

GUILHERME MONTEIRO TOSONI

- Cirurgião Dentista -

ESTUDO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA EM  
TECIDOS DE GRANULAÇÃO DE RATOS  
SUBMETIDOS A BAIXAS DOSES DE  
RADIACÃO.

Orientador: Prof. Dr. Fab Norberto Bóscolo

Tese apresentada à Faculdade de  
Odontologia de Piracicaba da Universidade  
Estadual de Campinas, para a obtenção do  
Título de MESTRE em Odontologia na área  
de Radiologia Odontológica.

PIRACICABA-SP

- 1992 -

T639e

18577/BC

UNICAMP  
BIBLIOTECA CENTRAL

*Est. Campinas; devidamente  
corrigido conforme resoluções  
el 16/036/93  
Piracicaba 8/1/93  
Piracicaba*

Dedico este trabalho ao meu pai,  
José Tosoni, a minha mãe, Vera Maria  
Arruda M. M. Tosoni, pelo carinho e  
incentivo que sempre me dispensaram.

## AGRADECIMENTO ESPECIAL

Ao Prof.Dr. Frab Norberto Bóscolo, do Departamento de Diagnóstico Oral da Faculdade de Odontologia de Piracicaba-UNICAMP, Coordenador do Curso de Pós-Graduação em Radiologia, a nível de Mestrado, pela amizade, incentivo e orientação segura durante a elaboração deste trabalho, o meu reconhecimento e gratidão.

Ao Prof.Dr. Jaime Cury, Professor da área de Bioquímica, do Departamento de Ciências Fisiológicas, pelo auxílio e orientação em toda a parte de bioquímica empregada neste trabalho, o meu reconhecimento e amizade.

Aos Colegas,

Prof. Dr. Benedito Antônio Ferreira,  
Profa. Dra. Rita de Cássia Loiola Cordeiro e  
Profa. Dra. Gulnara Scaf, docentes da Disciplina de  
Radiologia da Faculdade de Odontologia de Araraquara-UNESP, pela  
compreensão e apoio durante o desenvolvimento deste trabalho, os  
meus sinceros agradecimentos.

## AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a todos os que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho e, em especial:

Aos Profs. Drs. Renato Roberto Biral e Osvaldo Di Hipólito Jr., Diretor e Diretor Associado da Faculdade de Odontologia de Piracicaba-UNICAMP, pelo apoio material que tornou possível o desenvolvimento deste trabalho.

À Faculdade de Odontologia de Araraquara-UNESP, na pessoa do Senhor Diretor Prof. Dr. Luis Roberto de Toledo Ramalho.

À Profa. Dra. Sônia Vieira, pela orientação no desenvolvimento do relatório estatístico.

Ao Prof. Dr. Luiz Valdrighi e a todos os Professores e Funcionários da Faculdade de Odontologia de Piracicaba-UNICAMP, pela maneira hospitaleira e amigável com que fui acolhido durante a realização deste trabalho, o meu reconhecimento e amizade.

Ao técnico Waldomiro Vieira Filho, pelo treinamento e auxílio nas atividades realizadas no laboratório de bioquímica da Faculdade de Odontologia de Piracicaba-UNICAMP.

A Thelma Aparecida Gomes e Antonio Medeiros Filho, pelo auxílio na digitação deste trabalho.

A Maria Lucia Carneseca Montoro, pela correção gramatical.

## ÍNDICE

1 - INTRODUÇÃO .....	01
2 - REVISÃO DA LITERATURA .....	03
3 - PROPOSIÇÃO .....	37
4 - MATERIAIS E MÉTODOS .....	38
5 - RESULTADOS .....	46
6 - DISCUSSÃO .....	56
7 - CONCLUSÕES .....	64
8 - RESUMO .....	66
9 - SUMMARY .....	67
10 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	68

**1 - INTRODUÇÃO**

## 1 - INTRODUÇÃO

Desde a descoberta dos raios X, pelo engenheiro alemão WILHELM CONRAD ROENTGEN em 1895, até os dias de hoje, a radiação ionizante tem sido largamente estudada e utilizada.

Esta descoberta trouxe considerável progresso à ciência em geral, particularmente à saúde quando houve um avanço significativo, tanto no auxílio ao diagnóstico como na terapêutica de inúmeras doenças.

Contudo, logo também foi possível constatar os efeitos deletérios que esta forma de energia ocasionava sobre os organismos vivos, e que podiam se apresentar sob as mais diversas formas conforme a dose e o tipo de tecido irradiado.

Desde então, surgiram pesquisas com o intuito de fornecer subsídios que viessem contribuir para um melhor entendimento dos efeitos deletérios da radiação em um determinado tecido e esclarecer sobre a necessidade de se tomar corretas medidas de proteção.

Estas pesquisas, em sua grande maioria, utilizaram-se de altas doses de radiação, doses geralmente empregadas em radioterapia.

Contudo, há escassez na literatura a respeito de pesquisas sobre os efeitos biológicos causados por baixas doses de raios X (BAILEY)<sup>(13)</sup>, doses que são geralmente empregadas no radiodiagnóstico e, em particular, na Odontologia.

Desta forma, pouco se conhece a respeito do comportamento das proteínas quando são atingidas por baixa dose de radiação X e, em particular, sobre o dano que essa radiação pode causar nas enzimas, as quais têm um importante papel no desenvolvimento do processo de reparo (tecido de granulação).

Na literatura, encontramos poucos trabalhos sobre o efeito de baixas doses de raios X no processo de reparo de tecidos (RAVELLI e cols.<sup>(34)</sup>, ABDALLA e cols.<sup>(41)</sup>), que mostram alterações morfológicas do tecido irradiado, onde conclui-se haver um atraso ou retardo na reparação do tecido.

Muitos trabalhos sobre a gênese e desenvolvimento dos processos de reparo têm sido feitos sobre tecidos de granulação artificialmente induzidos em animais de laboratório. Destes estudos, ficou claro que as sínteses do colágeno e das glicosaminoglicanas são extremamente dependentes de atividades enzimáticas.

Em 1975, VIZIOLI<sup>(47)</sup> estudou a relação entre fosfomonoesterases e a síntese de colágeno e mucopolissacarídeos ácidos no tecido de granulação e descobriu a importância que as enzimas fosfatase alcalina, adenosina-trifosfatase (ATPase) e 5' nucleotidase têm no processo de desenvolvimento desse tecido. Tal fato nos despertou para um estudo do efeito da radiação sobre a atividade de enzimas e sua relação com a formação do tecido de granulação.

## 2 - REVISÃO DA LITERATURA

## 2 - REVISÃO DA LITERATURA

Fazendo uma revisão na literatura sobre o efeito da radiação no tecido conjuntivo de reparo e seus componentes, pudemos constatar a existência de inúmeros trabalhos a respeito. Trabalhos estes que variam conforme a fonte de radiação e dose empregada, o animal utilizado, o modo para obtenção do tecido e o componente do tecido estudado. Deste modo, pudemos destacar os seguintes trabalhos, que serão apresentados em ordem cronológica:

MAXIMOW<sup>(24)</sup>, em 1922, estudou os efeitos dos raios X sobre o tecido conjuntivo inflamado e constatou principalmente uma diminuição na capacidade de divisão mitótica dos fibroblastos como também na formação do colágeno.

Em 1931, POHLE e cols.<sup>(29)</sup> fizeram um estudo onde procuraram detectar o efeito da radiação X sobre o tecido cicatricial em incisões de pele de ratos. Neste estudo, utilizaram doses de 1000 R com filtração de 2,0 mm de Al e, também, doses de 1000 R com 0,25 mm de Cu mais 1,0 mm de Al; e, em ambos os casos, uma kilovoltagem de 140 kVp. Um grupo de animais foi irradiado antes da incisão do tecido em tempos de 24, 48 e 72 horas, e outro grupo foi irradiado após a incisão do tecido, nos tempos de 24 e 48 horas.

Metade da parte incisionada foi protegida da radiação, de forma a poder-se comparar, no mesmo animal, as partes irradiada e não irradiada. Os resultados demonstraram que houve um retardo na cicatrização no grupo irradiado após a incisão, com maiores evidências nas 24 horas. Observaram ainda que, ao final, o tecido cicatricial era normal e liso.

RITCHIE<sup>(36)</sup>, em 1933, também estudou o efeito da radiação X na cura de feridas na pele de ratos, observando as seguintes características histológicas: retardamento do crescimento fibroblástico, mudança no desenvolvimento fibroblástico com a produção de células anormais e formação de uma rede de fibrina pobre em células, a qual persistiu em muitos casos além do tempo normal para um exsudato. Uma única dose de 1000 R de raios X foi aplicada imediatamente, 24 e 48 horas após a incisão na pele. O efeito da radiação, foi em geral, o mesmo nos 3 grupos. O autor achou impróprio extrapolar os resultados do trabalho experimental em animal em detalhe para a prática clínica. Segundo ele, uma investigação somente pode ser vista em sua luz verdadeira quando checada minuciosamente por observação clínica. Contudo, concluiu haver prova suficiente para garantir a afirmação de que a radiação X, em doses geralmente usadas para o tratamento de tumores malignos, administrada dentro de 48 horas após a incisão, pode definitivamente retardar a cura, embora não a impeça.

Também em 1933, POHLE & RITCHIE<sup>(30)</sup> estudaram o efeito dos raios X na cura de feridas na pele de ratos submetidos à exposição de 1000 R, imediatamente, 24 e 48 horas após a incisão na pele.

Concluíram que o atraso na cura da ferida foi mais acentuado nas feridas irradiadas 24 horas após o corte. Os achados histológicos foram tomados em intervalos diários de 1 a 9 dias após a incisão onde estas mudanças começaram a se tornar evidentes 3 para 4 dias após o corte, mas a evidência maior foi observada em torno de 7 para 8 dias. Concluíram, também, que a radiação parece ter menos efeito no epitélio que no tecido conjuntivo subjacente.

Em 1934, NATHANSON<sup>(26)</sup> estudou o efeito dos raios gama na cura de feridas em cães. Trabalhou com doses variáveis, chegando às seguintes conclusões:

- houve uma aceleração na cura das feridas que foram expostas a pequenas e moderadas doses imediatamente após a incisão. Um retardamento foi observado naquelas feridas que receberam altas doses.

- um retardamento da cura foi notado em todas feridas expostas a qualquer dose de radiação 24 horas após a incisão, variando o grau diretamente com a dose.

- as feridas submetidas a doses variáveis 48 horas após a incisão apresentaram efeitos de retardamento, porém só com altas doses, não tendo sido observada nenhuma mudança com doses menores. O retardamento da cura não interferiu na formação de

uma cicatriz lisa.

DOBBS<sup>(19)</sup>, em 1939, relata que, até o trabalho por ele executado, se estudava o efeito da radiação na cura das feridas com o emprego de métodos de comparação microscópica e macroscópica do tecido controle e irradiado. Não havia estudo quantitativo satisfatório da cura da ferida submetida à radiação. Utilizou, então, um método de força de tensão para obter uma informação mais exata do efeito da radiação X na cura da ferida.

O autor considerou ser a força de tensão uma propriedade fisiológica fundamental do tecido, a qual pode ser considerada uma função de cura da ferida.

Assim, fez um estudo estatístico do efeito dos raios X na cura de feridas de incisões na pele de ratos e obteve as seguintes conclusões:

- as feridas na pele irradiada com 300 R imediatamente após a incisão mostraram aumento significativo na força de tensão. Não houve evidência anatômica do efeito de estimulação na cura das feridas irradiadas com 300 R.

- de 1020 a 1800 R aplicados imediatamente após, uma e três semanas antes da operação resultam em uma significativa diminuição na força de tensão das feridas na pele.

- a irradiação de incisões da pele com 1800 R 24 horas após a operação não causou nenhuma diminuição significativa na força de tensão das feridas.

POHLE e cols.<sup>(31)</sup>, em 1949, estudaram o efeito dos raios X na cura de feridas, quando observaram mudanças histológicas em pele de ratos após irradiação pós-operatória, com doses muito pequenas e moderadas. Trabalhando com doses de 10, 25, 150, 300, 350 e 700 R fizeram estudos macroscópios e microscópios onde observaram que:

- embora todas as feridas tenham sido examinadas diariamente, nenhuma diferença consistente no tempo de cura entre as porções irradiadas e não irradiadas da ferida pôde ser detectado macroscopicamente.

- não pôde ser encontrado, histologicamente, nenhum verdadeiro efeito estimulativo na cura até mesmo com as mais baixas doses utilizadas.

- uma leve diferença no processo de cura na porção irradiada (somente nas pequenas doses) foi considerada ocorrer pela redução na quantidade de exsudato, o qual diminuía a quantidade de fibrina a ser recolocada pelo tecido cicatricial.

LAWRENCE e cols.<sup>(21)</sup>, em 1953, fizeram um estudo em ratos que foram submetidos a incisão abdominal padrão, em diferentes tempos, após a irradiação das áreas onde as incisões variaram de nenhum intervalo a 3 meses.

A radiação aplicada no período pré-operatório foi de 2000 R e as feridas foram comparáveis a incisões clínicas de laparotomia.

Os estudos da média de cura dessas feridas, em termos de força de tensão, mostraram que todas elas alcançaram a força

máxima, embora tenha havido algum atraso na média de obtenção desta força nas feridas irradiadas. Um atraso na cura foi mais marcante nas feridas que receberam radiação, uma semana ou imediatamente antes da cirurgia.

As diferenças nas curvas de cura entre os tecidos irradiados 3, 5, 8 e 12 semanas antes da cirurgia não foram grandes. Estudos nutricionais e histológicos foram conduzidos e confirmaram dados obtidos na mensuração da força de tensão das feridas.

Estes dados sugerem que a cura das feridas cirúrgicas em tecido recentemente irradiado é prejudicada somente nos termos de média de cura e não nos termos da força final da ferida. Os dados também parecem demonstrar pequena ou nenhuma vantagem prática no atraso cirúrgico mais que três semanas após a radiação. A presença ou ausência de eritema de pele induzido pela radiação parece ter pequeno efeito na média de cura da ferida no rato.

Em 1961, KITAGAWA e cols.<sup>(18)</sup> fizeram um estudo quantitativo do conteúdo de colágeno, irradiando o membro traseiro de ratos com uma única dose de 3000 rads. Foram separados randomicamente os animais e foi iniciado o tratamento com L-triiodotironina, que variou com o tempo após a irradiação e que teve continuidade com a droga até o sacrifício dos animais, quando obtiveram os seguintes resultados:

- nos animais normais, o conteúdo de colágeno da pele e tecidos subcutâneos, quando medido pela hidroxiprolina, aumentou

lentamente com a idade.

- a exposição à radiação aumentou significativamente a acumulação de colágeno. Embora tenha sido encontrada uma diminuição no conteúdo total de água do tecido irradiado, esta mudança não explicou a alteração no conteúdo de colágeno.

- similarmente, foi encontrado que a mudança no total de proteína não explicava a mudança no conteúdo de colágeno.

Estes resultados indicaram que a exposição à radiação ionizante acelera a acumulação de colágeno na pele e tecidos subcutâneos, quando medidos pela hidroxiprolina.

GRILLO<sup>(13)</sup>, também em 1961, estudou a cura de feridas submetidas aos raios X. Trabalhando com cobaias, irradiou as feridas com doses moderadas de raios X (750 R) em intervalos de tempo variáveis e obteve as seguintes observações:

- apesar de haver ocorrido um fechamento completo da ferida, a iniciação e média (taxa) de fechamento cicatricial da pele pela contração foram retardadas quando irradiadas.

- o máximo de atraso observado foi durante 24 e 48 horas após a irradiação da ferida. Após o 5º dia, somente efeitos leves foram verificados.

- concomitante ao retardo da contração, houve diminuição da formação fibroblástica, inibição da proliferação capilar e desorganização da arquitetura do reparo resultante da irradiação.

Observou que os dados obtidos são concordantes com a teoria de que o fechamento da ferida pela contração pode resultar da migração de células orientadas. Os resultados apóiam a

probabilidade da origem local dos fibroblastos no reparo da ferida.

POWERS e cols.<sup>(32)</sup>, em 1967, em uma pesquisa que envolveu casos clínicos e casos com animais de laboratório, observaram que, em uma série de 214 pacientes operados após radioterapia, não houve demonstração de uma dose ótima de radiação ou retardo no tempo entre radiação e cirurgia para permitir uma cura completa e adequada da ferida com um mínimo de atraso.

Também por um estudo em animais (ratos), com o fim de determinar uma dose ótima e intervalo de tempo entre radiação e cirurgia para uma cura da ferida, perceberam que 10 dias era o mais adequado. Nos períodos anterior e posterior a estes ocorria uma menor cura da ferida.

BAILEY<sup>(33)</sup>, em 1968, em uma revisão sobre o efeito da radiação ionizante nos componentes do tecido conjuntivo, conclui haver grandes diferenças entre a dose necessária para produzir certo efeito "in vivo" e um igual efeito "in vitro", e que são característica comum da radiobiologia, e algumas teorias tentam explicá-las. Estas estão baseadas no dano ao DNA e também na ruptura das membranas celulares, que causam mudança no equilíbrio enzimático ou formação de produtos que são tóxicos à célula, havendo ainda uma possibilidade adicional desse dano ser induzido na permeabilidade dos lisossomos que podem liberar catepsinas e causar rápida desintegração da célula.

A ênfase nos estudos dos componentes do tecido conjuntivo "in vitro" tem obviamente sido dada ao colágeno, por ser de fácil extração e por ser bem conhecida a sua estrutura. Mesmo assim, a natureza das interações radiação e colágeno, que resultam na cisão do limite peptídeo e na formação de um novo tipo de ligação cruzada intermolecular, é pouco entendida.

A substância fundamental é também difícil de ser estudada em vista de sua heterogeneidade e da dificuldade de obtenção de um material representativo "in vivo". Uma melhor caracterização desses componentes, no futuro, ajudará na interpretação dos efeitos da radiação, acrescentando mais estudos direcionados a confirmar a ruptura das cadeias de polissacarídeos, a importância da água em manter a estrutura da substância fundamental, não esquecendo a sua possível dilaceração pelos eventos ionizantes.

A importância da proteção química e o reparo das moléculas danificadas é evidente, acrescentando a possibilidade de aumento da susceptibilidade dos tecidos à radiação que seria de grande valor à terapia do câncer. Infelizmente, nenhum maior esclarecimento nesta direção tem sido relatado até o momento.

Extremo cuidado deve ser tomado na interpretação dos resultados com componentes puros. As pesquisas devem, desta forma, ser conduzidas a todos os níveis. As completas implicações das mudanças na permeabilidade dos tecidos conjuntivos, até mesmo quando totalmente explicadas a nível molecular, têm ainda que ser racionalizadas com a quantidade de infecção subsequente do tecido "in vivo".

Muito progresso tem sido feito ao se determinar as causas do dano ao tecido "in vivo", e um início tem sido dado a nível molecular. Estas investigações devem contribuir para um completo entendimento dos efeitos radiobiológicos nos tecidos, que pode ocorrer somente através do estudo total dos mecanismos a nível molecular.

Uma vez que os mecanismos tenham sido estabelecidos a este nível, deve ser possível construir um sistema complexo "in vivo". É esperado que mais esforços a este nível possam conduzir a resultados mais produtivos, particularmente na detecção de mudanças a doses mais baixas, e que, ao mesmo tempo, resolvam a questão dos efeitos severos observados da deposição de quantidades de energia a cada minuto.

Estudos anteriores ao de ARCHER e cols.<sup>(42)</sup>, em 1970, têm revelado que a radiação inibe a cura da ferida sem alterar o total de colágeno. Entretanto, a determinação desse total não reflete exatamente a atividade da ferida porque sua matriz não pode ser amostrada exclusivamente.

Para os autores, partindo do princípio de que a maioria do novo colágeno em formação está na matriz da ferida, a detecção da média (taxa) de hidroxilação da prolina  $^{14}\text{C}$  forneceria um índice mais exato da produção de colágeno recém sintetizado. Estudaram o efeito da radiação local na média (taxa) de hidroxilação da prolina  $^{14}\text{C}$  na cura das feridas primária e secundária em ratos e obtiveram as seguintes conclusões:

- houve evidenciação de colágeno pela hidroxilação da prolina e esta formação começa imediatamente seguindo a cura da ferida primária.

- o fenômeno da ferida secundária acompanhou o aumento progressivo na hidroxilação da prolina.

- uma única dose de radiação inibiu a hidroxilação de prolina, sendo dependente da dose o grau e a duração da inibição.

Por fim, concluíram que uma radiação local na pele produz efeitos distantes na hidroxilação de prolina.

GRANT e cols.<sup>(12)</sup>, em 1973, submeteram à radiação gama os colágenos nativo e com ligações cruzadas do tendão do rabo de ratos. Examinado ao microscópio eletrônico, usando-se técnicas de coloração negativa, o colágeno irradiado no estado seco mostrou um maior dano estrutural que o irradiado na presença de água.

O colágeno ligado por glutaraldeído mostrou menor dano que o colágeno nativo, sendo retida até nos níveis mais altos da dose a forma das fibras, embora a estrutura da faixa seja profundamente alterada.

O colágeno irradiado molhado se tornou resistente à ação da colagenase bacteriana, diferentemente do colágeno irradiado seco. Já a elastase digeriu tanto o colágeno irradiado molhado como o seco. O colágeno com ligação cruzada, normalmente resistente tanto à elastase como à colagenase, se tornou sensível após várias doses de radiação, com diferenças marcantes no comportamento entre os espécimes irradiados molhados e secos.

O colágeno gama irradiado reagiu anormalmente, com várias colorações histológicas, e nos níveis mais altos da dose se assemelhou com elastina nas propriedades tintoriais. O colágeno com ligação cruzada mostrou menor mudança que o colágeno nativo.

Nenhuma alteração marcante foi encontrada na composição do amionoácido do colágeno irradiado.

As solubilidades no alkali quente, ácido acético frio e água quente foram todas diminuídas após a irradiação do colágeno no estado molhado e aumentadas após a irradiação no estado seco.

Concluíram que a irradiação gama do colágeno no estado seco resulta na cisão das cadeias polipeptídicas e que, na presença de água, isto é acompanhado pela formação de retensões intermoleculares. Estes processos parecem ser acompanhados por mudanças na configuração das cadeias polipeptídicas.

RANTANEN<sup>(33)</sup>, em 1973, estudou o efeito da radiação X, nas diferentes fases de desenvolvimento, no tecido experimental de granulação.

Foram produzidos granulomas subcutâneos, induzidos por esponjas, no dorso de ratos Wistar com 8 a 10 semanas de idade. Os granulomas de um lado dos ratos foram irradiados localmente nos dias 3, 7 e 15 após a implantação das esponjas, com uma dose de 1000 rads (250 kV), e aquelas do lado contralateral serviram como controles.

Os granulomas irradiados no 3º dia foram analisados nos 5º e 30º dias após a implantação e tiveram conteúdos mais baixos

de colágeno solúvel em sal, e em ácido acético 0,5 M, como também de DNA e RNA, quando comparados aos controles.

Os granulomas irradiados no 7º dia foram analisados no 10º e 30º dias e mostraram uma diminuição da quantidade de colágeno solúvel, DNA e RNA; entretanto, as quantidades do colágeno total e insolúvel foram aumentadas em 30%.

Mudanças paralelas, porém menores, foram observadas nos granulomas irradiados no 15º dia e analisados nos dias 20 e 30.

RICKERT & FORBES<sup>(35)</sup>, em 1973, expuseram ratos machos (SM/J), com 23 a 33 semanas de idade, a 0,6 Krads de raios X no corpo todo. Os animais foram sacrificados 36 semanas mais tarde e suas peles foram removidas e isoladas em frações de colágeno (salina neutra, ácido solúvel e insolúvel).

Através do exame das 3 frações, observaram que a exposição aos raios X resultou em um aumento da labilidade da matriz de colágeno insolúvel e em uma deposição de proteínas não colágenas.

SVOJTKOVA e cols.<sup>(41)</sup>, em 1973, submeteram espécimes liofilizadas de colágeno insolúvel a radiação gama onde observaram que o colágeno irradiado, quando comparado aos controles não irradiados, é mais susceptível a diferentes tipos de extração.

Durante a radiação, fragmentos macromoleculares com o tamanho próximo ao da cadeia alfa foram liberados ao lado de peptídeos de baixo peso molecular.

A divisão (quebra) do colágeno liofilizado "in vitro" não se deu ao acaso e pareceu ser limitada à região telopeptídica e/ou às ligações cruzadas que são acumuladas com a idade e que eficientemente bloqueiam a reação de despolimerização. Este bloqueio pode ser usado como um instrumento para avaliação do grau de maturidade do colágeno.

JOVANOVIĆ<sup>(14)</sup>, em 1974, fez uma revisão sobre a influência da radiação nos fatores não celulares, vasos sanguíneos e circulação. Verificando os efeitos da radiação na matriz de mucopolissacarídeos em várias membranas biológicas elaborou um resumo da seguinte maneira:

- os mucopolissacarídeos são despolimerizados pelas radiações ionizantes. Este efeito é instantâneo, pode ser medido mesmo durante a exposição e aparece até em pequenas doses (1-2 R).

- a duração desta despolimerização é variável. É relatado reparo instantâneo como também inchaço (aumento de volume) da substância fundamental que persiste até o 17º dia após a radiação.

- as consequências funcionais da despolimerização são, principalmente, mudanças na permeabilidade à água e à alguns solutos. Foi mostrado que a permeabilidade será aumentada em um tecido rico em mucopolissacarídeos e permanecerá imutável, ou paradoxalmente diminuída, se o conteúdo de mucopolissacarídeos for baixo.

- tanto na fase precoce como na fase tardia foi observada a fragmentação de fibras elásticas.

- a eficiência biológica relativa (RBE) de 14 MeV de neutrons para sistemas de mucopolissacarídeos foi achado ser de aproximadamente 0,6. Isto, em contraste a valores usuais de RBE para neutrons rápidos em diferentes tecidos (1,8).

- "Cisteamine" e "5-hidroxytryptamine" (5-HT) foram identificados como capazes de diminuir os efeitos da radiação na matriz de mucopolissacarídeos (DRF 1,9 a 2,3), mas são menos efetivos que o tiosulfato (DRF=6). As propriedades modificantes da dose destes agentes são levemente mais baixas para 14 MeV neutrons que para 250 kV de raios X. Se presente em concentração mais alta, (0,01 M) 5-HT potencializa o aumento de permeabilidade induzida por neutrons ou raios X.

- a hipóxia induzida pela inalação de nitrogênio durante a radiação foi também efetiva na redução dos efeitos da radiação em ratos.

VAN DEN BRENK e cols.<sup>(44)</sup>, em 1974, estudaram os efeitos da radiação X no crescimento e função do tecido de granulação. Primeiramente, avaliando a contração da ferida na pele de fêmeas de rato, observaram que o fechamento e cura das feridas são devido, principalmente, a uma aproximação rápida da ferida pela contração.

Essa contração depende do crescimento proliferativo do tecido de granulação, ou seja, dos tecidos conjuntivo e vascular. Deste modo, a contração da ferida é celular na origem e

provavelmente devido à capacidade de contração das células do tecido de granulação.

A radiação pré-operatória local da pele imediatamente antes da cirurgia causou redução dependente da dose na taxa (média) de contração da ferida, devido ao atraso e inibição do crescimento do tecido de granulação de reparo. Quando a dose foi fracionada, obteve-se evidência de recuperação do dano subletal.

Foi diminuído o efeito da radiação pré-operatória com o aumento do tempo entre radiação e cirurgia. A radiação local pré-operatória com doses únicas (4-8 KR), na pele principalmente protegida por uma grade de chumbo ou por uma treliça de discos de chumbo, não causou redução na taxa de contração da ferida e mostrou que a descontinuidade espacial dos tecidos de reparo (granulação) não preveniram integração da função.

Quando se protegeu parcialmente a margem ou base de uma ferida recentemente operada durante a radiação foi possível mostrar que a concentração, como esfíncter do tecido de granulação, produziu contração principalmente na periferia de uma ferida aberta.

Quando a radiação foi aplicada pós-operatoriamente (durante a contração), após o desenvolvimento do tecido de granulação a taxa de contração não foi diminuída.

VAN DEN BRENK e cols.<sup>(45)</sup>, também em 1974, em um outro trabalho estudaram os efeitos da radiação X no crescimento e na função do tecido de granulação de reparo através de medições da angiogênese na bolsa Selye no subcutâneo de ratos.

Utilizaram a técnica da bolsa Selye para estimular subcutaneamente o crescimento do tecido de granulação e angiogênese e medir a radiosensibilidade dos vasos de capilares sanguíneos.

O dano da radiação aos tecidos foi baseado nas seguintes medidas: (I) peso por unidade de área e conteúdo correspondente de DNA do tecido de reparo; (II) volume de sangue produzido pela angiogênese na bolsa e (III) contagem da macrocolônia vascular.

A contagem colonial deu um valor  $D_{10}$  de 240 rads para uma única dose e o restabelecimento para duas frações iguais aproximou-se a 180 rads.

Não foi observada nenhuma diferença significativa para doses únicas de radiação, pouco antes ou depois do crescimento das bolsas.

Foi associado a um reparo rápido e marcante ao dano da radiação o intervalo aumentado entre a radiação da pele intacta e o crescimento da bolsa. Doses únicas de 1500-1800 rads, aplicadas em peles intactas com um atraso de 2-3 semanas, resultou em um fator de redução da dose de 500-625 rads.

A irradiação local de uma bolsa com uma única dose (2-4 Krads) rapidamente destruiu a camada mais interna do tecido angioblástico ativamente em crescimento e causou a detenção (aprisionamento) da hemorragia, sendo que as camadas mais externas do tecido diferenciado mostraram menor dano.

BLYTHE e cols.<sup>(45)</sup>, em 1975, mediram o efeito do atraso da radiação na cura de feridas na pele de ratos. A pele dos ratos foi exposta a 1000 R de raios X, nos dias 0, 3 e 5 após a incisão. Observaram que a radiação local após a incisão enfraquece a cura, quando histologicamente examinada e medida quantitativamente pela avaliação da força de tensão.

As feridas irradiadas foram todas significativamente mais fracas que as não irradiadas, mas o atraso da radiação não beneficiou a cura da ferida.

THYAGARAJAN e cols.<sup>(43)</sup>, em 1976, estudaram os efeitos da radiação no corpo todo de ratos sobre alguns aspectos do metabolismo do colágeno. Observaram que a exposição com doses subletais (400 R) e letais (800 R) causou diminuição dos níveis de hidroxiprolina na urina e no músculo esquelético.

Após a injeção intraperitoneal de prolina <sup>14</sup>C, similarmente houve uma redução na excreção da hidroxiprolina marcada na urina. Isto pode ser atribuído ao enfraquecimento da hidroxilação da prolina "in vivo".

No músculo esquelético e na pele dos ratos irradiados foi marcadamente reduzida a incorporação da <sup>14</sup>C prolina em termos de <sup>14</sup>C-hidroxiprolina e sua distribuição nas diferentes formas metabólicas de colágeno. Isto também sugeriu um enfraquecimento da hidroxilação da prolina. Entretanto, a atividade, no fígado, da prolina hidroxilase "in vitro" não foi afetada por tratamento radioativo.

A diminuição do consumo de oxigênio endógeno, observado nos homogenados do fígado de ratos irradiados, pode ser um dos fatores que afetam "in vivo" a hidroxilação da prolina.

LAW e cols.<sup>(20)</sup>, em 1976, estudaram o conteúdo de colágeno nos pulmões de rato após radiação X. Após a radiação do hemitórax com grandes doses (1000, 2000, 3000 e 4000 rads), investigaram o desenvolvimento de fibroses nos pulmões.

A hidroxiprolina, um aminoácido específico para o colágeno, foi estimada tanto no pulmão protegido como no irradiado, até 48 semanas após a exposição. Houve uma atrofia, dependente da dose, do pulmão irradiado e uma hipertrofia compensatória do pulmão protegido. A hidroxiprolina por grama de pulmão seco irradiado aumentou entre 24 e 36 semanas após 2000-4000 rads com nenhuma outra mudança significativa até 48 semanas. Tanto o conteúdo total de hidroxiprolina como o peso seco dos pulmões irradiados diminuiu, mas passadas 24 semanas a aparência histológica foi a deposição de colágeno após o edema e hiperplasia.

Concluíram que a deposição do colágeno ocorre como um último estágio na reorganização do pulmão do rato após a injúria da radiação e, provavelmente por esta razão, não é a causa da morte nos períodos de 80-180 dias após a exposição de todo o tórax.

DE LOECKER e cols.<sup>(21)</sup>, em 1976, estudaram o metabolismo e a resposta do colágeno na pele de ratos submetidos a 750-3000 R de radiação X durante três consecutivos ciclos

capilares.

A biosíntese do colágeno e renovação, determinada pela hidroxilação da prolina, segue como uma função do fenômeno periódico do crescimento capilar.

Um único tratamento de radiação X na pele não afetou a composição de aminoácido do colágeno, mas reduziu a capacidade de hidroxilação da prolina dos fibroblastos.

O dano inicial ao tecido resultou em uma reduzida concentração de colágeno da pele, particularmente perceptível após vários ciclos capilares, que é, no mínimo parcialmente responsável pelas lesões atrasadas da pele após radiação.

SKOUGAARD & CARSTEN<sup>(39)</sup>, em 1970, estudaram o efeito da idade e radiação no metabolismo do colágeno na pele e ligamento periodontal de ratos.

Os ratos foram divididos em 12 grupos com 5 animais cada, 6 controles e 6 experimentais. Trinta animais foram sacrificados de 30 a 49 dias após a irradiação e os 30 remanescentes um ano mais tarde.

Foi avaliada a atividade  $^3\text{H}$  por mg de peso seco como também a atividade de  $^3\text{H}$ -hidroxiprolina na pele. Além disso, foi estimado o conteúdo de grão autoradiográfico por unidade de área do ligamento periodontal.

Os ratos irradiados perderam peso durante os primeiros dias, mas começaram a ganhar peso 14 dias após a radiação.

Nos ratos jovens irradiados, foi deprimida a atividade de  $^3\text{H}$ -HP nos dias 2 e 7 após a injeção, mas depois de 21 dias

atingiram o mesmo nível dos controles, indicando um atraso na hidroxilação da prolina.

Os animais controle velhos tiveram um nível mais baixo de  $^3\text{H-HP}$  que os animais controle jovens, enquanto que não foi encontrada nenhuma atividade na pele dos ratos velhos irradiados.

No ligamento periodontal dos jovens animais irradiados, o conteúdo de grãos revelou um decréscimo na retirada de aminoácido marcado; entretanto, um ano após a radiação, os ratos tinham recuperado sua habilidade para incorporar prolina marcada no ligamento periodontal.

O fato do nível da atividade ser o mesmo nos ratos velhos irradiados que nos controles sugeriu que os ratos tinham reobtido a habilidade para anabolizar colágeno no ligamento periodontal.

DROZDZ e cols.<sup>(10)</sup>, em 1981, determinaram frações de glicosaminoglicanas em tecidos (pele, fígado, pulmões e parede de aorta) e no soro sanguíneo de ratos submetidos a 500 R de radiação no corpo todo.

Foi encontrado nos tecidos e urina dos ratos expostos um aumento do total de glicosaminoglicanas. Os autores disseram que as alterações no conteúdo de glicosaminoglicanas nos tecidos revelaram um processo complicado de dano ao tecido conjuntivo, induzido pela radiação. O aumento foi observado antes que ocorressem alterações no conteúdo de colágeno. Isto sugere que a influência da radiação no tecido conjuntivo leva a uma destruição da substância fundamental. Este fenômeno pode ser um fator

adicional estimulante de alterações no metabolismo do colágeno.

Por fim, concluíram que os resultados apresentados indicam que a radiação produz distúrbios severos no metabolismo das glicosaminoglicanas, sendo porém o mecanismo direto destas alterações ainda desconhecido.

SVOJTKOVA e cols.<sup>(41)</sup>, em 1983, verificaram se as mudanças causadas no colágeno pela idade seriam iguais às mudanças causadas pela radiação X crônica.

Trabalharam com ratos que foram expostos a doses semanais de raios X que acumularam 7 Gy até completarem 1 mes de vida e sacrificados uma semana após a última exposição.

Retiraram pedaços da pele dos animais para estudar as características do colágeno e fizeram as seguintes observações:

- mostrou-se que, na pele de ratos cronicamente irradiados, a proporção de colágeno tipo III é aumentada quando comparada ao colágeno tipo I. Por outro lado, não observaram nenhuma mudança na proporção total de colágeno na pele.

- pareceu que o aumento na proporção de colágeno tipo III nos ratos cronicamente irradiados é o responsável pela diminuição de solubilidade do colágeno cutâneo nestes animais.

- concomitantemente, foi acumulada uma prova (evidência) indireta pela presença de uma ligação cruzada adicional no colágeno tipo III, presente somente quando os animais irradiados serviram como fonte de colágeno. Esta ligação é localizada subterminalmente tão longa que não é removida, pela digestão limitada de pepsina.

Concluíram haver uma diferente formação molecular entre a diminuição fisiológica na solubilidade e a diminuição na solubilidade observada nos animais cronicamente irradiados.

WARD e cols.<sup>(49)</sup>, também em 1983, estudaram a acumulação de colágeno modificado pelo antagonista "D-Penicillamine" em pulmão de ratos irradiados. Os pulmões dos ratos foram expostos a 25 Gy de raios gama  $^{60}\text{Co}$  direto no hemitórax. Os animais foram sacrificados 3, 6, 9, e 14 meses após a radiação.

Observaram que o antagonista de colágeno "D-penicillamine" (10mg/dia, p.o) melhorou significativamente a acumulação de hidroxiprolina induzida pela radiação nos pulmões dos ratos.

O efeito benéfico da "penicillamine" foi observado quando os valores de hiroxiprolina foram expressos baseados nos pesos úmido, seco, ou por todo o pulmão e não foi acompanhado por mudanças significativas no tamanho da solução da fração do colágeno.

O regime desta droga não teve efeito na concentração de hidroxiprolina no pulmão esquerdo protegido, e a observação foi aparentemente livre dos efeitos deletérios laterais.

MOORE<sup>(25)</sup>, em 1984, em seu trabalho de revisão, analisa o efeito da radiação no tecido conjuntivo e diz que, embora muito seja conhecido sobre a interação da radiação e tecido, o exato mecanismo de injúria das células não é bem

definido. Uma vez no tecido, o feixe de radiação é convertido em elétrons altamente carregados e radicais livres, que interagem com "alvo" na célula, mais provavelmente o DNA. Em células que estão se dividindo, o efeito no DNA resulta em injúria ao mecanismo reprodutor e morte da célula quando a divisão é completada. Embora haja exceções, as células que se dividem mais rapidamente tendem a ser mais sensíveis à radiação e são, geralmente, severamente injuriadas ou mortas até mesmo por baixas doses de radiação. Inversamente, as células que não se dividem, como os neurônios e células musculares, são resistentes até mesmo a grandes doses de radiação; entretanto, podem ser injuriadas indiretamente pelo efeito da radiação em seus tecidos de suporte, que são moderadamente sensíveis à radiação.

Há poucas mudanças observadas nos elementos teciduais vasoconjuntivos, embora nos elementos epiteliais a radiopatologia possa variar de algum modo, dependendo do tecido ou órgão irradiado. Ainda que possa haver injúria nos múltiplos componentes do tecido conjuntivo, as mudanças mais proeminentes são notadas nos capilares, em pequenas arteríolas e, às vezes, em vênulas e linfáticos, em um período de tempo de muitas semanas seguidas à aplicação da radiação. Nesse período, os tecidos vasoconjuntivos geralmente não mostram grandes mudanças quando estão sob condições normais, pois estes tecidos não se proliferam rapidamente. Em associação com as mudanças vasculares é observado um aumento gradual de tecido fibroso nos tecidos e órgãos irradiados. Os tecidos submucosos e subcutâneos ganham,

progressivamente, mais colágeno. As fibroses e a avascularidade são progressivas, irreversíveis e dose-dependentes, tornadas mais severas com o aumento da dose de radiação. Se a radiação exceder a tolerância do tecido poderá desenvolver-se necrose.

Múltiplos estudos mostram que uma alteração característica na cura da ferida é produzida pela irradiação. O tamanho do efeito é diretamente proporcional à dose. Além disso, uma sequência relativa de radiação e cirurgia é importante, e maior dano ocorre com irradiação apenas alguns dias antes ou após a data da cirurgia. Em animais experimentais, pequenas doses de radiação aplicadas duas ou três semanas antes ou seguidas à cirurgia atrasam um pouco o processo de cura normal, embora tenha sido relatado que pequenas doses de irradiação (300 rads) aplicadas no dia da cirurgia aumentam a cura da ferida, ainda que existam anormalidades bioquímicas.

Obviamente, há problemas inerentes ao aplicar os dados experimentais de animais no homem. Neste particular evento, a cura em animais deve ter uma diferente sequência de tempo.

RAVELI e cols.<sup>(34)</sup>, em 1990, estudaram histomorfologicamente a influência da radiação X sobre a cronologia do processo de reparo em feridas de extração dental. Trabalhando com 60 ratos jovens, extraíram os incisivos superiores direito de todos os ratos e os dividiram em 3 grupos: Grupo, I como controle, e Grupos II e III que receberam, respectivamente, as seguintes doses de raios X: 1,25 Sv e 1,75 Sv. Os animais foram sacrificados aos 3, 7, 14 e 28 dias

após as extrações dentais. Após examinarem lâminas coradas com hematoxilina e eosina concluíram que:

- houve retardo na proliferação epitelial da mucosa gengival dos animais submetidos à irradiação X, de forma semelhante nos dois grupos irradiados. Também houve um considerável atraso na cronologia do processo de reparo alveolar em feridas de extração dental e este atraso foi mais acentuado quanto mais intensa a ação dos raios X.

ABDALLA e cols.<sup>(01)</sup>, em 1991, estudaram os efeitos dos baixos níveis da radiação X no desenvolvimento dos tecidos de granulação induzidos pela implantação de uma esponja de PVC em ratos.

Dividiram os animais em 3 grupos: Grupo I - controle, composto por 7 ratos que foram submetidos a implantação da esponja de PVC e sacrificados aos 4, 7, 14, 21 e 28 dias depois de terem recebido implante. Grupo II - também com 7 ratos nas mesmas condições de implantação e sacrifício, que foram submetidos a 5,28 R, em uma dose única, no momento do implante; Grupo III - composto por 9 ratos, nas mesmas condições de implantação e sacrifício, submetidos à dose de 5,28 R a cada 2 dias após o implante, durante 14 dias, e a cada 4 dias, até completar 28 dias (58,08 R no total).

Os resultados mostraram haver uma parcial inibição na evolução do tecido de granulação. Níveis baixos de irradiação X produziram efeitos cumulativos, os quais são observados tanto no Grupo II quanto no Grupo III, quando comparados ao controle.

Doses alternativas produziram um maior efeito cumulativo que uma dose única.

Em 1975, VIZIOLI<sup>(47)</sup> fez um estudo com a finalidade de pesquisar a presença e o possível papel do grupo enzimático das fosfomonoesterases no tecido de granulação, induzido por implantação de esponjas de PVC no tecido subcutâneo do rato. O tecido foi estudado aos 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 e 40 dias de evolução.

Os resultados mostraram que a síntese de colágeno e de mucopolissacarídeos ácidos no tecido de granulação inicia-se logo aos primeiros dias de desenvolvimento e atingem o ponto máximo entre 15 e 20 dias, decaindo visivelmente após esse tempo.

A pesquisa histoquímica das fosfomonoesterases demonstrou que a fosfatase alcalina tem atividade progressivamente crescente a partir dos 10 dias de evolução do tecido, atingindo o máximo de atividade aos 15 dias, mantendo-a até 20 dias, quando cai bruscamente. Essa atividade, coincidente com o período máximo de síntese de colágeno e mucopolissacarídeos ácidos, demonstra que a fosfatase alcalina tem um papel importante na agregação do complexo colágeno-mucopolissacarídeos ácidos, agindo em algum ponto da formação das cadeias de carboidratos e, conseqüentemente, da formação dos mucopolissacarídeos ácidos.

A ATPase e a 5' nucleotidase também têm suas atividades máximas no período entre 15 e 20 dias, sendo, portanto, relacionadas com os processos energéticos de alta intensidade

exigidos pelo tecido cujo metabolismo é muito ativo.

Na literatura não foi encontrado trabalho que fizesse referência ao efeito dos raios X sobre as três enzimas em tecido de granulação. Porém, foram encontrados alguns trabalhos com referência ao efeito da radiação sobre alguma das enzimas pesquisadas, que variaram conforme o animal, local e modo com que foram estudadas.

YUKAWA & NAKAZAWA<sup>(50)</sup>, em 1973, estudaram o efeito da radiação X na atividade da hidroxilação no fígado de ratos em estágio de aleitamento durante seu desenvolvimento.

Foi suprimido parcialmente pela radiação com uma dose de 200 R e completamente por 400 R o aumento de atividade no período pós aleitamento, sem mudança marcante no conteúdo de proteína microsomal do fígado.

As atividades do sistema de transporte elétron microsomal foram inibidas levemente aos 40 dias de idade nos ratos irradiados com 400 R, mas tanto o conteúdo de citocromo P-450 como a mudança espectral induzida por hexobarbital foram suprimidas consideravelmente.

As atividades da adenosina trifosfatase e da inosina difosfatase foram mais altas que aquelas do controle, enquanto a atividade da glucose-6-fosfatase foi menor aos 40 dias de idade, nos ratos irradiados.

Em 1973, BHATAVDEKAR e cols.<sup>(51)</sup> estudaram bioquimicamente o efeito de uma dose de 120 R de raios X nas

fosfatases alcalina e ácida, nos ácidos nucleicos e nas proteínas em tecidos (fígado, rim, músculo, adrenal e baço) de cobaias normal, irradiada e em recuperação.

As concentrações de fosfatases foram significativamente diminuídas nos tecidos irradiados e valores normais não foram obtidos até mesmo em 72 horas de recuperação. A redução das fosfatases pode ter sido devido a inativação de lisozimas.

Os metabolismos do RNA e das proteínas foram levemente ativados, enquanto o metabolismo do DNA diminuiu na radiação. É sabido que a síntese proteica não é afetada por baixa dose de radiação, mas sua média (taxa) de síntese é reduzida dentro de um curto período, em tecidos submetidos a altas doses. A radiação induz defeitos locais na macroestrutura das moléculas de proteína, as quais se tornam centros de desnaturação térmica e ligações cruzadas, causando, deste modo, dano tecidual.

Foram observadas múltiplas alterações nas estruturas dos ácidos nucleicos irradiados, principalmente no DNA que é considerado como um alvo radiosensível primário. Além disso, a restauração da estrutura de DNA danificada também ocorreu. Este processo de restauração envolveu duas enzimas. A concentração de DNA nos tecidos estudados por eles mostrou uma redução que foi subsequentemente restaurada à normalidade dentro de 3 dias, que pode ter sido devido a um atraso ou prolongamento da fase S.

Embora a radiação tenha afetado as concentrações de fosfatases, ácidos nucleicos e proteínas, não houve nenhuma injúria severa perceptível.

WACHSMUTH & TORHORST<sup>(48)</sup>, em 1974, estudaram a biogênese das membranas "brush border" através das proteínas precursoras das enzimas da membrana "brush border". Estas proteínas foram descobertas no citoplasma de células da cripta do intestino delgado e nos túbulos contorcidos proximais do rim. Esta descoberta foi confirmada em ratos após 1200 R de radiação X, que é conhecida por atrapalhar a síntese proteica. As enzimas hidroliticamente ativas, aminopeptidase (EC 3.4.1.2) e fosfatase alcalina (EC 3.1.3.1) foram analisadas nos homogenados e localizadas em cortes teciduais por método histoquímico.

Um efeito de 1200 R de raios X somente pode ser visto no intestino delgado e não no rim. Na fase inicial de degeneração, tanto as proteínas precursoras como suas enzimas aumentaram.

Na fase de degeneração tardia as proteínas precursoras desapareceram primeiro das criptas do duodeno e íleo, seguido pelas enzimas hidroliticamente ativas na membrana "brush border" da "vilo".

Na fase de regeneração, as proteínas precursoras já reapareceram, enquanto as enzimas hidroliticamente ativas se tornaram detectáveis na membrana da "vilo".

O aparecimento das proteínas precursoras citoplasmáticas foi um pré-requisito para o aparecimento das enzimas da membrana "brush border". Isto é consistente por serem proteínas precursoras verdadeiras.

KAUR e cols.<sup>(15)</sup>, em 1975, estudaram a fosfatase alcalina e a glicose-6-fosfato em três regiões anatomicamente diferentes do intestino delgado de ratos submetidos a uma dose de 400 R, de uma fonte de Co 60 de raios gama.

As duas atividades enzimáticas mostraram estar aumentadas no duodeno, jejuno e íleo, 24 horas após a radiação. No terceiro dia, a atividade da fosfatase alcalina tendeu a ser baixa quando comparada a do 1º dia após a radiação, mas a glicose-6-fosfatase continuou a aumentar mesmo no 3º dia.

O aumento máximo da glicose-6-fosfatase foi observado no jejuno. No 9º dia, a fosfatase alcalina foi diminuída abaixo dos controles em todo o intestino, mas voltou ao normal no 10º dia. Por outro lado, as atividades da glicose-6-fosfatase no duodeno e jejuno foram comparáveis àquelas dos ratos controle, mas, no íleo, a atividade desta enzima esteve abaixo dos valores normais.

A fosfatase alcalina e a glicose-6-fosfatase parecem ter implicações fisiológicas na absorção de glicose ao longo do intestino e tem sido relatado que o transporte de glicose é diminuído durante o período inicial após a radiação, mas subsequentemente aumentado após 24 horas.

Decorridas 24 horas, a absorção de glicose é marcadamente diminuída e, deste modo, a resposta difásica da absorção de glicose é sugerida. Os níveis aumentados das fosfatases em questão podem, deste modo, ser associados à absorção aumentada de glicose pelas células epiteliais mais maturadas nos dias 1 ou 3, após a radiação. Um declínio da

fosfatase alcalina no dia 9, com sua tendência normalizante no dia 10, parece ser associado com a absorção diminuída da glicose pelo intestino irradiado.

PALVA<sup>(27)</sup>, em 1978, estudou a atividade epitelial da Na-K-ATPase nos olhos de ratos após radiação X (1500 R), em intervalos de 3 a 90 dias. A enzima foi demonstrada histoquimicamente por microscópio de luz polarizada e foi medida bioquimicamente por método fluorométrico.

Os resultados histoquímicos e bioquímicos apresentados sugerem que a atividade da Na-K-ATPase das membranas das células epiteliais dos olhos não é primariamente afetada pela radiação X. Por outro lado, deve ser notado que a radiação X causa edema relativamente precoce nas células epiteliais. Deste modo, pode ser sugerido que estas alterações precoces nos olhos após a radiação X, são em primeiro lugar, devido a uma permeabilidade passiva aumentada das membranas celulares aos cátions e não um defeito no sistema ativo da bomba de cátion.

KRIZALA e cols.<sup>(19)</sup>, em 1980, estudaram, em cães irradiados com 3.0 Gy de radiação gama, as mudanças da atividade total em soro sanguíneo da fosfatase alcalina e de suas isoenzimas óssea e intestinal.

As atividades das isoenzimas da fosfatase alcalina foram determinadas pelo método inibição-inativação pelo calor. Após a radiação, as atividades no soro, da fosfatase alcalina, foram, em geral, mais baixas. No caso da isoenzima óssea, a

diminuição foi mais pronunciada. As mudanças na atividade total da fosfatase alcalina e da isoenzima intestinal foram menos distintas.

MATSUDA e cols.<sup>(23)</sup>, em 1982, mediram, em diferentes tempos, a atividade da Na-K-ATPase dos olhos de coelhos expostos a uma única dose de 2000 rads de raios X e compararam com os olhos controle contralaterais.

Observaram primeiro diminuição da atividade enzimática em ambos os olhos e no epitélio capsular isolado nas 3ª e 4ª semanas após a radiação, que se tornou marcadamente aumentada na 7ª semana e meia após os raios X. Esses achados foram concordantes com suas primeiras observações sobre o transporte ativo de cátions ser reduzido nesses olhos e apóiam a visão de que a perda da ATPase da membrana é responsável pelo enfraquecimento da bomba de cátion nos olhos irradiados.

CATRAVAS e cols.<sup>(27)</sup>, em 1988, estudaram "in vivo" os efeitos da radiação ionizante nas enzimas endoteliais pulmonárias convertora de angiotensina e na 5' nucleotidase. Coelhos foram expostos a uma única dose (30 Gy), utilizando-se um acelerador linear Varian Clinac 4. Este aparelho produz um feixe de raios X 4 MV bem definido, semelhante ao Cobalto-60.

Utilizaram técnicas múltiplas diluição-indicadora, onde foram estudados o metabolismo de [<sup>3</sup>H] benzoyl-Phe-Ala-Pro (BPAP) e de [<sup>14</sup>C] 5'-AMP, pela enzima convertora angiotensina (ACE) e pela 5' nucleotidase (NCT), respectivamente, durante uma única

passagem transpulmonária em coelhos conscientes, cronicamente cateterizados.

Dos dados, foram calculadas duas constantes cinéticas,  $K_m$  e  $A_{max}$ . Foi observado um significativo decréscimo nas 2, 24 e 48 horas após a radiação no metabolismo das quantidades de BPAP e 5'AMP. Um igual decréscimo nas primeiras taxas das constantes ( $A_{max}/K_m$ ) de ACE foi observado nas primeiras 2 horas, mas que retornou a níveis de controle nas 24 e 48 horas após radiação.

Os valores de  $K_m$  de ACE para BPAP e NCT para 5'AMP foram elevados nas 2, 24 e 48 horas pós-tratamento, ao passo que a  $A_{max}$  (produto da massa enzimática e a constante da formação de produto,  $K_{cat}$ ) de ACE foi elevada nas 2 e 24 horas, mas não nas 48 horas, e  $A_{max}$  para NCT foi elevada somente nas 2 horas pós-tratamento.

Não foi observada nenhuma mudança na estrutura endotelial nas 2 horas pós-irradiação a níveis de microscópio óptico e eletrônico.

Concluíram que a fase inicial de radiação induziu a uma injúria pulmonar, incluindo mudanças na função da enzima endotelial na ausência de danos estruturais como refletidos em uma aparente diminuição na afinidade de ACE e NCT para seus substratos, permitindo a possibilidade de distúrbios hemodinâmicos ou suas sequelas poderem, também, ter contribuído para a diminuição da função enzimática.

### 3 - PROPOSIÇÃO

### 3 - PROPOSIÇÃO

Considerando ser a radiação uma energia com propriedades capazes de provocar alterações físico-químicas também nos organismos vivos, nos propomos a estudar o efeito dessa energia sobre a atividade das enzimas fosfatase alcalina (EC 3.1.3.1), 5' nucleotídeo fosfodiesterase (EC 3.1.4.1) e adenosina trifosfatase (ATPase) (EC 3.6.1.3) em tecido de granulação submetido a baixas doses de raios X.

#### 4 - MATERIAIS E MÉTODOS

## 4 - MATERIAIS E MÉTODOS

### 1- SELECÇÃO DOS ANIMAIS

Na pesquisa, foram utilizados 114 ratos Wistar (*Rattus norvegicus albinus*), machos pesando entre 150 e 180 gramas.

Os ratos foram fornecidos pelo Biotério Central da UNICAMP, separados em número máximo de seis por gaiola e alimentados com ração balanceada padrão e água "ad libitum".

### 2- PREPARO DOS ANIMAIS

Para a obtenção do tecido de granulação, foram utilizados fragmentos de esponja de Polivinil (PVC), na forma de disco com 8 mm de largura por 4 mm de espessura. Obtidos os discos, estes foram embalados em papel manilha e esterilizados em autoclave. De posse dos discos devidamente esterilizados, foram implantados subcutaneamente nos animais, da seguinte maneira:

- os animais foram anestesiados em campânula de vidro contendo éter etílico. Logo após, depilou-se a região dorsal mediana-traseira dos animais e utilizou-se mertiolate incolor como antisséptico;

- fez-se uma incisão de aproximadamente 15 mm na pele, perpendicularmente ao longo eixo da coluna vertebral;

- com o auxílio de uma tesoura de ponta romba, procedeu-se à divulsão do tecido para facilitar a introdução da esponja;

- com auxílio de uma pinça, foi retirada a esponja de sua

embalagem e introduzida através da incisão. A esponja foi acomodada de modo que ficasse o mais longe possível da incisão, a fim de evitar que o processo de cicatrização da incisão atingisse o tecido de granulação em desenvolvimento;

- uma vez implantada a esponja, a incisão foi suturada com um ponto simples.

### 3- DISTRIBUIÇÃO DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS

Os animais foram numerados por marcação em sua orelha e, por sorteio, foram divididos em 3 grupos:

Grupo I - controle, Grupo II - irradiado em uma única vez e Grupo III - irradiado de forma dividida.

### 4- IRRADIAÇÃO DOS ANIMAIS

Para a irradiação dos animais foi utilizado um aparelho de raios X GE 1000 eletrônico, modelo 46-158840 GI, operando com os seguintes fatores: 65 kVp, 10 mA e 18 segundos de exposição.

Acochado ao cabeçote do aparelho foi utilizado um colimador de metal de 120 mm de comprimento por 20 mm de diâmetro. Esse acessório, além de proporcionar uma padronização da distância em que foram efetuadas as exposições, também auxiliava na incidência do feixe de raios X, tornando-o, portanto, mais eficaz.

Os animais, ainda anestesiados após a implantação das esponjas, foram levados para o aparelho de raios X e posicionados

sobre uma mesa com o seu dorso voltado para cima.

Sobre a saliência do tecido depilado, onde por baixo se encontrava a esponja implantada no animal, posicionamos um par de dosímetros e, sobre este, direcionamos o colimador metálico para expor a região à radiação.

O aparelho de raios X foi direcionado no sentido súpero-inferior, de modo que o colimador ficasse apoiado sobre o dorso do animal, incidindo os raios X perpendicularmente à esponja e aos dosímetros.

Os animais do Grupo II foram irradiados com seguidas exposições de 2, 2, 3, 3, 3, 3, e 2 segundos, respectivamente, perfazendo uma exposição total de 18 segundos, no mesmo dia da implantação da esponja.

Os animais do Grupo III foram irradiados de forma dividida, duas exposições de 3 segundos totalizando 6 segundos de exposição no dia do implante da esponja, no 3º e no 5º dias após a implantação da esponja.

#### 5- DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE RADIAÇÃO

Para a determinação dos níveis de radiação, utilizamos dosímetros termoluminescentes de fluoreto de lítio - 700 (LiF-700) em forma de cristais, medindo 3 por 3 mm de base por 2 mm de espessura.

Estes dosímetros foram previamente embalados aos pares, em plástico, segundo BOSCOLO e cols<sup>(06)</sup>.

Após os dosímetros serem sensibilizados, foram removidos da embalagem e levados, um de cada vez, para o aparelho de leitura da energia neles acumulada.

Tal leitura foi feita em um conjunto de aparelhos fabricado pela firma "The Harschaw Chemical Company", composto por um "Thermoluminescence Detector", modelo 2000 A, e um "Automatic Integrating Picoameter", modelo 2000 B.

Na câmara de liberação de energia do "Thermoluminescence Detector", os dosímetros foram submetidos a uma temperatura até 270°C. A energia neles acumulada foi, então, liberada em forma de energia luminosa e integrada no "Automatic Integrating Picoameter", sendo quantificada.

Tais resultados foram levados a um gráfico, previamente estabelecido por nós, e convertidos em unidade de radiação (R = Roentgen) ou (Gy = R/100). A dose empregada foi em torno de 7,14 R.

O gráfico foi feito em função da energia efetiva e rendimento do aparelho de raios X utilizado na pesquisa e de acordo com a dosimetria estabelecida pelo Centro de Energia Biomédica da Universidade Estadual de Campinas (CEB).

#### 6- SACRIFÍCIO DOS ANIMAIS

Os animais foram todos sacrificados com inalação de clorofórmio nos 2º, 4º, 7º, 11º, 14º, 21º e 28º dias de desenvolvimento do tecido, com exceção do Grupo III que não teve animais nos 2º e 4º dias.

## 7- REMOÇÃO DO TECIDO DE GRANULAÇÃO

Sacrificados os animais, os tecidos de granulação foram retirados e rapidamente lavados em NaCl 0,9%, sendo o excesso de solução removido por compressão entre duas folhas de papel de filtro. A seguir, os tecidos foram pesados e colocados em recipientes rotulados, sobre papel de filtro embebido em NaCl 0,9%, dentro de um isopor contendo gelo moído, mantendo-se, desta forma, o tecido sob baixa temperatura até a sua manipulação.

## 8- EXTRAÇÃO ENZIMÁTICA

Na extração das enzimas do tecido de granulação foi utilizada uma solução tampão contendo Tris-HCl 0,1 M, Mercaptoetanol 1 mM, EDTA 1 mM de pH 7,4. (SASSAKI & NICOLAU)<sup>(37)</sup>

Para cada 100 mg de peso do tecido foi acrescentado 1,0 ml de tampão de extração e feita homogeneização tipo Potter-Elvehgen, utilizando homogeneizador de tecido Marconi, modelo TE 099.

Após a homogeneização, o extrato foi centrifugado a 11000 X g por 2 minutos, utilizando-se centrífuga Incibrás modelo SPIN I.

## 9- DETERMINAÇÃO ENZIMÁTICA

O sobrenadante dos extratos foi utilizado para determinar as atividades das enzimas fosfatase alcalina, 5' nucleotídeo fosfodiesterase e ATPase.

### 9.1- FOSFATASE ALCALINA

Para determinação da atividade da fosfatase alcalina foi utilizado a solução contendo p-nitrofenilfosfato 1mM como substrato e tampão tris-HCl 0,1 M e pH 9,0 (KELLY & BUTLER)<sup>(16)</sup>. Para cada 0,10 ml de extrato foi acrescentado 2,80 ml de solução de substrato e incubado a 30°C. Após 30 minutos, foi acrescentado 0,10 ml de NaDH 1N e feita a leitura no espectrofotômetro digital da Micronal, modelo B34211, medindo-se as absorbâncias a 400 nm.

Foi estipulado para a Fosfatase Alcalina que uma unidade de atividade enzimática é a quantidade de enzima capaz de liberar 1 umol de produto por minuto, a uma temperatura de 30°C.

A atividade específica foi expressa em unidade de enzima por mg de proteína. A medição da quantidade de proteína dos extratos foi feita contra padrão de proteína de 100 ug/ml, através do método de LOWRY e cols.<sup>(22)</sup>.

### 9.2- 5' NUCLEOTÍDEO FOSFODIESTERASE

Na determinação da atividade da 5' nucleotídeo

fosfodiesterase, utilizamos uma solução contendo p-nitrofenilfenilfosfonato 1 mM como substrato em tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 8,0. (KELLY e cols.<sup>(17)</sup>).

Para cada 0,10 ml de extrato foi acrescentado 2,80 ml de solução de substrato e incubado a 30°C. Após 30 minutos, foi acrescentado 0,10 ml de NaOH 2N e feita a leitura no espectrofotômetro, medindo as absorvâncias a 400 nm.

Foi estipulado para a Fosfodiesterase que uma unidade de atividade enzimática é a quantidade de enzima capaz de liberar 1 umol de produto por minuto, a uma temperatura de 30°C.

A atividade específica também foi expressa em unidade de enzima por mg de proteína da mesma forma como já citado acima no item 9.1.

### 9.3- ADENOSINA TRIFOSFATASE (ATPase)

A atividade da ATPase foi determinada com a seguinte solução contendo: ATP (trifosfato de adenosina) 2,0 mM como substrato, tampão Tris-HCl 0,0063 M, MgCl<sub>2</sub> 5 mM e pH 7,4. (SEIDEL & GERGELY)<sup>(38)</sup>.

Para cada 0,10 ml de extrato foi acrescentado 1,90 ml de solução de substrato e incubado a 30°C, por 15 minutos. Depois acrescentou-se 2,0 ml de ácido tricloroacético (TCA) 15% e centrifugou-se a 2000 X g por 5 minutos. Do sobrenadante foi feita a dosagem de fósforo liberado de acordo com o método de FISKE & SUBBAROW<sup>(11)</sup>.

Para a ATPase foi estipulado que a unidade de atividade enzimática é a quantidade de enzima capaz de liberar 1  $\mu$ g de fósforo por minuto, a uma temperatura de 30°C.

A atividade específica da ATPase foi expressa da mesma forma que as outras enzimas, em unidade de enzima por mg de proteína, como já citado no item 9.1.

#### 10- ANÁLISE ESTATÍSTICA

As atividades das enzimas Fosfatase Alcalina, 5' Nucleotídeo Fosfodiesterase e ATPase foram consideradas isoladamente. As observações de cada enzima foram agrupadas segundo tempo e grupo, e então foram calculadas suas médias para compará-las.

Através da análise de variância<sup>(46)</sup>, observou-se diferença significativa entre tempos e na interação entre grupos. Utilizou-se, então, o Teste de Tukey<sup>(46)</sup> para comparar as médias de tempo dentro do grupo e grupo dentro do tempo.

5 - RESULTADOS

## 5 - RESULTADOS

Os dados da atividade enzimática da fosfatase alcalina, 5'nucleotídeo fosfodiesterase e adenosina trifosfatase estão nas tabelas 1, 2 e 3:

TABELA 1 - Atividade enzimática da Fosfatase Alcalina, segundo Tempo e Grupo.

TEMPO							
GRUPO	2	4	7	11	14	21	28
I	0,80	0,69	0,48	0,90	0,95	0,42	--
	1,17	0,72	0,66	--	0,95	0,52	0,41
	0,48	0,72	0,47	0,65	0,90	0,59	0,62
	0,55	--	0,36	0,80	0,72	0,51	--
	0,63	0,64	--	0,88	0,67	0,50	0,68
	0,52	0,89	--	--	0,50	0,48	0,30
II	0,73	--	0,57	0,70	0,92	0,57	0,25
	0,66	0,85	0,66	0,75	1,00	0,40	0,49
	0,62	0,90	0,73	0,86	1,08	0,69	0,33
	0,80	--	0,58	0,74	1,00	0,76	0,50
	0,54	0,76	--	0,42	1,17	0,52	0,41
	0,51	0,73	0,57	0,81	0,91	0,56	0,50
III			0,69	1,00	0,84	0,46	0,37
			0,50	0,80	0,63	0,60	0,17
			--	0,72	0,61	0,46	0,63
			0,76	0,65	0,72	0,52	--
			0,52	0,81	0,67	0,44	0,27
			0,97	0,91	0,50	0,49	0,50

TABELA 2 - Atividade enzimática da 5' nucleotídeo fosfodiesterase, segundo Tempo e Grupo.

GRUPO	TEMPO	2	4	7	11	14	21	28
I		0,44	0,38	0,60	0,45	0,43	0,28	0,37
		0,82	0,36	0,57	0,73	0,50	0,56	0,63
		0,27	0,49	0,41	0,62	0,47	--	0,32
		0,59	0,47	0,59	0,68	0,70	0,33	0,42
		0,51	0,60	--	0,46	0,64	0,62	0,15
		0,39	0,70	0,32	0,51	0,80	0,59	0,59
II		0,25	0,32	0,76	0,59	0,58	0,55	0,35
		0,33	0,40	0,86	0,37	0,65	0,51	0,70
		0,32	0,29	0,87	0,87	0,64	0,45	0,49
		0,52	0,28	0,76	0,54	0,57	0,31	0,50
		0,59	0,38	0,53	0,79	0,69	0,46	0,48
		0,40	0,40	0,46	0,55	0,68	0,35	0,82
III				0,84	0,50	1,08	0,40	0,50
				0,69	0,60	1,22	0,35	0,39
				0,68	0,59	0,70	0,32	0,64
				0,83	0,52	0,47	0,54	0,23
				0,55	0,64	--	0,20	0,50
			0,53	0,33	0,60	0,30	0,71	

TABELA 3 - Atividade enzimática da ATPase, segundo Tempo e Grupo.

GRUPO	TEMPO	2	4	7	11	14	21	28
I		0,73	0,83	2,68	3,29	7,04	4,19	6,30
		1,78	--	--	--	10,65	4,18	--
		0,89	0,64	3,64	5,69	8,34	5,11	8,24
		0,71	1,41	2,55	6,22	10,29	4,17	6,96
		1,41	0,95	2,70	5,79	8,37	6,31	7,36
		1,27	1,16	3,40	4,61	9,80	4,99	6,27
II		0,61	1,09	2,90	4,40	9,42	5,10	6,96
		1,14	2,09	2,35	4,59	7,86	4,92	8,95
		1,08	1,55	3,24	4,86	9,10	4,52	6,90
		1,01	2,09	--	4,30	8,61	4,84	4,50
		1,29	2,07	3,36	4,69	12,32	4,38	6,66
		--	1,69	2,21	3,93	7,06	4,37	6,60
III				3,77	6,28	12,88	4,44	7,04
				3,10	4,17	11,48	5,61	5,71
				2,72	7,11	9,42	4,99	6,28
				5,13	5,40	9,64	4,49	6,74
				--	4,38	7,17	4,15	6,14
				4,00	--	8,55	4,16	7,50

Primeiramente, foi feita uma análise de variância e um teste de Tukey por grupo, para comparar as atividades das enzimas nos tempos estudados. A análise demonstrou não haver diferença significativa entre o segundo e o quarto dia. Frente a este resultado, passamos a analisar os dados a partir do 7º dia, cujas análises encontram-se nas tabelas 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 e 12.

TABELA 4 - Fosfatase Alcalina - GRUPO I  
Análise de variância inteiramente ao acaso

CV	GL	SQ	QM	F
TRATAMENTO	6	0,559675	0,093279	3,548563
RESÍDUO	28	0,736022	0,026286	
TOTAL	34	1,295697		

TABELA 5 - Fosfatase Alcalina - GRUPO II  
Análise de variância inteiramente ao acaso

CV	GL	SQ	QM	F
TRATAMENTO	6	1,248531	0,208089	16,500768
RESÍDUO	32	0,403547	0,012611	
TOTAL	38	1,652078		

TABELA 6 - Fosfatase Alcalina - GRUPO III  
Análise de variância inteiramente ao acaso

CV	GL	SQ	QM	F
TRATAMENTO	4	0,623753	0,155938	8,093498
RESÍDUO	23	0,443144	0,019267	
TOTAL	27	1,066897		

TABELA 7 - 5' Nucleotídeo Fosfodiesterase - GRUPO I  
Análise de variância inteiramente ao acaso

CV	GL	SQ	QM	F
TRATAMENTO	6	0,127143	0,021190	0,916233
RESÍDUO	33	0,763217	0,023128	
TOTAL	39	0,890359		

TABELA 8 - 5' Nucleotídeo Fosfodiesterase - GRUPO II  
Análise de variância inteiramente ao acaso

CV	GL	SQ	QM	F
TRATAMENTO	6	0,659024	0,109837	6,254805
RESÍDUO	35	0,614617	0,017560	
TOTAL	41	1,273641		

TABELA 9 - 5' Nucleotídeo Fosfodiesterase - GRUPO III  
Análise de variância inteiramente ao acaso

CV	GL	SQ	QM	F
TRATAMENTO	4	0,708491	0,177123	5,487311
RESÍDUO	24	0,774687	0,032279	
TOTAL	28	1,483178		

TABELA 10 - ATPase - GRUPO I  
Análise de variância inteiramente ao acaso

CV	GL	SQ	QM	F
TRATAMENTO	6	301,143212	50,190535	65,547138
RESÍDUO	31	23,737216	0,765717	
TOTAL	37	324,880428		

TABELA 11 - ATPase - GRUPO II  
Análise de variância inteiramente ao acaso

CV	GL	SQ	QM	F
TRATAMENTO	6	275,287571	45,881262	51,240168
RESÍDUO	33	29,548725	0,895416	
TOTAL	39	304,836296		

TABELA 12 - ATPase - GRUPO III  
Análise de variância inteiramente ao acaso

CV	GL	SQ	QM	F
TRATAMENTO	4	128,434459	32,108615	21,506837
RESÍDUO	23	34,337831	1,492949	
TOTAL	27	162,772291		

Em seguida, agrupou-se os dados dos três grupos numa única análise de variância. Os resultados para FA, FD e ATPase estão, respectivamente, nas tabelas 13, 14 e 15

TABELA 13 - Fosfatase Alcalina  
Análise de variância em blocos ao acaso

CV	GL	SQ	QM	F
TEMPOS	4	1,929762	0,482441	28,21*
GRUPO	2	0,062294	0,031147	1,82*
INTERAÇÃO	8	0,549857	0,068732	4,02*
RESÍDUO	66	1,128616	0,017100	
TOTAL	80	3,670529		

TABELA 14 - 5' Nucleotídeo Fosfodiesterase  
Análise de variância em blocos ao acaso

CV	GL	SQ	QM	F
TEMPOS	4	0,785989	0,196497	7,91*
GRUPO	2	0,109519	0,054760	2,20
INTERAÇÃO	8	0,352261	0,044033	1,77
RESÍDUO	72	1,788953	0,02484657	
TOTAL	86	3,036722		

TABELA 15 - ATPase  
Análise de variância em blocos ao acaso

CV	GL	SQ	QM	F
TEMPOS	4	397,565942	99,391486	80,41*
GRUPO	2	3,725234	1,862617	1,51
INTERAÇÃO	8	5,547684	0,693461	0,56
RESÍDUO	69	85,283903	1,235998	
TOTAL	83	492,122764		

Estas tabelas mostram diferença significativa entre tempos e na interação entre grupos. Compararam-se, então, as médias de tempo dentro do grupo e grupo dentro do tempo através do teste Tukey, onde as d.m.s. para a fosfatase alcalina, 5'nucleotídeo fosfodiesterase e adenosina trifosfatase são, respectivamente, 0,212; 0,256 e 1,81, que observamos nas tabelas 16, 17 e 18, a seguir:

TABELA 16 - Médias de atividade da Fosfatase Alcalina

GRUPO	TEMPO				
	07	11	14	21	28
I	0,493	0,808	0,782	0,505	0,503
II	0,622	0,713	1,013	0,583	0,413
III	0,688	0,815	0,662	0,495	0,388

Quando comparamos os tempos dentro de cada grupo, observamos que no grupo I as atividades da enzima fosfatase alcalina nos dias 11 e 14 são maiores que nos outros dias. No grupo II, o pico da atividade foi no 14º dia, seguido pelos dias 11, 07 e 21. O 28º mostrou atividade mais baixa. No grupo III, a atividade foi maior nos dias 11, 07 e 14, e mais baixas nos dias 21 e 28. Quando comparamos os grupos dentro de cada tempo, podemos observar que no 14º dia o grupo II mostrou atividade enzimática significativamente maior que o grupo I e III. Nos demais dias não houve diferença significativa entre os grupos.

TABELA 17 - Médias da atividade da 5' Nucleotídeo Fosfodiesterase

GRUPO	TEMPO				
	07	11	14	21	28
I	0,498	0,575	0,590	0,476	0,413
II	0,707	0,618	0,635	0,438	0,557
III	0,687	0,530	0,814	0,352	0,495

Quando analisamos tempos dentro de cada grupo para atividade da 5' nucleotídeo fosfodiesterase, observamos que não há diferença significativa entre os dias no grupo I, porém, no grupo II, o 7º dia apresentou maior atividade e o 21º dia foi

de menor atividade, e no grupo III a atividade foi maior nos dias 14 e 07 e mais baixa nos dias 28 e 21. Não houve diferença significativa entre os 3 grupos quando analisamos os grupos dentro de cada dia.

TABELA 18 - Médias da atividade da ATPase

GRUPO	TEMPO 07	11	14	21	28
I	2,994	5,120	9,082	4,825	7,026
II	2,812	4,462	9,062	4,688	6,762
III	3,744	5,468	9,857	4,640	6,568

Analisando os tempos dentro de cada grupo para atividade da ATPase, podemos observar que, no grupo I, o 14º dia foi o pico da atividade enzimática, seguido pelos dias 28, 11 e 21, mostrando atividade mais baixa no 7º dia. No grupo II, o 14º dia também foi o de maior atividade enzimática, seguido pelo 28º dia e pelos dias 21, 11 e 07. No grupo III, o 14º dia apresentou maior atividade enzimática, seguido pelos dias 28, 11, 21 e 07. Analisando-se os grupos dentro de cada dia, podemos observar que não há diferença significativa entre os 3 grupos.

6 - DISCUSSÃO

## 6 - DISCUSSÃO

Considerando ser a síntese de colágeno e sua agregação sob a forma de feixes, dependente da atividade enzimática, e considerando ser possível haver um efeito da radiação na atividade das enzimas, e de acordo com os resultados por nós encontrados, temos que a enzima Fosfatase Alcalina apresentou-se com a atividade aumentada por volta do 14º dia, sendo que no grupo II, ou seja, no grupo que recebeu uma dose única de 7,14 R de radiação, essa atividade foi de 29,5% maior do que a atividade dessa enzima no mesmo período, no grupo controle. VIZIOLI<sup>(47)</sup>, em seu trabalho, também encontrou que a maior atividade da fosfatase alcalina foi ao redor de 15 a 20 dias, o que corrobora nossos achados, sendo que, no grupo submetido à radiação, a atividade dessa enzima foi aumentada, tendo sido esse aumento de atividade também encontrado por WACHSMUTH & TORHORST<sup>(48)</sup> e KAUR<sup>(15)</sup>. Porém, estes dois autores estudaram esta enzima em intestino de ratos e com doses muito superiores as por nós utilizadas, tendo o primeiro autor utilizado uma dose de 1200 R de raios X e o segundo uma dose de 400 R de raios gama de Co60, onde observaram um aumento da fosfatase alcalina 24 horas após a radiação. KAUR<sup>(15)</sup> observou, ainda, que no 9º dia após a radiação havia uma diminuição da fosfatase alcalina em relação ao controle.

Podemos considerar ainda que, no grupo III, que recebeu o mesmo montante de radiação, porém dividido, a enzima fosfatase

alcalina esteve com sua máxima atividade no 11º dia, contudo menor do que no grupo II e praticamente igual à atividade dessa enzima no grupo controle. Ainda que seja sabido que doses fracionadas podem aumentar os efeitos sobre tecidos vivos, não foi o que encontramos em nosso trabalho, embora possamos levar em consideração o fato de que utilizamos doses bastante pequenas. Poderíamos levantar a hipótese de ser o espaço de tempo utilizado entre as irradiações um tempo suficiente para uma recuperação. Por outro lado, MOORE<sup>(25)</sup>, em seu trabalho, cita ser o efeito de uma única dose mais prejudicial do que o de doses fracionadas.

Ainda com respeito à dose, autores como BHATAVDEKAR e cols.<sup>(04)</sup>, que utilizaram 120 R de raios X, KRIZALA e cols.<sup>(19)</sup>, 3.0 Gy de radiação gama, obtiveram em seus trabalhos uma diminuição da fosfatase alcalina. Se compararmos com os nossos resultados, as doses desses autores foram superiores às por nós utilizadas, e como é sabido, os efeitos biológicos causados pela radiação são dependentes da dose empregada, como também do tipo de radiação.

A enzima 5' nucleotídeo fosfodiesterase apresentou, no grupo II, atividade significativamente maior no 7º dia e menor no 21º dia. No grupo III, a atividade foi significativamente maior nos dias 14 e 07 e mais baixa nos dias 28 e 21. Isto foi diferente do que ocorreu com o grupo controle, pois, neste, não houve diferença significativa entre os dias. Apesar de não ter havido uma diferença significativa entre os três grupos, podemos notar que nos dias 07 e 14, onde houve maior atividade enzimática nos grupos II e III, essa atividade se encontrou percentualmente

maior do que no grupo controle, da ordem de 42% no 7º dia e 38% no 14º dia. Embora não haja diferença estatística significativa, o percentual de atividade dessa enzima em relação ao controle pode ser considerado alto, porém seria bom considerar também que, tendo em vista as condições apresentadas para o desenvolvimento do trabalho, não foi possível utilizar uma amostra maior, fato este que nos possibilitaria ter uma melhor visão dos resultados. CATRAVAS e cols.<sup>(47)</sup> encontraram uma diminuição da afinidade da 5' nucleotidase para seu substrato em pulmão de coelhos expostos a 30 Gy de raios X produzidos por um acelerador linear. Considerando que, em nosso trabalho, a enzima estudada foi a 5' nucleotídeo fosfodiesterase e, sendo ela também uma enzima que atua na ligação glucídio fosfato em posição 5' e que está relacionada com a síntese de ácidos nucleicos e consequente aumento do giro dos nucleotídeos através do reaproveitamento das bases nitrogenadas, os resultados foram diferentes dos encontrados por esses autores. Porém, essa diferença nos resultados pode ser devido ao uso de menor dose de radiação empregada em nossa pesquisa, como também foi diferente o animal, local e tipo de tecido de onde a enzima foi extraída.

A atividade enzimática da adenosina trifosfatase foi semelhante nos três grupos estudados: começou baixa no 7º dia, atingiu seu pico no 14º dia e baixou significativamente no 21º dia. Isto está de acordo com VIZIOLI<sup>(47)</sup>, onde a atividade intracelular e nas paredes vasculares aumenta em concordância com as necessidades energéticas do tecido, atingindo o máximo aos 15 dias de desenvolvimento, caindo após 20 dias, seguindo o ritmo da

síntese proteica e de carboidratos do tecido. Os nossos resultados são concordantes com os de PALVA<sup>(27)</sup>, quando diz que 1500 R de raios X não afetam primariamente a atividade da ATPase no epitélio de olhos de ratos; porém, são discordantes dos de YUKAWA & NAKAZAWA<sup>(50)</sup> que estudaram o efeito de 200 e 400 R de raios X na atividade da ATPase no fígado de ratos em estágio de aleitamento, onde observaram um aumento da atividade. MATSUDA e cols.<sup>(23)</sup> também encontraram resultados diferentes dos nossos, quando mediram a atividade da ATPase nos olhos de coelhos expostos a uma única dose de 2000 rads de raios X e observaram uma diminuição da atividade enzimática nas 3<sup>a</sup> e 4<sup>a</sup> semanas após a radiação. Nas 7<sup>a</sup> e 5<sup>a</sup> semanas após a irradiação, esta atividade se tornou aumentada.

Talvez esta discordância nos resultados esteja nas diferentes condições em que foi estudada a atividade desta enzima; diferença nos animais, tipo de tecido onde a enzima foi estudada, tipo de extração, além de diferentes doses de radiação empregada, que foram pelo menos 28 vezes maiores do que a nossa e, ainda, diferentes tempos em que as enzimas foram extraídas.

Autores como MAXIMOW<sup>(24)</sup>, POHLE e cols.<sup>(29,31)</sup>, RITCHIE<sup>(36)</sup>, POHLE & RITCHIE<sup>(30)</sup>, NATHANSON<sup>(26)</sup>, GRILLO<sup>(13)</sup>, POWERS e cols.<sup>(32)</sup>, RAVELLI e cols.<sup>(34)</sup> e ABDALLA e cols.<sup>(61)</sup> estudaram histologicamente e/ou macroscopicamente o efeito das radiações X sobre o tecido de reparo e observaram um atraso nesse processo, com exceção de NATHANSON<sup>(26)</sup> que, com baixas doses, encontrou uma aceleração no processo de reparo e também de POHLE e cols.<sup>(31)</sup>, que não

encontraram diferença no tempo de cura entre as porções irradiadas e não irradiadas e que consideraram a leve diferença no processo de cura da porção irradiada com pequenas doses, ser devida a uma redução na quantidade de exsudato, que mostrou uma diminuição da quantidade de fibrina a ser recolocada pelo tecido cicatricial.

Já autores como DOBBS<sup>(89)</sup>, LAWRENCE e cols.<sup>(21)</sup> e BLYTHE e cols.<sup>(85)</sup> avaliaram a força de tensão do tecido de reparo submetido a irradiação, onde DOBBS<sup>(89)</sup> constatou, com uma dose de 300 R, haver um aumento da tensão, e com 1020 e 1800 R, uma diminuição dessa força. LAWRENCE e cols.<sup>(21)</sup> constataram um atraso na cura da ferida com 2500 R, e BLYTHE e cols.<sup>(85)</sup> observaram que havia, com 1000 R de raios X, um enfraquecimento da força de tensão.

Também foram feitos estudos sobre o efeito da radiação nos componentes do tecido de reparo. Autores como KITAGAWA e cols.<sup>(18)</sup>, ARCHER e cols.<sup>(82)</sup>, RICKERT & FORBES<sup>(35)</sup>, SVOJTKOVA e cols.<sup>(41,42)</sup>, THYAGARAJAN e cols.<sup>(43)</sup>, LAW e cols.<sup>(20)</sup>, DE LOECKER e cols.<sup>(86)</sup>, SKOUGAARD & CARSTEN<sup>(39)</sup>, WARD e cols.<sup>(49)</sup>, GRANT e cols.<sup>(12)</sup> e RANTANEN<sup>(33)</sup> estudaram o efeito da irradiação sobre o colágeno.

Observaram diferentes efeitos, como alteração no seu conteúdo e solubilidade e redução na capacidade de hidroxilação da prolina pelos fibroblastos. Todos esses fatores são dependentes da dose e período no qual o colágeno foi irradiado.

RANTANEN<sup>(33)</sup> expôs o tecido de granulação à irradiação durante a fase de mobilização e migração celular (3º

dia após a implantação), na fase de proliferação celular (7º dia) e na fase de síntese do colágeno (15º dia), e observou diferentes alterações no colágeno nestas fases. No tecido de granulação irradiado no 3º dia, constatou uma diminuição no conteúdo e aumento na solubilidade do colágeno, explicando ser devido a um atraso da proliferação celular induzido pela radiação que também atrasou, temporariamente, a produção e maturação do colágeno. Porém, a solubilidade não diferiu do tecido controle no granuloma completamente recuperado. No tecido exposto durante a fase proliferativa, as células que sintetizam o colágeno foram injuriadas pela irradiação, mas continuaram a produzi-lo, sofrendo um aumento do conteúdo total e insolubilização do colágeno. Durante a irradiação do tecido, a síntese de colágeno não excedeu àquela do tecido controle, fato que também comprovamos em nosso trabalho.

RANTANEN<sup>(33)</sup> também observou o efeito da radiação sobre as glicosaminoglicanas. Durante as primeiras fases de desenvolvimento do tecido controle normal, foi relativamente alta a fração de hexosaminas solúvel, o que foi atribuído ao vazamento de glicoproteínas plasmáticas após a implantação da esponja. Houve uma pequena resposta da hexosamina à irradiação; a mudança foi parcialmente devido à diminuição absoluta da fração solúvel e, parcialmente, a um acúmulo da fração insolúvel. A diminuição observada da hexosamina solúvel pode ser explicada pela reabsorção de glicosaminoglicanas induzida pela radiação, facilitada pelo colapso aumentado.

DROZDZ e cols.<sup>(10)</sup> observaram que uma dose de 500 R causava um aumento do total de glicosaminoglicanas, aumento este ocorrido antes que houvesse alterações no conteúdo de colágeno; porém, desconhecendo o mecanismo direto destas alterações. JOVANOVIĆ<sup>(14)</sup>, em uma revisão, diz que os mucopolissacarídeos são despolimerizados pelas radiações ionizantes, sendo este efeito instantâneo e que pode ser medido até mesmo durante a exposição, aparecendo mesmo em pequenas doses (1-2 R).

Considerando que VIZIOLI<sup>(47)</sup> relacionou a atividade das enzimas estudadas com o desenvolvimento do tecido de granulação, poderíamos levantar a hipótese de um mecanismo de ação da radiação sobre o desenvolvimento desse tecido. De acordo com os resultados encontrados em nosso trabalho, poderíamos sugerir que a alteração da atividade da fosfatase alcalina, causada pela radiação, de alguma forma interfere no processo de agregação do colágeno sob a forma de feixes, o que é realizado por meio das glicosaminoglicanas, talvez agindo na formação das cadeias de carboidratos necessárias ao processo.

Com relação a 5' nucleotídeo fosfodiesterase pudemos notar que houve uma alteração no comportamento desta enzima nos grupos irradiados. A sua atividade está relacionada à síntese dos ácidos nucleicos e conseqüente aumento do giro de nucleotídeos. Assim, poderíamos considerar que, de alguma forma, esta alteração enzimática poderia induzir a uma formação não satisfatória de colágeno e glicosaminoglicanas.

Porém, esse assunto nos parece ser bastante interessante e que demandaria maiores estudos das enzimas, as quais são as responsáveis direta ou indiretamente pela formação do colágeno, que é elemento importantíssimo no reparo de tecidos.

7 - CONCLUSÕES

## 7 - CONCLUSÕES

Baseando-nos na discussão dos resultados obtidos e, dentro das condições experimentais da presente pesquisa, podemos concluir que:

- 1) A radiação X, aplicada nas condições da presente pesquisa, produziu alteração na atividade das enzimas Fosfatase Alcalina e 5' Nucleotídeo Fosfodiesterase, retiradas de tecido de granulação induzido pela implantação de esponjas de PVC em ratos.
- 2) No tecido de granulação irradiado com uma única dose de radiação X (7,14 R), a enzima Fosfatase Alcalina mostrou uma maior atividade no 14º dia de evolução do tecido, em relação ao grupo controle e ao grupo que recebeu radiação de forma dividida.
- 3) A atividade da enzima 5' Nucleotídeo Fosfodiesterase, no tecido de granulação que serviu como controle, foi semelhante em todos os dias estudados, porém, no grupo irradiado com uma única dose, a enzima mostrou-se com maior atividade no 7º dia e menor no 21º dia.
- 4) A atividade da enzima 5' Nucleotídeo Fosfodiesterase no tecido de granulação que recebeu radiação de forma dividida foi mais

alta nos dias 14 e 07 e mais baixa nos dias 20 e 21.

- 5) A radiação X não causou alteração no comportamento da atividade da enzima Adenosina Trifosfatase (ATPase).

8 - RESUMO

## B - RESUMO

O presente trabalho teve a finalidade de pesquisar a atividade das enzimas Fosfatase Alcalina, 5' Nucleotídeo Fosfodiesterase e Adenosina Trifosfatase (ATPase) no tecido de granulação induzido por implantação de esponjas de policlorovinil (PVC) no tecido subcutâneo de ratos submetidos à baixas doses de raios X.

Cento e quatorze ratos Wistar foram divididos em 3 grupos: Grupo I, que serviu como controle; Grupo II, que recebeu 7,14 R de raios X de uma única vez, logo após a implantação da esponja; Grupo III, que recebeu os 7,14 R de forma dividida, logo após a implantação da esponja e nos 3º e 5º dias após o implante.

Os tecidos foram removidos e mediu-se a atividade das 3 enzimas nos dias 2, 4, 7, 11, 14, 21 e 28 de desenvolvimento do tecido. Observou-se, como resultado, que a enzima Fosfatase Alcalina no Grupo II mostrou maior atividade no 14º dia de evolução do tecido, em relação aos Grupos I e III.

A atividade da enzima 5' Nucleotídeo Fosfodiesterase no Grupo I foi semelhante em todos os dias estudados, porém, no Grupo II, a enzima mostrou-se com maior atividade no 7º dia e menor atividade no 21º. No Grupo III, a atividade foi mais alta nos dias 14 e 07 e mais baixa nos dias 28 e 21.

Não foi observado alteração no comportamento da atividade da enzima Adenosina Trifosfatase (ATPase), quando os 3 grupos foram comparados.

9 - SUMMARY

## 9 - SUMMARY

This paper was designed to investigate in the rat subcutaneous sponge-induced granulation tissue, under low doses of X-ray, the activity of Alkaline Phosphatase, 5'Nucleotide Phosphodiesterase and Adenosin Triphosphatase (ATPase) enzymes.

One hundred and fourteen Wistar rats were divided into 3 groups, as follows: Group I as control, Group II that received single 7,14 R X-ray irradiation immediately after sponge-implantation and Group III that received 7,14 R in split-dosis immediately after sponge-implantation at the 3<sup>rd</sup> and 5<sup>th</sup> days postoperatively.

Biopsies were taken after 2, 4, 7, 11, 14, 21 and 28 days and the activity of the three enzymes was determined.

The results have shown that in Group II Alkaline Phosphatase had higher activity in the 14<sup>th</sup> day of tissue evolution when compared to Groups I and III.

The 5'Nucleotide Phosphodiesterase activity in Group I was similar in all days checked, although in Group II the enzyme showed higher activity in 7<sup>th</sup> day and lower in 21<sup>st</sup>. In Group III the activity was higher after 14 and 07 days and lower after 28 and 21 days.

There was no observation of changing in Adenosin Triphosphatase (ATPase) activity when the three groups were compared.

10 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

## 10 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 01- ABDALLA, C.M. et al. - Estudo histológico da gênese e evolução do tecido de granulação sob efeitos de baixas doses de radiação X. *Rev.Odontol.USP*, v. 5, p.90-5, , 1991
- 02- ARCHER, R.R. et al. - Irradiation effect on wound healing in rats. *Radiat. Res.*, v. 41,: p.104-12, 1970.
- 03- BAILEY, A.J. - Effect of ionizing radiation on connective tissue components. *Int.Rev.Connect.Tiss. Res.*,v. 4, p. 233-81, 1968.
- 04- BHATAVDEKAR, J.M., CHINDY, N.J., SHAH, V.C. - A study on the levels of nucleic acids, protein and phosphatases in normal and X-irradiated guinea pigs. *Strahlentherapie*, v. 145, p.83-7, 1973.
- 05- BLYTHE, J.G., BUCHSBAUM, H.J., Allen, T.G. - The effect of delaying radiation on wound healing. *Gynecol. Oncol.*, v. 3. p.210-4, 1975.
- 06- BóSCOLO, F.N. - Contribuição ao estudo da variação de enzimas do globo ocular de cães. Emprego de baixas doses de radiação e dosimetria termoluminescente. Piracicaba, 1984. Tese (Livre Docência em Radiologia) - Faculdade de Odontologia - UNICAMP.

- 07- CATRAVAS, J.D. et al. - Early effects of ionizing radiation on pulmonary endothelial angiotensin-converting enzyme and 5'-nucleotidase, "in vivo". *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, v. 94, p. 342-55, 1988.
- 08- DE LOECKER, W. et al. - The effects of X-irradiation on collagen metabolism in rat skin. *Int.J.Radiat.Biol.*, v. 29, p. 351-8, 1976.
- 09- DOBBS, W.G.H. - A statistical study of the effect of roentgen rays on wound healing. *Am. J. Roentgenol. Rad. Ther.*, v. 41, p.625-32, 1939.
- 10- DRÓZDZ, M. et al. - Effect of irradiation on glycosemnoglycans content in rat tissue. *Arch. Immunol. Ther. Exper.*, v. 29, p.515-9, 1981.
- 11- FISKE, C.H. , SUBBAROW, Y. - The colorimetric determination of phosphorus. *J. Biol. Chem.*, v. 66, p.375-400, 1925.
- 12- GRANT, R.A., COX, R.W., KENT C.M. - The effects of gamma irradiation on the structure and reactivity of native and cross-linked collagen fibres. *J.Anat.*, v. 115, p.29-43, 1973.

- 13- GRILLO, H.C., POTSAID, M.S. - Studies in wound healing. IV. Retardation of contraction by local X-radiation, and observations relating to the origin of fibroblasts in repair. *Ann. Surg.*, v. 154, p.741-50, 1961.
- 14- JOVANDVIC, D. - The influence of radiation on blood vessels and circulation. Chapter V. noncellular factors. *Curr.Top. Radiat.Res.*, v. 10, p.75-84, 1974.
- 15- KAUR, A., DUBEY, D.P., GUPTA, G.S. - Radiation effects on alkaline phosphatase and glucose-6-phosphatase in anatomically different regions of mouse intestine. *Strahlentherapie*, v. 50, p. 427-32, 1975.
- 16- KELLY, S.J. , BUTLER, L.G. - Enzymic hydrolysis of phosphonate esters. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v. 66, p.316-21, 1975.
- 17- KELLY, S.J., DARDINGER, D.E., BUTLER, L.G. - Hydrolysis of phosphonate esters catalysed by 5'Nucleotide Phosphodiesterase. *Biochemistry*, v. 14, p. 4983-8, 1975.
- 18- KITAGAWA, T. et al. - Radiation effects on skin and subcutaneous tissue. A quantitative study of collagen content: modification with L-Triiodothyronine. *Radiat.Res.*, v. 15, p.761-6, 1961.

- 19- KRIZALA, J. et al. - Influence of radioprotective agents on the activities of isoenzymes of blood serum alkaline phosphatase in irradiated dogs. *Strahlentherapie*, v. 156, p.365-7, 1980.
- 20- LAW, M.P., HORNSEY, S., FIELD, S.B. - Collagen content of lungs of mice after x-ray irradiation. *Radiat.Res.*, v. 65, p.60-70, 1976.
- 21- LAWRENCE, W., NICKSON, J.J., WARSHAW, L.M. - Roentgen rays and wound healing: an experimental study. *Surgery*, v. 33, p.376-84, 1953.
- 22- LOWRY, O.H. et al. - Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* v. 193, p.265-75, 1951.
- 23- MATSUDA, H., GIBLIN, F.J., REDDY, V. N. - The effect of x-irradiation on Na-K-ATPase and cation distribution in rabbit lens. *Invest.Ophthalmol.Vis.Sci.*, v. 22, p.180-5, 1982.
- 24- MAXIMOW, A.A. - Studies on the changes produced by roentgen rays in inflamed connective tissue. *J. Exper. Med.*, v. 37, p.319-40, 1922.
- 25- MOORE, M.J. - The effect of radiation on connective tissue. *Otolaryngol. Clin. N. Am.*, v. 17, p.389-99, 1984.

- 26- NATHANSON, I.T. - The effect of the gamma-ray of radium on wound healing. *Surg. Gynecol. Obstet.*, v. 59, p.62-9, 1934.
- 27- PALVA, M. - The effect of X-irradiation on the sodium-potassium-activated adenosine typhosphatase (Na-K-ATPase) activity in epithelium of the rat lens: a histochemical and biochemical study. *Acta Ophthalmol*, v. 56, p.431-8, 1978.
- 28- PICKRELL, J.A. et al. - Radiation induced pulmonary fibrosis: study of changes in collagen constituents in different lung regions of beagle dogs after inhalation of beta-emiting radionuclides. *Radiat. Res.*, v. 74, p.363-77, 1978.
- 29- POHLE, F.A., RITCHIE, G., WRIGHT, C.S. - Studies of the effect of roentgen rays on the healing of wounds. I. Behavior of skin wounds in rats under pre-or post-operative irradiation. *Radiology*, v. 16, p.445-60, 1931.
- 30- POHLE, E.A. , RITCHIE, G. - Studies of the effect of roentgen rays on the healing of the wounds. II - Histological changes in skin wounds in rats following post-operative irradiation. *Radiology*, v. 20, p.102-8, 1933.

- 31- POHLE, E.A., RITCHIE, G., MOIR, W.W. - Studies of the effect of roentgen rays on healing of wounds. III- Histological changes in skin wounds in rats following post-operative irradiation with very small and moderate doses. *Radiology*, v. 52, p. 707-13, 1949.
- 32- POWERS, W.E., OGURA, J.H., PALMER, L.A. - Radiation therapy and wound healing delay. *Radiology*, v. 89, p.112-5, 1967.
- 33- RANTANEN, J. - Radiation injury of connective tissue. A biochemical investigation with experimental granuloma. *Acta Radiol.*, Suppl. 330, 1973.
- 34- RAVELI, D.B. et al. - Influência da radiação X na cronologia do processo de reparo em feridas de extração dental. Estudo histomorfológico em ratos. *Rev.Odontol.USP*, v. 4, p.119-25, 1990.
- 35- RICKERT, W.S. , FORBES, W.F. - Changes in collagen with age. V - Modification of mouse skin collagen by whole body X-irradiation. *Exp. Gerontol.*, v. 8, p:113-21, 1973.
- 36- RITCHIE, G. - Effect of roentgen irradiation on the healing of wounds. *Arch. Pathol.*, v. 16, p.839-51, 1933.

- 37- SASSAKI, K.T. , NICOLAU, J. - The effect of isoproterenol on some aspects of the anaerobic metabolism of carbohydrates in mouse submandibular gland. *Gen Pharmacol.*, v. 13, p.353-6, 1982.
- 38- SEIDEL, J.C. , GERGELY, J. - Studies on myofibrillar adenosine triphosphatase with calcium-free adenosine triphosphatase. I- The effect of ethylenediaminetetraacetate, calcium, magnesium, and adenosine triphosphate. *J. Biol. Chem.*, v. 238, p.3648-53, 1963.
- 39- SKOUGAARD, M.R. , CARSTEN, A.L. - Collagen metabolism in skin and periodontal ligament of rats: effect of aging and irradiation. *J.Dent.Res.*, v. 57, p.334-9, 1978.
- 40- SOBO, A.O., SKILLEN, A.W. - Effect of X-irradiation on some enzyme levels in rat small intestine. *J. Nat. Med.Assoc.*, v. 66, p.328-9, 1974.
- 41- SVOJTKOVÁ, E., DEYL, Z., ADAM, M. - Aging of connective tissue. Age dependency of collagen depolymerization by ionizing radiation. *Exp.Gerontol.*, v. 8, p.157-64, 1973.
- 42- SVOJTKOVÁ, E. et al. - Are the changes in collagen caused by chronical X-irradiation similar to aging? *Physiol. Bohemoslovaca*, v. 32, p.449-59, 1983.

- 43- THYAGARAJAN, P., VAKIL, U.K., SREENIVASAN, A. - Effects of whole-body X-irradiation on some aspects of collagen metabolism in the rat. *Radiat. Res.*, v. 66, p.576-86, 1976.
- 44- VAN DEN BRENK, H.A.S. et al. - Effects of X-radiation on growth and function of the repair blastema (granulation tissue) I. Wound contraction. *Int. J. Radiat. Biol.*, v. 25, p.1-19, 1974.
- 45- VAN DEN BRENK, H.A.S. et al. - Effects of X-radiation on growth and function of the repair blastema (granulation tissue). II. Measurements of angiogenesis in the Selye pouch in the rat. *Int.J.Radiat.Biol.*, v. 25, p.277-89, 1974.
- 46- VIEIRA, S. - Introdução à bioestatística. Rio de Janeiro: Ed. Campos, 1981. Cap. 14.
- 47- VIZIOLI, M.R. - Relação entre fosfomonoesterases e a síntese de colágeno e mucopolissacarídeos ácidos no tecido de granulação. Piraciaba, 1975. Tese (Livre Docência em Patologia)- Faculdade de Odontologia - UNICAMP.

- 48- WACHSMUTH, E.D. , TORHORST, A. - Biogenesis of brush border membranes: alkaline phosphatase and aminopeptidase and their possible precursor proteins after X-ray irradiation of small intestine of C3H mice. *Beitr.Pathol.Bd*, v. 151, p.234-47, 1974.
- 49- WARD, W.F., SHIH-HOELLWARTH, A., TUTTLE, R.D. - Collagen accumulation in irradiated rat lung: modification by D-Penicillamine. *Radiology*, v. 146, p.533-7, 1983.
- 50- YUKAWA, O. , NAKAZAWA, T. - Sites of X-irradiation-induced damage in the microsomal drug metabolizing enzyme system of rat liver during development. *Radiat. Res.*, v. 56, p.140-9, 1973.