da atividade da G6PD possa desempenhar um papel cataratogênico. Também insinuaram que a carência dessa enzima pode estar associada a outras condições, como nos casos de deficiência de riboflavina ou estados galactosêmicos, onde a catarata apresenta um sensível indicador de anormalidades metabólicas dos eritrócitos.

Em 1981, FAGERHOLM e colaboradores (18) determinaram a distribuição de proteínas em 21 cristalinos íntegros de pacientes portadores de neoplasias. Os autores verificaram que há um aumento gradual e contínuo da concentração de proteína, da periferia para o centro do cristalino. Tanto na região central como na periferia, as concentrações de proteína não sofreram grandes modificações com a idade

do paciente.

DOVRAT & GRESHON (16), em 1981, avaliaram a atividade da G6PD e também da SOD em cristalinos íntegros de ratos, em função da idade dos animais.

Com referência à atividade da G6PD, os autores encontraram uma considerável diminuição nos cristalinos de animais mais velhos.

A eletroforese da G6PD em geis de poliacrilamida mostrou que são 3 as formas isoenzimáticas encontradas em cristalinos de animais jovens (2 dias e 6 meses). Já nos cristalinos de ratos com idade de 27 meses, aparentemente falta a forma isoenzimática de menor migração eletroforética, afirma o autor.

Quanto à SOD, esses autores também encontraram, em proteína total, uma diminuição da atividade enzimática em animais mais velhos (6 meses e 27 meses). Entretanto, a eletroforese mostrou a existência das mesmas formas isoenzimáticas de SOD em cristalinos de animais jovens (2 dias) e em cristalinos de animais de 6 meses.

Uma particularidade da ação biológica da SOD chamou a atenção dos pesquisadores: a possibilidade dessa enzima exercer uma ação radioprotetora nos organismos vivos. Sintomaticamente, provém do Japão o primeiro estudo que encontramos sobre o importante assunto. Na Universidade de Kyoto, ABE e colaboradores (1), em 1981, estudaram os efeitos da concentração e formas de administração dessa enzima sobre as reações da pele em ratos irradiados. As doses de radiação foram aplicadas no dorso do animal utilizando-se um colimador de 1,5 centímetro de diâmetro e uma dose de 20 Gy (100 rad = Gray). Os autores concluíram pela evidência de uma ação protetora da SOD administrada

dentro de certos limites.

Contudo, experimentos de uso terapêutico da SOD visando melhorar as condições de transparência do cristalino de cães com cataratas senis, realizados por BRAINARD e colaboradores (9), em 1982, não tiveram o êxito desejado, contrariando assim uma expectativa baseada em relatos anteriores aparecidos na literatura especializada.

Visando estudar o desenvolvimento de catarata em olhos de coelhos jovens (5 a 6 semanas), WORGUL e colaboradores (46), em 1981, utilizaram uma dose local de 20 GY de radiação X. Uma semana após a irradiação, os animais começaram a apresentar uma progressiva opacidade do cristalino, semelhante à catarata desenvolvida em coelhos velhos.

Em 1982, o mesmo WORGUL com outros colaboradores (47) desenvolveram um estudo em que pesquisaram o efeito da radiação X em cristalinios de animais de diferentes idades. Observaram que os ratos com idade próxima a 4 semanas foram os mais vulneráveis. Estes animais apresentaram fragmentação dos núcleos nas células da região meridional do cristalino, quando foram submetidos a uma dose de radiação de 10 GY. Para reproduzir esse mesmo dano em animais mais velhos, a dose de radiação precisou ser maior.

Esses autores também estudaram a resistência a esta injúria em outros animais (camundongos, coelhos e sapos), encontrando espécies mais susceptíveis ao desenvolvimento de catarata que outras. Por exemplo, o camundongo exibiu opacidade do cristalino, com doses ao redor de 15 a 30 R de radiação X, enquanto que doses maiores foram necessárias para ratos, e ainda maiores para coelhos.

Em 1983, FECONDO & AUGUSTEYN (19) publicaram os resulta-

dos de suas pesquisas sobre a atividade de três enzimas, a catalase, SOD e glutathion peroxidase, encontradas no olho, correlacionando-as com o desenvolvimento de catarata. As medidas foram realizadas nas seções nuclear e cortical de 76 cristalinos afetados por catarata, provenientes de seres humanos, bezerros, coelhos e ratos. Os autores relataram que não foram observadas mudanças de atividade da catalase, porém registraram decréscimo intenso, da ordem de 70%, tanto em relação a SOD como a glutathion peroxidase, na região nuclear, no início do processo da catarata. Acrescentaram ainda observações sobre um decréscimo ulterior, porém menos intenso, na região cortical do cristalino.

WILLSON (45), em 1984, discute a eficácia do tratamento enzimático por meio da SOD, inclusive no campo da radiobiologia, mostrando-se cético em relação aos seus resultados, e sugerindo que muito precisa ser pesquisado para serem encontradas conclusões mais seguras.

Em 1984, BÓSCOLO (7) estudou as variações das atividades enzimáticas em olhos de cães submetidos a baixas doses de radiação X. O olho irradiado foi o do lado direito, recebendo uma única dose de 7,34 R, desempenhando o olho esquerdo a função de controle. As enzimas pesquisadas foram glutathion redutase, G6PD, β -N-acetil hexosaminadase e a fosfatase ácida. Com referência à atividade da enzima G6PD do cristalino, esse autor verificou inicialmente um aumento da atividade enzimática da ordem de 19,27%, 24 horas após o olho ser irradiado. Porém, após 48 horas, obteve uma diminuição de 40,48% na atividade da enzima do cristalino irradiado em relação ao controle, o que por si só poderia causar catarata, diz o autor.

CAPÍTULO III

PROPOSIÇÃO

PROPOSIÇÃO

Por intermédio de um experimento com ratos criados em biotério, submetidos a radiação X dirigida para a região do olho, propomos a:

- 1 - Pesquisar possíveis variações da atividade da enzima glucose 6-fosfato desidrogenase (G6PD) nos cristalinos irradiados em relação ao controle, dentro do prazo de 96 horas.
- 2 - Pesquisar possíveis variações isoenzimáticas da G6PD, nos cristalinos irradiados, em relação aos controles.
- 3 - Pesquisar possíveis variações isoenzimáticas da superóxido dismutase (SOD), nos cristalinos irradiados, em relação aos controles.

CAPÍTULO IV

MATERIAL E MÉTODOS

MATERIAL E MÉTODOS

MATERIAL

No presente estudo foram utilizados 102 ratos Wistar (*Rattus norvegicus albinus*), machos, de 90 dias de idade, provenientes do Biotério Central da UNICAMP. Durante o experimento os animais receberam ração comercial e água a vontade.

Destes animais, 56 receberam uma dose de radiação X, constituindo-se no grupo experimental. O segundo grupo, com um total de 46 animais, serviu de controle.

Os animais foram sacrificados 6, 12, 24, 48 e 96 horas após a irradiação, para serem feitas análises do efeito ionizante.

MÉTODOS

1 - Irradiação

Para a irradiação dos olhos, cada animal foi previamente anestesiado, através da inalação de éter sulfúrico, e colocado em decúbito dorsal com o corpo e a mandíbula apoiados sobre uma mesa.

O aparelho de raios X empregado foi um GE-1000 eletrônico, modelos 46:158840 GI. Acoplado ao cabeçote do aparelho foi utilizado um colimador de metal de 120 milímetros de comprimento por 20 milímetros de diâmetro. Esse acessório, além de proporcionar uma padronização da distância em que foram efetuadas as exposições, também au-

xiliava na incidência do feixe de raios X, tornando-o, portanto, mais eficaz.

O aparelho assim preparado foi direcionado para um olho do animal, ficando à distância de 10 milímetros deste, seguindo o sentido súpero-inferior, de modo que o eixo do feixe formasse um ângulo de 15°, aproximadamente, com a direção do olho que não ia ser sensibilizado nessa primeira etapa. Além desse cuidado, quando um olho ia receber a radiação X, o outro ficava protegido por uma lâmina de chumbo de 5 milímetros de espessura.

Uma vez sensibilizado o primeiro olho, invertíamos toda a operação, visando agora o outro olho. Desta forma, procuramos evitar, ao máximo, uma dupla exposição dos cristalinos.

A dose de radiação X empregada, da ordem de 10,26 R, foi conseguida mediante uma condição de 65 kVp, 10 mA e 6 exposições de 4 segundos. Esta dose foi estabelecida depois de experimentos prévios, onde se empregaram diferentes doses de radiação X, pesquisando-se as conseqüentes alterações na atividade da enzima G6PD.

Essa dose, necessariamente igual para todos os grupos estudados, foi ainda controlada através de dosímetros termoluminescentes de cristais de fluoreto de lítio-700 (LiF-700). Tal tipo de dosímetro, fabricado pela "The Harshaw Chemical Company", é constituído por cristais de LiF-700 medindo 2 por 2 centímetros de base por 1 milímetros de espessura.

Para facilitar o seu manuseio e sua proteção, frente a umidade e impurezas que pudessem alterar os resultados, os cristais foram condicionados em embalagem especial constituídas por saquinhos de plástico de 0,003mm de espessura. Em cada uma dessas embalagens co-

locaram-se dois cristais, que, após serem sensibilizados iriam fornecer leituras, separadamente, das doses de radiação neles armazenadas, possibilitando a determinação da média dessas leituras.

Os cristais de LiF700, assim condicionados, foram colocados junto ao olho do animal e presos com fita adesiva, dentro da área de ação dos raios X, limitada pelo colimador. Desta forma, para cada animal irradiado empregamos quatro cristais, dois para cada olho.

A leitura das doses de radiação armazenadas nos cristais de LiF-700 foi realizada em um aparelho, fabricado também pela firma "The Harshaw Chemical Company", composto por um "Thermoluminescence Detector" modelo 2.000 A, um "Automatic Integrating Picoameter" modelo B.

Os cristais sensibilizados foram colocados um a um no "Thermoluminescence Detector", onde, a uma temperatura de 250°C, a energia é liberada na forma de energia luminosa que é quantificada em dígitos pelo segundo aparelho, o "Automatic Integrating Picoameter". Através de um gráfico de conversão estabelecido para cada um dos grupos irradiados, os dígitos que representam a energia acumulada nos cristais foram transformadas na unidade de radiação R(Roentgen). Para a confecção do gráfico conversor foi necessário o conhecimento exato da energia efetiva e do rendimento do aparelho de raios X utilizado. Isto foi conseguido através da "Assessoria Técnica em Física Médica Ltda", firma especializada em dosimetria de aparelhos de raios X médicos e odontológicos.

2 - Análises Bioquímicas

2.1 - Extração das enzimas

Os animais irradiados foram sacrificados, através de traumatismo crâniano, nos tempos previamente estabelecidos, juntamente com os ratos do grupo controle, e retirados os seus cristalinos. Para tanto, removeu-se o globo ocular, que era em seguida lavado em soro fisiológico e seco em papel de filtro. Imediatamente após essa lavagem, promoveu-se a secção do globo ocular e a remoção do cristalino, que era imediatamente acondicionado em um recipiente com soro fisiológico a uma temperatura em torno 0°C , o que era obtido por meio de gelo moído, mantido em recipiente de isopor.

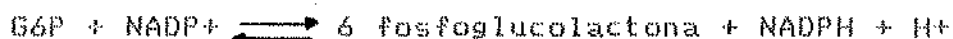
Por meio de papel de filtro, o excesso de solução fisiológica dos cristalinos foi removido, sendo estes em seguida pesados em uma balança analítica Microwa CH 9428.

Os pares de cristalinos de cada animal foram homogeneizados a 10% (P/V) em uma solução contendo Tris - HCL 0,1M mercaptoetanol 1 mM e EDTA a 1mM, em um pH final de 7,4, conforme método empregado por SASSAKI & NICOLAU (41) em 1982. Em seguida, o homogeneizado foi centrifugado a $10.000 \times g$ durante 30 minutos, a 4°C , em uma centrífuga refrigerada de marca "International P.R. 2". Do produto final da centrifugação, foi utilizado o sobrenadante para a determinação da atividade da enzima G6PD.

2.2 - Determinação da Atividade da G6PD

Para o estudo desta enzima, empregamos o método analítico que se baseou na redução do NADP⁺ (Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato). Esta análise foi possível medindo-se as variações de absorbâncias a 340 nm, através de um espectrofotômetro de "Gilford Stasar III", acoplado a um digitador "Computer Printer 1000", que funcionou a uma temperatura de 25 C, durante um tempo de 3 minutos.

Para a determinação da G6PD, baseamo-nos na propriedade bioquímica que tal enzima possui de catalisar a reação seguinte:



A atividade da enzima é avaliada pela velocidade de formação do NADP reduzido (NADPH + H⁺). Isto se faz medindo-se o aumento da absorbância de 340 nm, no seguinte meio de reação: Tampão Tris - HCL 50 mM; pH 7,4; Mg Cl₂ 3,3 mM; G6P 1,33mM e NADP⁺ 0,09mM. Para essas determinações foram utilizadas quantidades iguais de 40 ul da fração solúvel dos homogeneizados.

Através da fórmula publicada por BERGMEYER e colaboradores (4) em seu livro "In Methods of Enzymatic Analysis", editado em 1974, foi possível calcular a absorbância por minuto, e assim avaliar a atividade enzimática. A fórmula é a que segue:

$$\Delta A/\text{min} \times V$$

onde: ----- = unidades de atividade enzimática por ml

$E \times d \times v$ de homogeneizado,

$\Delta A/\text{min}$ = variação da absorbância por minuto;

V = volume total do sistema na cubeta em ml;

E = coeficiente de extinção molar das coenzimas reduzidas, NADH ou NADPH; a 340nm, igual a 6,22 cm / $\mu\text{mol/ml}$.

d = passagem de luz, 1cm;

v = volume em ml do homogenado utilizado na pesquisa.

A atividade específica da enzima G6PD foi expressa em miliunidades de atividade enzimática por miligrama de proteína (mU/mg). A concentração de proteína nos extratos foi determinada de acordo com LOWRY e colaboradores (31).

A unidade (U) corresponde a atividade de enzima capaz de catalisar a redução de um micromol de NADP por minuto, nas condições determinadas pelo método.

2.3 - Análises das isoenzimas

A separação das isoenzimas foi realizada através da eletroforese em géis de poliacrilamida segundo DAVIS (13), em 1964. O procedimento da extração de isoenzimas foi o mesmo descrito

anteriormente (2.1), a exceção da utilização de dois cristalinós para cada 0,25 ml de tampão. Foram utilizados geis com 7% de acrilamida no gel de separação, com o comprimento de 5,5 centímetros por 0,5 centímetros de diâmetro. Foram submetidos a eletroforese, 10 a 20 μ l dos sobrenadantes dos extratos.

A eletroforese foi realizada a 4°C, a 1,0mA/gel até que o corante indicador atingisse o gel de separação, aumentando-se para 3mA/gel até o final da migração eletroforética. O aparelho utilizado foi o modelo Permatron.

2.3.1 - Análise da G6PD

A evidenciação da G6PD foi realizada segundo o método de Holten, descrito em 1972, conforme cita DOUV RAT & GERSHON (16).

Após a eletroforese os geis de poliacrilamida permaneceram em uma solução corante por 15 minutos, a uma temperatura de 30° C, seguida de uma fixação em ácido acético a 7%. A solução corante continha 150 μ mol de glucose 6-fosfato, 15 μ mol de NADP, 1,0 mmol de Mg Cl₂, 5,0 mmol de Tris, 4,2 mg de fenazinametossulfato (PMS) e 24 mg de NBT (nitrobluetetrazólio) por ml de solução.

Após a coloração, os geis foram fotografados, e fez-se o traçado densitométrico das bandas, utilizando-se um densitômetro Auto Scanner Flur-Vis - Helena Laboratories.

Os índices de mobilidade relativa (R_m) são calculados em cada caso pela relação entre a distância percorrida por determinada proteína (A) e a percorrida pelo corante indicador (B)

A

Rm = -----

B

2.3.2 - Análise de SOD

A evidenciação da SOD foi feita segundo o método de BEAUCHAMP & FRIDOVICH (3), descrito em 1971. Para tanto, os geis foram incubados em 2,4 mM de nitrobluetetrazolium (NBT) por 20 minutos; após esse período foram imersos, durante 15 minutos, em uma solução de tetrametilenodiamino a 28 mM, e riboflavina a 0,028 mM em tampão fosfato 0,036 M de pH 7,8. Em seguida, os geis foram então iluminados por 5-15 minutos até o aparecimento das bandas, após o que fotografamos, sendo a atividade das bandas registradas com o auxílio de um densitômetro Auto Sanner Flur-Vis --- Helena Laboratories.

Os índices de mobilidade de SOD foram calculados de maneira análoga àquela empregada para as isoenzimas de G6PD.

CAPÍTULO V

ANÁLISE DOS DADOS

ANÁLISE DOS DADOS

Para a comparação das médias da atividade da enzima G6PD, em cada um dos tempos estudados, aplicamos o teste t de Student ao nível de significância de 5%.

Assim sendo, desenvolvemos as seguintes comparações entre os grupos irradiado e o controle, nos diferentes tempos:

TABELA 1 - Atividade da G6PD no grupo controle (n = 9) e no grupo irradiado (n = 12), 6 horas após a irradiação dos cristalinos

ATIVIDADES DA G6PD	
(mU/mg proteína)	
GRUPOS	
Controle	Irradiado
0,457	0,346
0,401	0,635
0,466	0,645
0,512	0,476
0,302	0,454
0,284	0,584
0,622	0,474
0,884	0,565
0,783	0,591
	0,556
	0,691
	0,769

As médias encontradas para os grupos foram:

Controle : 0,523

Irradiado: 0,566

Diferença entre as médias: 0,22%.

A comparação entre as médias, através do teste t ($t = 0,6117$) mostra que não houve diferença significativa na atividade de G6PD, entre os grupos irradiado e controle, 6 horas após a irradiação, ao nível de significância de 5%.

TABELA 2 - Atividade da G6PD no grupo controle (n = 10) e no grupo irradiado (n = 12), 12 horas após a irradiação dos cristalinios.

ATIVIDADES DA G6PD (mU/mg proteína)	
GRUPOS	
Controle	Irradiado
0,506	0,617
0,410	0,898
0,751	0,445
0,440	0,489
0,457	0,488
0,536	0,388
0,684	0,422
0,772	0,413
0,743	0,752
0,809	0,749
	0,689
	0,780

As médias encontradas para os grupos foram:

Controle : 0,611

Irradiado: 0,594

Diferença entre as médias = -2,78%

O resultado obtido, através do teste t ($t = 0,2391$), mostra que não houve diferença significativa na atividade da G6PD, no tempo de 12 horas após a irradiação dos olhos dos animais, ao nível de significância de 5%.

TABELA 3 - Atividade de G6PD no grupo controle ($n = 7$) e no grupo irradiado ($n = 8$), 24 horas após a irradiação dos cristalinos

ATIVIDADES DA G6PD (mU/mg proteína)	
GRUPOS	
Controle	Irradiado
0,642	0,487
0,599	0,497
0,701	0,678
0,647	0,630
0,730	0,590
0,720	0,990
0,560	0,800
	0,760

As médias encontradas para os grupos foram:

Controle : 0,657 Irrradiado: 0,680

Irrradiado: 0,680

Diferença entre as médias: 3,50%

Ao nível de significância de 5%, o teste t ($t = -0,3397$) utilizado na comparação de médias entre grupos mostra que não houve diferença significativa na atividade da G6PD, entre o grupo irradiado e o controle, 24 horas após a irradiação dos cristalinos.

TABELA 4 - Atividade da G6PD no grupo controle (n = 9) e no grupo irradiado (n = 12), 48 horas após a irradiação dos cristalinoss

ATIVIDADES DA G6PD (mU/mg proteína)	
GRUPPOS	
Controle	Irrradiado
1,020	0,780
1,200	0,260
1,020	0,540
0,660	0,840
0,870	0,730
0,790	0,820
0,622	0,790
0,884	0,680
0,783	0,556
	0,514
	0,382
	0,590

As médias encontradas para os grupos foram:

Controle : 0,872

Irradiado: 0,624

Diferença entre as médias: -28,45%

A comparação entre as médias dos grupos irradiado e controle, através do teste t ($t = 3,0655$), mostra que há uma diferença significativa de atividade da G6PD, ao nível de significância de 5%.

Pelos resultados podemos dizer que em média o grupo irradiado apresenta menor atividade da G6PD em relação ao grupo controle.

TABELA 5 - Atividade da G6PD no grupo controle (n = 9) e no grupo irradiado (n = 10), 96 horas após a irradiação dos cristallinos

ATIVIDADES DA G6PD (mU/mg proteína)	
GRUPOS	
Controle	Irradiado
1,340	0,740
1,150	0,900
0,680	0,890
0,670	0,840
0,650	0,740
0,700	0,720
0,408	0,790
0,503	0,822
0,538	0,683
	0,659

As médias encontradas para os grupos foram:

Controle : 0,769

Irrradiado: 0,778

Diferença entre as médias: 1,17%

O resultado do teste t ($t = -0,0925$), ao nível de significância de 5%, mostra que não houve diferença significativa na atividade da G6PD no tempo de 96 horas após a irradiação dos cristalinos dos animais dos grupos irradiado e controle.

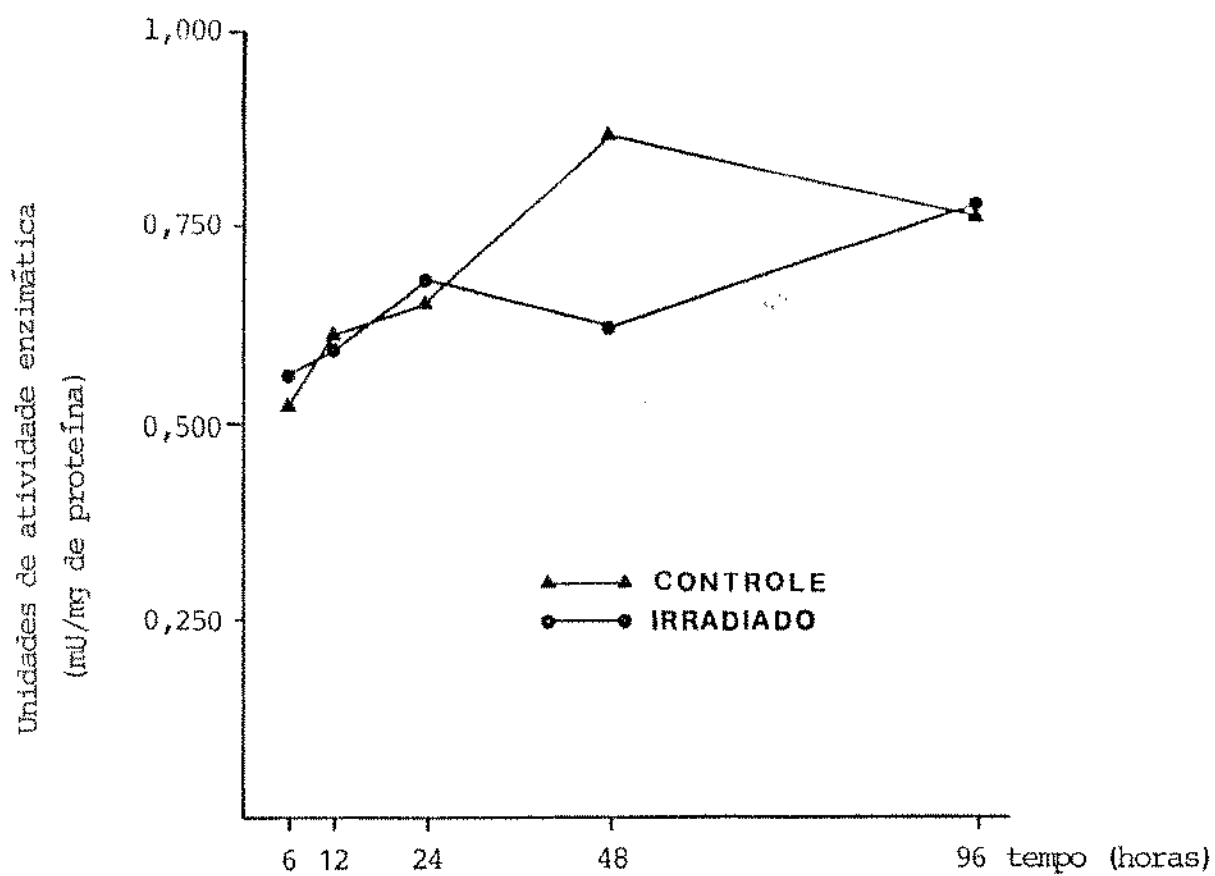


Figura 1. Variações das médias de atividade da G6PD, em diferentes tempos, nos cristalinos irradiados (●—●) e controle (▲—▲).

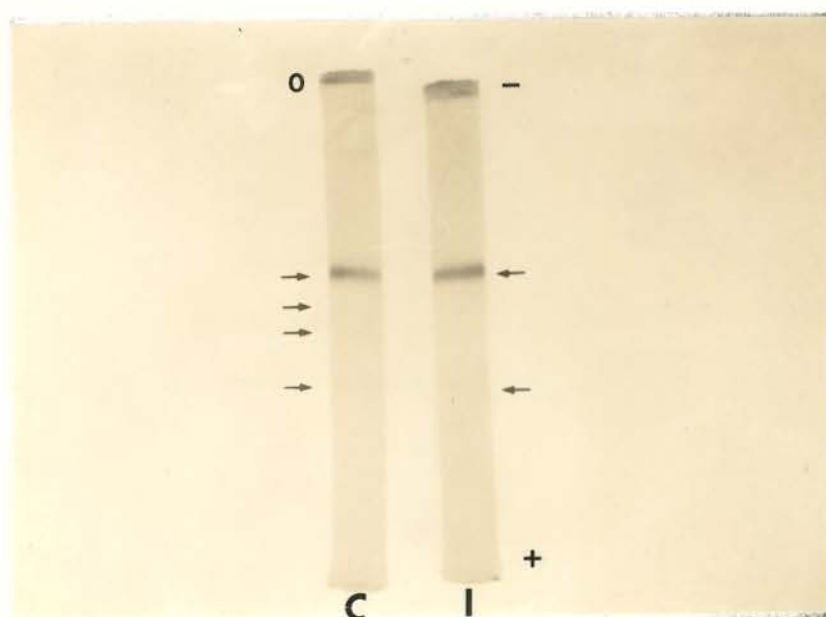


FIGURA 2 - ZIMOGRAMAS DA G6PD, 48 HORAS APÓS A IRRADIAÇÃO DOS CRISTALINOS DOS GRUPOS CONTROLE (C) E IRRADIADO (I)

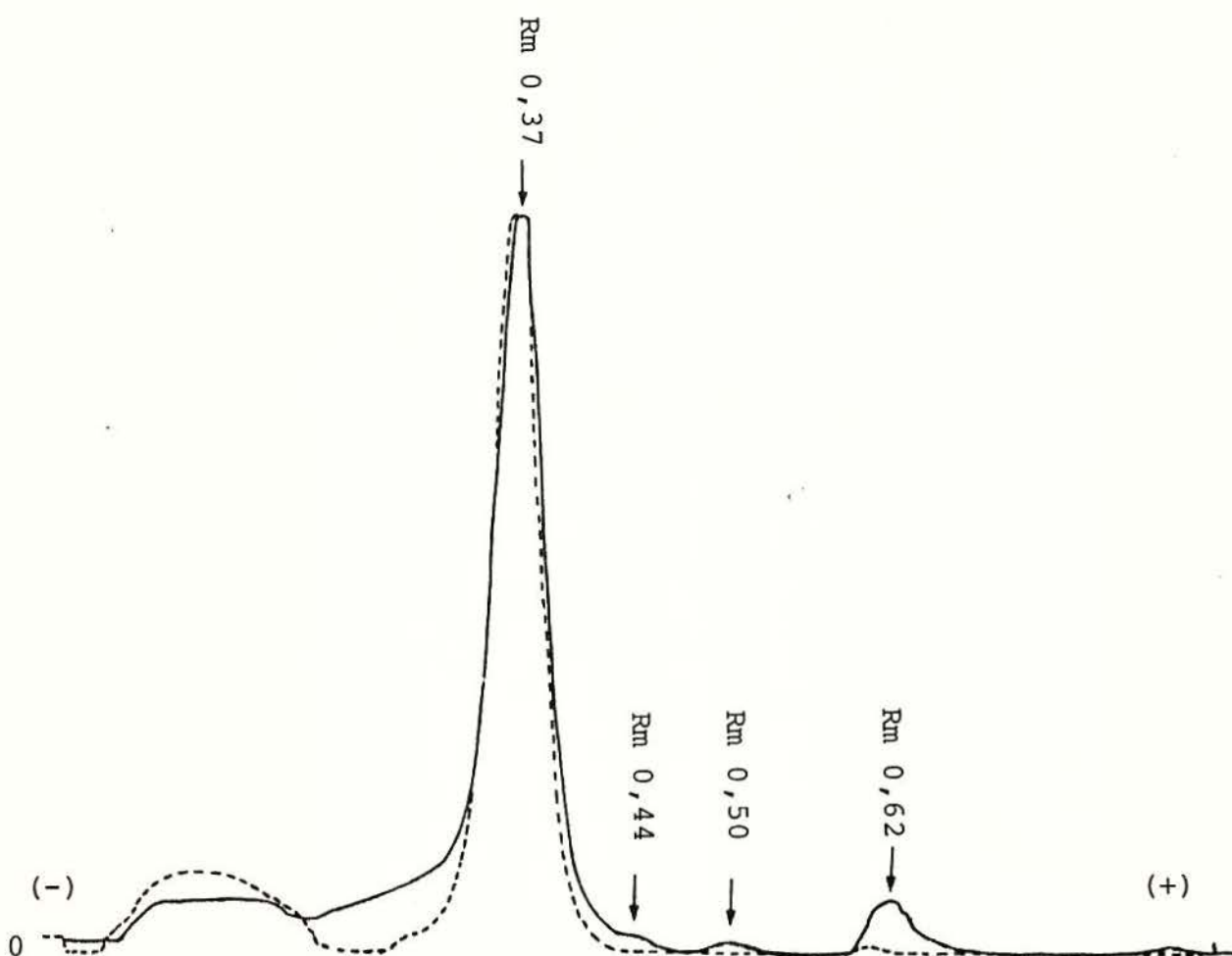


Figura 3. Traçados densitométricos dos zimogramas da G6PD, 48 horas após a irradiação dos cristalinó dos grupos controle (—) e irradiado (---).

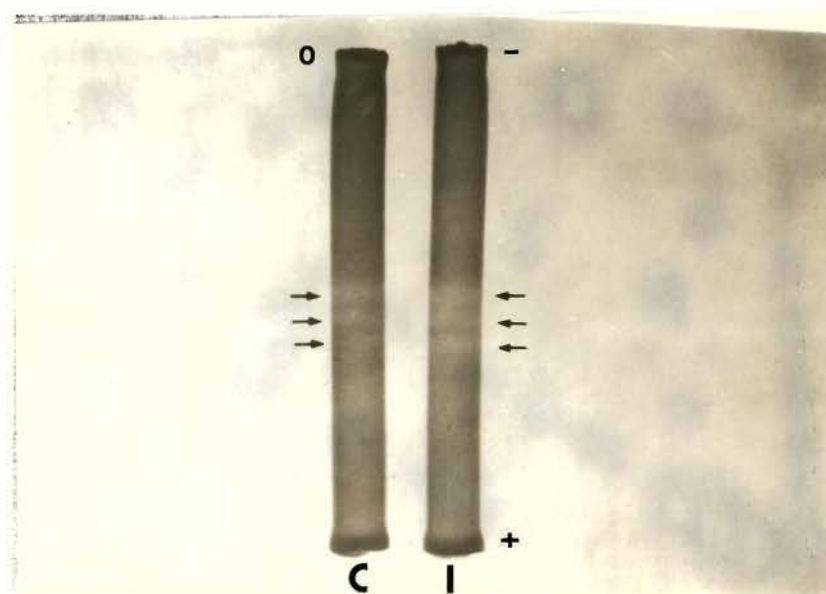


FIGURA 4 - ZIMOGRAMAS DA SOD, 48 HORAS APÓS A IRRADIAÇÃO DOS CRISTALINOS DOS GRUPOS CONTROLE (C) E IRRADIADO (I)

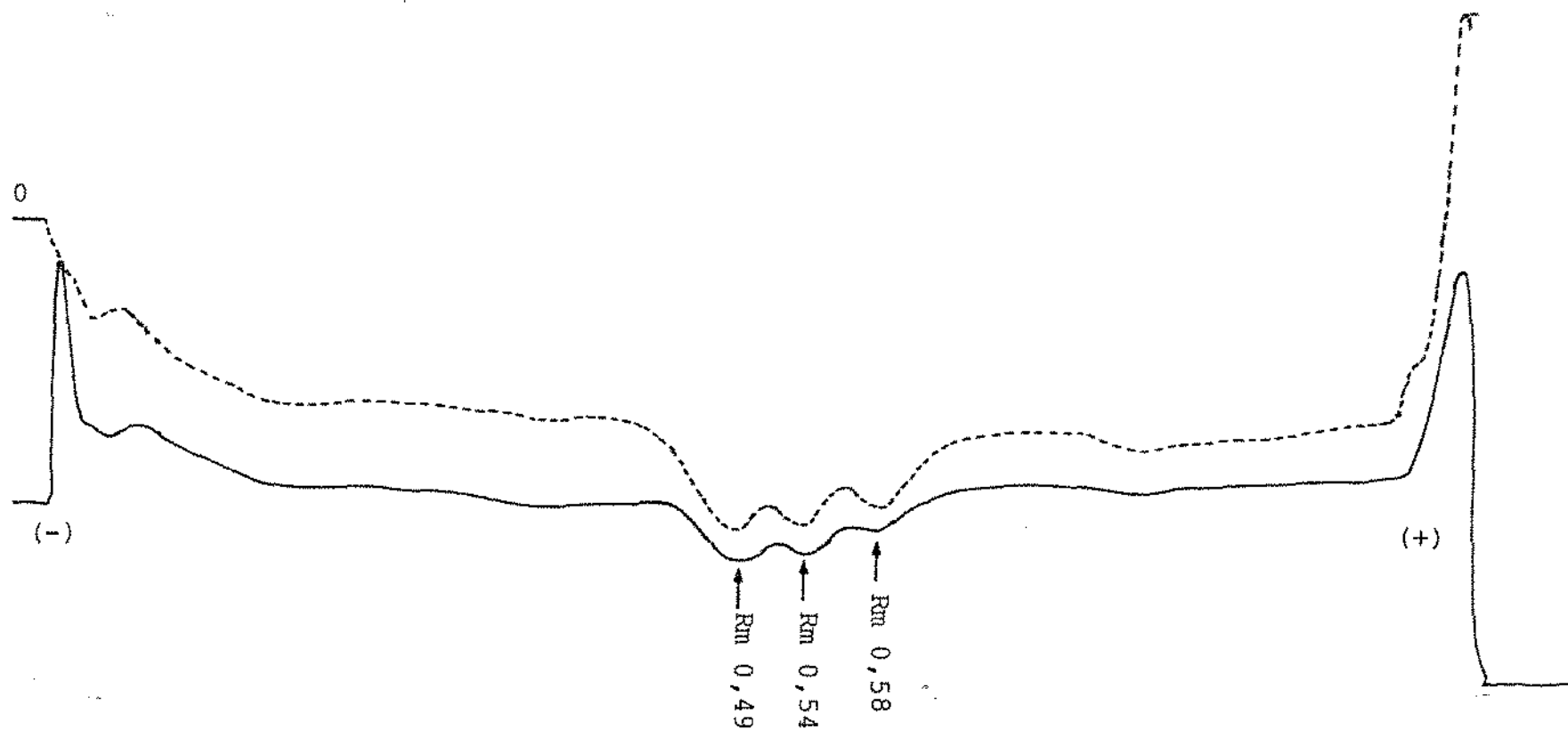


Figura 5. Traçados densitométricos dos zimogramas da SOD, 48 horas após a irradiação dos cristalinos dos grupos controle (—) e irradiados (---).

CAPÍTULO VI

DISCUSSÃO

DISCUSSÃO

A visão é o resultado de um complexo trabalho elaborado pelo olho, sendo o efeito de uma série de mecanismos bioquímicos, de âmbito tecidual, que resulta em uma ação específica sobre o nervo óptico.

Dentre os diversos tecidos que fazem parte do globo ocular, o cristalino tem uma função específica, que é a de direcionar a luz, incidente em sua superfície, fazendo-a convergir para a retina. Isto só é possível graças às propriedades de suas células, que permitem a passagem da luz pelo seu interior.

A transparência do cristalino é tão importante, primordial, na qualidade da visão, que a oxigenação das suas células e a remoção de resíduos metabólicos não são realizados pelo sangue, mas por um líquido igualmente transparente, o humor aquoso, desta forma mantendo a diafanidade necessária à função do tecido.

Segundo BANKS e colaboradores (2), o cristalino é constituído por uma porcentagem muito grande de proteínas, ao redor de 30% de seu peso, sendo que 90% dessas proteínas são solúveis. Elas estão distribuídas da seguinte maneira: 44% de α -cristalinas, 26% de β -cristalinas, 16% de γ -cristalinas e 14% de outras proteínas. Segundo FAGERHOLM e colaboradores (18), a concentração das proteínas aumenta de modo gradual e contínuo na direção do centro do cristalino, e não varia com a idade do indivíduo. Essas proteínas apresentam um número significativo de radicais-SH, e a manutenção dessa forma reduzida condicionaria a forma solúvel de proteínas e, conseqüentemente, sua transparência.

Para que isso ocorra, o organismo se serve das seguintes reações:



O GSH (glutation reduzido) está presente no cristalino em alta concentração e é o responsável pela manutenção dos grupos-SH das proteínas do cristalino do estado reduzido. Para tanto, a GR (glutation redutase) reduz o GSSG (glutation oxido) através da doação de elétrons do coenzima, nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzido, isto é, NADPH + H+. A redução do NADP é realizado na célula pela via das pentoses-fosfato, graças a ação da G6PD.

A manutenção das proteínas do cristalino, em seu estado solúvel, está condicionada a algumas enzimas, dentre elas a G6PD. Aliás, GIBLIN e colaboradores (23) consideram essa enzima a mais sensível à radiação X, dentre oito outras estudadas. Levando-se em consideração os dados acima mencionados, é possível avaliar a estabilidade dessa reação de oxi-redução, frente a um agressor, estudando-se a atividade da enzima G6PD.

A literatura mostra um número razoável de autores que assim o fizeram. Entretanto, dependendo do animal a ser estudado e do objetivo da experiência, as doses de radiação variam muito.

CASARRET (11), por exemplo, considera doses cataratogênicas, valores iguais a 15 rad de radiação X, para ratos, e de 20 a 45 rads para o homem. WORGUL e colaboradores (46) empregam 20 GY de ra-

dição X para desenvolver catarata em coelhos, doses aliás que podem ser consideradas altas, como também aquelas empregadas por SONKA (42), se tomarmos como referência aquelas determinadas no campo da Odontologia por FREITAS (20), BOSCOLO e colaboradores (8) e DI HIPOLITO e colaboradores (15), dentre outros.

No presente trabalho, optamos por doses de radiação mais baixas, limitando quanto possível a incidência da radiação à área em estudo, para assim podermos acompanhar as alterações enzimáticas na sua fase incipiente.

Lembramos ainda que a dose de 10,26 R, usada no presente experimento, corresponde à metade da dose mínima sob a qual começam a surgir os indícios da opacidade em cristalinos humanos, como relata CASARETT (11).

A nossa pesquisa objetivou observar o comportamento de duas enzimas, a G6PD e a SOD, após diferentes intervalos de tempos a partir do momento de irradiação dos cristalinos.

Na bibliografia ao nosso alcance, tivemos dificuldades em encontrar trabalhos nesta área de pesquisa, a fim de estabelecermos as necessárias comparações entre resultados. Tal deficiência certamente indica que esse campo de pesquisas requer uma melhor exploração por parte dos estudiosos, e, ao mesmo tempo, aconselha ao pesquisador a necessária cautela na obtenção de conclusões baseadas em cotejos realizados entre poucos trabalhos, em geral ainda feitos com metodologia não estandarizada.

Em nosso experimento notamos que, 6 horas após a irradiação, a atividade da G6PD nos cristalinos irradiados apresentou um resultado discretamente mais elevado do que no grupo controle, atin-

gindo a média de 0,566 unidades de atividade enzimática, contra 0,529 unidades no grupo controle. Tais dados correspondem a um aumento de atividade enzimática da ordem de 8,22%, que, analisado pelo teste de Student, não alcança o nível de 5% de significância.

É interessante notar que SONKA (43), estudando células de fígado de ratos irradiados, registrou um pequeno aumento na atividade enzimática "imediatamente após a irradiação", não especificando aquele autor, entretanto, o prazo de tempo em que isto ocorreu.

A mesma tendência fora observada por GUPTA & BAWA (25), pesquisando efeitos de radiação gama sobre células de testículos de ratos, que tinham sofrido irradiação de corpo inteiro. Nesse trabalho realizado aliás com doses muito alta de radiação, em nível de 720 e de 2000 R, registraram-se crescimentos de atividade enzimática até 7 dias após a irradiação, numa porcentagem de aumento próximo de 80% em relação aos controles.

Tal analogia de resultados, embora o nosso, como dissemos, não atingisse nível de significância de 5% no teste t, parece indicar que a tendência é a enzima G6PD sofrer alterações imediatas em sua atividade mesmo com fracas doses de radiação.

Em nosso trabalho, após essa primeira fase em que se verificou um ligeiro aumento de atividade enzimática em relação aos controles, o exame das diferenças entre a atividade da G6PD nas células irradiadas e nos de controle parece sugerir uma fase de oscilação de pequena amplitude, caindo a atividade na célula irradiada em relação ao controle, no tempo de 12 horas (diferença negativa de apenas 2,78%), e subindo depois, ultrapassando o controle em 3,50% no tempo de 24 horas. A partir desse ponto, os valores de atividade enzimática

das células irradiadas caíam sensivelmente, atingindo a diferença negativa de 28,45% no tempo de 48 horas; em seguida, as diferenças vão diminuindo, encontrando-se no tempo de 96 horas, uma discrepância de apenas 1,17% entre atividade de células irradiadas e de controle (Figura 1).

A experiência de GUPTA & BAWA (25), fez-se com dois níveis de radiação, uma com doses "letais" (2000 R), outra com doses consideradas "sub-letais" (720 R). No primeiro caso, os autores relatam um aumento inicial da atividade da enzima, seguida de uma queda, até quase atingir o nível de controle. Já nas doses sub-letais, os autores registram uma subida contínua.

No primeiro caso, ainda se pode achar alguma analogia entre o resultado verificado e aqueles expostos tanto por SONKA (42) como em nosso trabalho: uma primeira fase de aumento, seguida de uma fase de decréscimo, concluindo por nova fase de aumento. No segundo caso porém, o de dose sub-letal, a continuidade do aumento da atividade enzimática demonstra uma considerável divergência de resultados em relação aos demais.

Como dissemos antes, em nosso experimento as curvas correspondentes ao material irradiado e ao controle apresentaram um período de pequenas oscilações relativas, nos tempos de 12 e 24 horas, após o citado aumento de atividade verificado em 6 horas. É possível que essa pequena fase de oscilações corresponda a um período de preparação de reações que irão se desencadear proximamente, após o impacto da radioatividade, verificado nas 6 horas iniciais. Aliás, CASARRET (11) refere-se à possibilidade de ocorrerem desarranjos nas estruturas celulares sob ação de pequenas doses de radiação, ao passo que poderia

ocorrer até rompimento das estruturas celulares, quando atuassem doses mais elevadas de radiação X.

Um dado que nos parece importante em nosso trabalho, é a grande diferença encontrada entre a atividade enzimática da célula irradiada e a do controle no tempo de 48 horas. O índice da G6PD nas células irradiadas caiu 28,45% em média, em relação ao controle, resultado estatisticamente significativo ao nível de 5% de probabilidade. Também BÓSCOLO (7), trabalhando com cristalinos de cães, encontrou nesse tempo uma similar diminuição da atividade relativa para a mesma enzima, numa variação de 40,48% em relação ao controle. Embora assinalando que esta variação, no seu caso, não fosse significativa do ponto de vista da análise estatística, sugere a possibilidade de tal diminuição enzimática chegar a causar catarata.

Tanto GIBLIN e colaboradores (23) como GUPTA & BAWA (25) não focalizaram especificamente o que ocorre nas primeiras horas após a irradiação, preocupando-se mais com a marcha do fenômeno em prazos maiores. GIBLIN e colaboradores (23), trabalhando com cristalinos de coelhos, mostrou pelo seu gráfico uma contínua diminuição de atividade da G6PD, prolongando suas observações até 7 semanas, nada mostrando de especial nos primeiros dias do experimento. Já GUPTA & BAWA (25), operando com material e método diferentes, mostram que a atividade da G6PD em células do animal irradiado com doses sub-letais apresenta uma certa oscilação para menos, em relação ao controle, até cerca de 30 dias após a irradiação, daí por diante suplantando os de controle e conservando os valores superiores a esse, até o final do experimento num prazo superior a 70 dias. Para os animais irradiados com dose letal, após cerca de 60 dias os resultados tornam-se inferiores aos dos

controles.

Contudo, como já salientamos acima, não encontramos nesses trabalhos dados numéricos ou detalhes de gráficos que de alguma maneira permitam uma melhor comparação com os resultados encontrados em nossa pesquisa, do ponto de vista da tendência da atividade enzimática em prazos mais curtos.

Variações isoenzimáticas da G6PD e SOD - No presente trabalho, na tabela 1, que traduz os resultados da atividade da G6PD, em células irradiadas e não irradiadas, mostra que o valor mínimo desta atividade relativa ocorreu a 48 horas após a irradiação. Nessa fase, julgou-se de interesse estudar mais detidamente essa queda, por intermédio de pesquisa das isoenzimas, isto é, as formas múltiplas correspondentes à G6PD.

Os resultados desse estudo, constantes dos zimogramas e traçados densitométricos (figuras 2 e 3), mostram que foram quatro as formas isoenzimáticas encontradas no material não irradiado, e que estão indicadas pelo índice de mobilidade relativa: Rm 0,37, Rm 0,44, Rm 0,50 e Rm 0,62.

Esses dados não são concordantes com os encontrados por DOVRAT & GERSHON (16), já que esses autores encontraram apenas três isoenzimas no cristalino de ratos de 2 dias e de 6 meses de idade, relatando ainda que em animais de 26 meses a forma mais lenta das isoenzimas não estava presente, sendo encontrada nesse caso apenas 2 enzimas. Contudo, comparações maiores entre os resultados do nosso trabalho e desses autores ficam prejudicadas pelo fato de que DOVRAT & GERSHON (16) não especificam o Rm relativos às isoenzimas.

Convém salientar que, até agora, as comparações que pro-

curamos fazer entre os nossos resultados e os de DOVRAT & GERSHON (16), referem-se tão somente ao material não irradiado. Quanto às comparações entre as atividades das isoenzimas das células irradiadas e das não irradiadas terão que ser limitadas aos dados do nosso próprio trabalho, já que aqueles autores se cingiram a fazer comparações entre diferentes idades, deixando de lado o problema da irradiação.

Como dissemos, o material não irradiado em nosso estudo, apresentou, pelo zimograma, quatro isoenzimas especificados por seus R_m : 0,37, 0,44, 0,50 e 0,62. Já no material irradiado verificamos que a primeira dessas isoenzimas (R_m 0,37) está presente, com um grau de atividade equivalente à do material não irradiado, enquanto a segunda e a terceira isoenzimas, de R_m 0,44 e 0,50, não mostram sinal de atividade no material irradiado, contrastando com o que aconteceu no material controle. Por último, a isoenzima de R_m 0,62 apresenta um pequeno sinal de atividade no material irradiado, ao passo que no material não irradiado é nítida a presença de atividade (figuras 2 e 3).

Dessa forma, no material irradiado encontrou-se a esperada coincidência de resultados na diminuição da atividade de G6PD e de suas isoenzimas em conjunto, embora a primeira isoenzima esteja presente no mesmo grau de intensidade. É possível que tal queda de atividade enzimática tenha correlação com o início do processo cataratogênico.

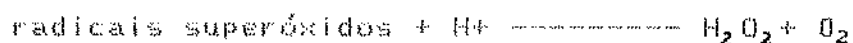
Contudo, achamos que o trabalho ainda é insuficiente para caracterizar uma afirmativa mais ampla a esse respeito, merecendo o assunto estudos mais amplos que caracterizem a possível correlação entre o fenômeno estudado e o fenômeno patológico visual.

Quanto a relação entre a atividade da SOD e a catarata

canina BRAINARD e colaboradores (9), em 1982, apresentam um interessante resumo sobre tentativas de tratamento dessa disfunção por meio daquela enzima. De acordo com esses autores, o epitélio do cristalino é aerobicamente ativo, utilizando o O_2 (oxigênio molecular), como fonte energética produzindo radicais superóxidos, que possuem cargas negativas e são, assim, altamente reativos. Esses radicais, quando em elevadas concentrações, exercem uma função tóxica, podendo então provocar alterações no cristalino que conduzem à formação da catarata.

Tal atividade danosa dos radicais superóxidos seria, entretanto, contida pela ação da SOD, que cataliza a combinação dos radicais superóxidos com íons de hidrogênio (H^+), resultando o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e oxigênio (O_2).

SOD



Dessa forma, segundo os mesmos autores, o SOD exerceria uma ação protetora contra a concentração excessiva daqueles radicais superóxidos, cuja atividade tóxica, como foi dito, poderia desencadear um processo cataratogênico.

Pelo que conseguimos observar, através da literatura consultada, as atuais pesquisas referentes a SOD parecem estar mais voltadas para as tentativas terapêuticas por meio de sua administração em diferentes tipos de estados patológicos, tema aliás sujeito a controvérsia.

ABE e colaboradores (1), em 1981, relatam evidência de ação protetora de SOD, dentro de certos limites, em casos de reações de pele em ratos irradiados. Entretanto, BRAINARD e colaboradores (9),

no mesmo ano, não obtiveram os resultados esperados no tratamento com a mesma enzima em cristalinos opacificados por catarata senil, em cães. Também WILLSSON (45), em 1984, discutindo a eficácia desse tipo de tratamento, mostra-se cético em relação aos resultados.

Uma questão fundamental é saber em que grau ocorrem modificações da atividade da enzima SOD e de suas formas múltiplas (isoenzimas), em situações anormais.

FECONDO & AUGUSTEYN (19), em 1983, procuraram determinar possíveis alterações de isoenzimas SOD em cristalinos e fígado de ratos, em função do aumento da idade dos animais, chegando à conclusão de que as mesmas formas isoenzimáticas existem tanto no cristalino como no fígado de ratos de 2 dias e de 6 meses de idade.

Contudo, não deixam explícito no texto quantos foram essas formas isoenzimáticas, muito menos ainda especificando-as por algum meio, por exemplo, por intermédio dos seus índices de mobilidade relativa (R_m).

Nem aquele trabalho, assim como nenhum outro dos que pudemos alcançar, focalizam a questão da possível modificação das isoenzimas SOD em correlação aos efeitos da radiação.

Em nossa pesquisa, as curvas traçadas pelo densitômetro referente ao grupo controle mostraram a existência de tais formas múltiplas de SOD, indicadas respectivamente por R_m : 0,49, 0,54 e 0,85. Esses mesmos índices de mobilidade relativa foram encontrados para o material previamente irradiado, ficando caracterizado um evidente paralelismo entre a curva obtida para esse material e a curva referente ao controle, como se nota nas figuras 4 e 5.

Esses resultados indicam, portanto, que não houve modi-

ficação em relação à presença dessas três isoenzimas do cristalino do animal, 48 horas após a incidência de radiação X na dosagem usada na experiência.

Evidentemente, tal conclusão é válida apenas para o período estrito a que se refere, não querendo dizer que não possa haver modificações com prazos mais dilatados ou mesmo em tempos anteriores às 48 horas.

CAPÍTULO VII

CONCLUSÕES

CONCLUSÕES

No presente experimento, no qual cristalinos de ratos foram sensibilizados com 10,26 R de radiação X,

- 1 - houve evidência de que a radiação X causou uma diminuição da atividade da glucose-6-fosfato desidrogenase (G6PD), da ordem de 28,45%, 48 horas após a irradiação, ao passo que nos tempos de 6, 12, 24 e 96 horas as diferenças em relação ao controle não foram significativas;
- 2 - também 48 horas após a irradiação, ocorreu desaparecimento da atividade de duas das quatro isoenzimas da G6PD, detectadas no material controle;
- 3 - ainda no tempo de 48 horas após a irradiação, não foi detectada qualquer variação da atividade das três isoenzimas da superóxido dismutase (SOD), encontradas no controle.

CAPÍTULO VIII

RESUMO

RESUMO

Pesquisou-se o efeito da radiação X sobre a atividade da Glucose-6-fosfato-desidrogenase (G6PD) e da Superóxido-dismutase (SOD) em cristalinos de ratos Wistar, usando-se o método analítico da redução NADP⁺ na determinação da atividade da G6PD, e a eletroforese em geis de poliacrilamida para a separação isoenzimática da G6PD e da SOD.

Os animais receberam uma dose de 10,26 R em cada olho, e foram sacrificados nos tempos de 6, 12, 24, 48 e 96 horas após a irradiação, juntamente com os ratos controle.

No tempo de 48 horas, os animais apresentaram uma diminuição na atividade da G6PD da ordem de 28,45% em relação aos controles, estatisticamente significativa ao nível de 5% de probabilidade. Nos outros tempos, não foram observadas variações significativas em relação ao controle.

Também no tempo de 48 horas, foram detectadas quatro isoenzimas da G6PD nos cristalinos controle e apenas duas nos cristalinos irradiados.

Quanto à SOD, foram encontradas três isoenzimas tanto no material irradiado como no controle, no tempo de 48 horas, não se detectando diferenças de atividade entre os dois grupos.

CAPÍTULO IX

SUMMARY

SUMMARY

The effects of x-rays upon the enzymes G6PD and SOD was investigated in the crystalline lens of Wistar rats, employing the analytical method of NADP+ reduction to determine the activity of G6PD, and electrophoresis in polyacrylamide gel for the analysis of G6PD and SOD isoenzymes.

Control and experimental animals which received 10.26R in each eye, were killed 6, 12, 24, 48 and 96 hrs after the irradiation.

Irradiated rats, later 48 hrs, presented a 28,45% decreased of G6PD activity, statistically significant at 5% level. During the other periods no significant variations occurred in comparison with controls.

During the period of 48 hrs four isoenzymes of G6PD were detected in the control crystalline lens and only two from the irradiated rats.

Three isoenzymes of SOD were found either in the control and irradiated crystalline lens in the 48 hrs period, with similar activities in both groups.

CAPÍTULO X

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 - ABE, M.; NISHIDAI, T.; YUKAWA, Y.; TAKAHASHI, M.; ONO, R.; HIRAO-KA, M.; RI, N. Studies on the radioprotective effects of superoxide dismutase in mice. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, 2(2):205-9, Feb. 1981.
- 2 - BANKS, P.; BARTLEY, W.; BIRT, L.M. *The biochemistry of the tissues*. 2 ed. New York, John Wiley & Sons, 1979.
- 3 - BEAUCHAMP, C. & FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Anal. Biochem.*, 44:276-87, 1971.
- 4 - BERGMAYER, H.V.; GAWEHN, K.; GRASSAL, M. In *Methods of Enzymatic analysis*. 2 ed. New York, Verlag-Chemie, 1974. v.1, p.425-522.
- 5 - BERGSTROM, M.; JORULF, H.; LOFROTH, P.O. The eye lens. Some aspects of the radiation dose and protection of the patients and the personel in pediatric radiology. *Ann. Radiol.*, 20(1): 55-61, 1977.
- 6 - BJARNGARD, B.; HOLLENDER, L.; LINDAHL, B.; SONESSON, A. Radiation doses in oral radiography. I. Measurements of doses to gonadas and certain parts of head and neck during full mouth roentgenography. *Odont. Revy.*, 11:355-66, 1960.

- 7 - BOSCOLO, F.N. Contribuição ao estudo da variação de enzimas do globo ocular de cães - Efeito de baixas doses de radiação e dosimetria termoluminescente. Piracicaba, 1984. [Tese Livre-Docente - Fac. Odont. - Unicamp]

- 8 - _____; GONÇALVES, N.; DI HIPOLITO JR. O.; MONTEBELO FILHO, A. Contribuição ao estudo da quantidade de radiação que atinge os órgãos críticos do paciente, durante um exame radiográfico. *Revista Paulista Odont.*, 4(4):20-31, jul./ago. 1982.

- 9 - BRAINARD, J.; HANNA, C.; PETURSSON, G. Evaluation of superoxide dismutase (Orgotein) in medical treatment of canine cataract. *Archs Ophthalmol.*, 100(11):1832-4, Nov. 1982.

- 10 - BUDOWSKY, J.; PIRO, J.D.; ZEGARELLI, E.V.; KUTSCHER, A.H.; BARNETT, A. Radiation exposure to the head and abdomen during oral roentgenography. *J. Am. dent. Ass.*, 52:555-9, May 1956.

- 11 - CASARETT, A.P. *Radiation biology*. New Jersey, Prentice - Hall, 1968.

- 12 - CHAN, R.C. & SHUOVSKY, L.J. Effects of irradiation on the eye. *Radiology*, 120(3):673-5, Sept. 1976.

- 13 - DAVIS, B.J. Disc electrophoresis. II. Method and application to human serum proteins. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 121:407-27, 1964.

- 14 - DILLEY, K.J. The proportion of protein from the normal and cataractous human lens which exists as high molecular weight aggregates in vitro. *Exptl Eye Res.*, 20(1):73-8, Jan. 1975.
- 15 - DI HIPOLITO JR, D.; GONÇALVES, N.; BÓSCOLO, F.N.; MONTEBELLO FILHO, A. Determinação, pelo método da dosimetria termoluminescente, das doses de radiação incidente em órgãos críticos, durante a tomada de radiografias cefalométricas. *Revista Ass. paul. Cirurgia dent.*, 32(2):68-76, mar. 1985.
- 16 - DOVRAT, A. & GERSHON, D. Rat lens superoxide dismutase and glucose-6-phosphate dehydrogenase: studies on the catalytic activity and the fate of enzyme antigen as a function of age. *Exptl Eye Res.*, 23(6):651-61, 1981.
- 17 - EDBROOKE, C.M. & EDWARDS, C. Industrial radiation cataract. The hazards and the protective measures. *Ann. Occup. Hyg.*, 10:239-304, 1967.
- 18 - FAGERHOLM, P.P.; PHILIPSON, B.T.; LINDSTROM, B. Normal human lens the distribution of protein. *Exptl Eye Res.*, 23(6):615-20, Dec 1981.
- 19 - FECONDO, J.V. & AUGUSTEYN, R.C. Superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in the human cataractous lens. *Exptl Eye Res.*, 36(1):15-23, 1983.

- 20 - FREITAS, L. Determinação por termoluminescência de doses de radiação incidentes em órgãos críticos em pacientes edêntulos e crianças com dentição mista. Piracicaba, 1976 [Tese (Doutoramento) Fac. Odont. - Unicamp]
- 21 - FUKAMI, Y. Studies on the cause of radiation cataract. *Nippon Ganka gakkai zasshi*, 84(7):594-601, July 1980.
- 22 - GIBLIN, F.J.; CHAKRAPANI, B.; REDDY, V.N. High molecular weight protein aggregates in x-ray induced cataract. *Exptl Eye Res.*, 26(5):507-19, May 1978.
- 23 - _____, _____, _____. The effects of x-irradiation on lens reducing systems. *Invest. Ophthalmol. & Vis. Sci.*, 18(5): 468-75, May 1979.
- 24 - GRÜTZNER, P. Röntgenkatarakt. *Klin. Mbl. Augenheilk.*, 142: 243-5 1966.
- 25 - GUPTA, G.S. & BAWA, S.R. Radiation effects on testes. XIV Studies on glucose-6-phosphate dehydrogenase following partial-body gamma irradiation. *Radiat. Res.*, 73(3):490-501, Mar 1978.
- 26 - HEISTER. *De oculo cum suffusione sive cataracta*. Amsterdam, 1739. 598p. Apud EDBROOKE, C.M. & EDWARDS, C., op. cit. ref. 16.

- 27 - ISHERWOOD, I.; YOUNG, I.M.; BOWKER, K.W.; BRAMALL, G.K. Radiation dose to the eyes of the patient during neuroradiological investigations. *Neuroradiology*, 10(3):137-41, 1975.
- 28 - ISMAIL, S.; SOLIMAN, A.M.; HOSNY, F.; MAHFOUZ, M.; HASHISH, S. Effect of ionizing radiations on the lens. *Bull. Soc. Ophthal. Egypte*, 64:379-82, 1971.
- 29 - KOPF, A.W.; GRISEWOOD, E.N.; BART, R.S.; PETRATOS, M.; WINGATE, C. X irradiation of ocular tissues measured by thermoluminescence dosimetry. *J. invest. Derm.*, 42(5):512-8, Oct. 1967.
- 30 - LESSI, R.A.; GONÇALVES, S.L.; BECHARA, E.J.H. Superóxido dismutase como antiinflamatório em Endodontia. *Revista Ass. Paul. Cirurgia dent.*, 40(2):156-62, mar./abr., 1986.
- 31 - LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FAR, A.L.; RANDALL, R.J. Protein measurement with the folin-phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 123: 265-75, 1951.
- 32 - MCCORD, J.M. & FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase, an enzymatic function for eruthocuprein. *J. Biol. Chem.*, 244:6049-55, 1969. Apud LESSI, R.A.; GONÇALVES, S.L.; BECHARA, E.J.H., op. cit. ref. 29.

- 33 - MERRIAN JR., G.R. & FOCHT, E.F. A clinical study of radiation cataracts and the relationship to dose. *Am. J. Roentg.*, 77(5):759-85, May 1957.
- 34 - MOOS, W. Radiation exposure of the anterior segment of the eye for various tomographic of the skull. Mannheim, Germany, Heidelberg Univ., 1977.
- 35 - ORZALESE N., SORCINELLI, R., GUIZO, G. Increased incidence of cataracts in male subjects deficient in glucose-6-phosphate dehydrogenase. *Archs Ophthalmol.*, 99(1):69-70, Jan 1981.
- 36 - PANICH, V. & NA-NAKORN, S. G6PD deficiency in senile cataracts. *Hum. Genet.*, 55(1):123-4, 1980.
- 37 - PARKER, R.G.; BURNETT, L.L.; WOOTTON, P.; MCINTYRE, C.J. Radiation cataract in clinical therapeutic radiology. *Radiology*, 82(4):798-8, Apr. 1964.

- 38 · PLENK. *Lehre v. d. Augenkr.*, 224; Wien, 1778. Apud EDBROOKE, C.M. & EDWARDS, C., op. cit. ref. 16.
- 39 · RICHARDS, A.G. & ARBOR, A. Roentgen-ray radiation and the dental patient. *J. Am. dent. Ass.*, 54(4):476-87, Apr. 1957.
- 40 · ———, ———, Roentgen-ray doses in dental roentgenography. *J. Am. dent. Ass.*, 54(3):351-69, Mar, 1958.
- 41 · SASSAKI, K.T. & NICOLAU, J. The effect of isoproterenol on some aspects of the anaerobic metabolism of carbohydrates in mouse submandibular gland. *Gen. Pharmacol.*, 13:353-6, 1982.
- 42 · SONKA, J. Pentose phosphate pathway and radiation disease. *Acta Univ. Carol.*, (89):1-129, 1979 [Med. Monograph]
- 43 · STONE, R.S. The concept of maximum permissible exposure. *Radio-logy*, 58(5):639-60, May 1952.
- 44 · WAGNER, B.J. & FU, S.C.J. Characterization of lens proteins. II. Crystallin of normal and cataractous rat lenses. *Exp. Eye Res.*, 26(3):255-65, Mar. 1978.
- 45 · WILLSON, R.L. Peroxy free radicals and enzyme inactivation in radiation injury and oxygen toxicity: protection by superoxide dismutase and antioxidants? *Lancet*, 1(8380):804, Apr. 1984.

46 - WORGUL, B.V.; MEDVEDOVSKY, C.; MERRIAM JR., G.R. Cataractogenesis in the x-irradiated rabbit eye. Curr. Eye Res., 1(5): 275-80, 1981.

47 - ; LOW, S.; MERRIAM JR., G.R. The lens epithelium and radiation cataract. Radial. Res., 21(1):181-5, July 1982.