

ROBERTO MARTINS LOURENÇO

CIRURGIÃO DENTISTA

**ESTUDO DA ATIVIDADE DAS FOSFOESTERASES
EM TECIDO DE GRANULAÇÃO SOB EFEITO DE
BAIXAS DOSES DE RADIAÇÃO DE ELÉTRONS**

Tese apresentada à Faculdade de
Odontologia de Piracicaba da
Universidade Estadual de Campinas,
para obtenção do título de DOUTOR
em Radiologia Odontológica.

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

PIRACICABA - SP

- 2000 -

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

22.07.34.21

ROBERTO MARTINS LOURENÇO
CIRURGIÃO DENTISTA

**ESTUDO DA ATIVIDADE DAS FOSFOESTERASES
EM TECIDO DE GRANULAÇÃO SOB EFEITO DE
BAIXAS DOSES DE RADIAÇÃO DE ELÉTRONS**

Tese apresentada à Faculdade de
Odontologia de Piracicaba da
Universidade Estadual de Campinas,
para obtenção do título de DOUTOR
em Radiologia Odontológica.

Orientador: Prof. Dr. Frab Norberto Bóscolo

Banca examinadora: Prof. Dr. Frab Norberto Bóscolo

Prof. Dr. Mário Roberto Vizioli

Prof. Dra. Solange Maria de Almeida

Prof. Dr. Cláudio Costa

Prof. Dr. Luís César de Moraes

Este exemplar foi devidamente corrigido,
de acordo com a Resolução CCPG-036/83
CPG, 04/05/2000

Assinatura do Orientador

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

PIRACICABA - SP

- 2000 -

CHAMADA:
UNICAMP
L933e
Ex
278/00
RECIBO R\$ 11,00
ATA 11-07-00
CPD

CM-00142751-0

Ficha Catalográfica

L933e Lourenço, Roberto Martins.
Estudo da atividade das fosfoesterases em tecido de granulação sob efeito de baixas doses de radiação de elétrons. / Roberto Martins Lourenço. —del s. — Piracicaba, SP : [s.n.], 2000.
95. : il.

Orientador : Prof. Dr. Frab Norberto Bóscolo.
Tese (Doutorado) — Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Radiação. 2. Elétrons. 3. Tecido de granulação. 4. Enzimas. 5. Fosfatase alcalina. 6. Efeitos biológicos. I. Bóscolo, Frab Norberto. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.

Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Piracicaba / UNICAMP.



FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Tese de DOUTORADO, em sessão pública realizada em 29 de Fevereiro de 2000, considerou o candidato ROBERTO MARTINS LOURENÇO aprovado.

1. Prof. Dr. FRAB NORBERTO BOSCOLO

2. Prof. Dr. CLAUDIO COSTA

3. Prof. Dr. LUIS CESAR DE MORAES

4. Prof. Dr. MARIO ROBERTO VIZIOLI

5. Profa. Dra. SOLANGE MARIA DE ALMEIDA

Dedico este trabalho

A

DEUS

pelo zelo que me foi oferecido em todos estes anos, em especial no desenvolvimento deste trabalho.

Dedico este trabalho

“Aos meus queridos pais Antônio e Encarnação, quando em vida, exemplos de extrema simplicidade e um legado de honestidade e trabalho, a quem devo tudo, que Deus os abençoe e os mantenha em seu cantinho especial.”

Dedico este trabalho:

“À minha querida esposa ***Ruth*** que tão brilhantemente suportou todo este fardo destes tempos de idas e vindas, mantendo-se à frente de nossa família como pai e mãe com tanta fibra, carinho e amor.”

“Aos meus queridos filhos ***Cristina, Antônio José e Roberta*** razão de todo este empenho, grande orgulho e estímulo em minha vida.”

Dedico este trabalho:

aos meus irmãos e cunhados:

(Adhemar e Rita *in memoriam*), Josepha e Rubens, Antônio e Eunice, Joffre e Denise, Edith e Roberto, Solange e Edson, Denise e Antônio, Milton e Edylene, Lenyr e Antônio, Celisa, Consuelo, juntamente com todos seus filhos.

aos meus sogros:

José Joffre e Anésia, meus pais vivos, minha admiração e respeito.

Aqueles cujo convívio foi mais intenso e aos que, mesmo mais distantes compartilharam momentos difíceis e alegres.

Agradeço especialmente:

Ao Prof. Dr. Frab Norberto Bóscolo

Pela amizade, compreensão e estímulo constante, durante todo desenvolvimento e orientação deste trabalho, meu respeito, admiração, reconhecimento e gratidão.

Agradeço ainda:

Ao Prof. Dr. **Mário Roberto Vizioli**

Pelo convívio amigável, compreensão e estímulo que dedica aos alunos da Pós Graduação, em especial a minha pessoa e pelas valiosas sugestões ofertadas no desenvolvimento deste trabalho, o meu eterno agradecimento.

Ao Prof. Dr. **Jaime Aparecido Cury**

Pelo acesoramento preciso dos aspectos bioquímicos e por gentilmente ceder o laboratório da Disciplina de Bioquímica sob sua responsabilidade, para a determinação das atividades enzimáticas estudadas nesta tese.

Ao Físico **José Renato de Oliveira Rocha**, do Centro de Engenharia Biomédica, pela grande colaboração na irradiação dos animais.

Ao CAISM - Centro de Assistência Integral e Saúde da Mulher - nas pessoas de seu Diretor, Dr. **Luiz Carlos Zeferino**; Diretor do Serviço de Radioterapia, Dr. **Márcio Oliveira Cunha**; Diretora da Divisão de Apoio Médico à Pesquisa, Dra. **Maria Salete Costa Gurgel**.

Meus sinceros agradecimentos:

À Prof^ª. Dra. **Solange Maria de Almeida**, da FOP-UNICAMP pela amizade e parceria em nossos trabalhos.

Aos Profs. Doutores: **Agenor Montebello Filho** e **Francisco Haiter Neto**, da FOP-UNICAMP pela amizade, aprendizado e troca de informações durante estes anos.

Às Amigas, Parceiras e Professoras Doutoradas: **Solange Aparecida Caldeira Monteiro** e **Márcia Regina Brunelli** pelo convívio amigável, incentivo e solidariedade.

Aos Funcionários da Disciplina de Radiologia da FOP-UNICAMP, **Waldeck Ribeiro** pelo zelo, atenção e paciência, **Raquel Quintana**, **Fernando Ribeiro**, **Giselda Gonçalves**; aos ex-Funcionários, **Sandra Regina**, **Marcos Rapetti**, **Rubens Marques**, pelos seus serviços, muito contribuíram para a execução deste trabalho.

Aos técnicos de laboratório da Disciplina de Bioquímica nas pessoas de **Waldomiro Vieira Filho** e **Marisa de Jesus Carlos Soares** por colaborarem na determinação das atividades enzimáticas estudadas no presente trabalho.

Agradecimentos:

À FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA DA UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS:

Nas pessoas do seu Diretor Prof. Dr. **Antônio Wilson Sallum** e ao Diretor Associado Prof. Dr. **Frab Norberto Bóscolo**.

À Comissão dos Cursos de Pós Graduação nas pessoas da Profa. Dra. **Altair Antoninha Del Bel Cury**, Coordenadora; Prof. Dr. **Pedro Luiz Rosalen**, Sub Coordenador; **Sônia Maria Lordello Arthur**, Secretária Geral; e **Érica Alessandra Pinho**, Secretária.

Aos responsáveis pelas disciplinas de: ***Farmacologia, Morfologia e Histologia*** por gentilmente cederem seus laboratórios que permitiram a execução de uma das partes práticas deste trabalho.

**AGRADECIMENTOS À ESCOLA DE FARMÁCIA E ODONTOLOGIA
DE ALFENAS (E.F.O.A.), INSTITUIÇÃO FEDERAL DE ENSINO
SUPERIOR, NAS PESSOAS DE SEUS DIRIGENTES, DOCENTES E
FUNCIONÁRIOS:**

Agradeço Especialmente:

À ex-Presidente da Comissão Permanente de Pessoal Docente Profa. Dra. **Celisa de Moura Leite** pela condução dos trabalhos à frente desta comissão, possibilitando minha liberação para cursar Pós-Graduação.

Ao Diretor Prof. **João Batista Magalhães**, Vice-Diretor Prof. **Maciro Manoel Pereira** e Chefe do Departamento de Clínica e Cirurgia Prof. **Hélio Milício de Souza** que cooperaram na liberação de meus afazeres em nossa Instituição, possibilitando a conclusão deste trabalho.

Agradeço ainda:

Aos Amigos e Colegas Professores: **Pedro Rehder Filho, Carlos Antônio de Silva, Marcelo Taveira Barbosa e Maria Cândida Silveira Ferreira Afonso** pelo constante estímulo e solidariedade.

À Pró-Diretoria de Pós-Graduação e Pesquisa nas pessoas do Prof. Dr. **José Renan Vieira da Costa**; Secretária, **Marylúcia Prado dos Reis Soares** e ex-secretário, **Sebastião Meira**.

À **CAPES-PICDT** pela concessão da bolsa de estudos que permitiu a execução deste trabalho.

Às Bibliotecárias nas pessoas de **Márcia Aparecida D. Carvalhaes**, **Helena Vilela**, **Cecília Maria Rodrigues Freitas** e **Fátima dos Reis Goiatá** pelo empenho na localização e requisição de alguns artigos integrantes das referências bibliográficas.

Meu profundo agradecimento:

Aos Funcionários da Clínica de Radiologia nas pessoas de **Wilma Barbosa Bruno** e **Lucas Souza** pelo empenho em mantê-la sempre operante durante a minha ausência mesmo diante dos percalços, o que possibilitou o término deste trabalho, o meu muito obrigado, de coração.

SUMÁRIO

LISTA DE ILUSTRAÇÕES.....	14
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	19
RESUMO	22
ABSTRACT	25
1 - INTRODUÇÃO	28
2 - REVISÃO DA LITERATURA	32
3 - PROPOSIÇÃO	50
4 - MATERIAL E MÉTODOS.....	52
5 - RESULTADOS.....	65
6 - DISCUSSÃO	79
7 - CONCLUSÕES	86
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	89

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1 - Dorso do animal com a tricotomia efetuada e a demarcação onde se encontra posicionada, sob a pele, a esponja de PVC; observa-se, também, a incisão por onde foi divulgionado o tecido até a demarcação. 59
- Figura 2 - Animal posicionado no momento da irradiação. 60

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 3	- Tecido rebatido, expondo a esponja e o tecido de granulação, no momento da remoção da peça.	61
Figura 4	- Recipiente com gelo; contendo dois frascos de Becker com soro fisiológico e a placa de Petri com papel de filtro, embebido também em soro fisiológico, contendo as peças removidas.	61
Tabela 1	- Atividade específica da enzima ATPase, segundo o grupo e o número de dias decorridos após a implantação da esponja, no momento do sacrifício.	67
Tabela 2	- Análise de variância para os dados apresentados na (TAB. 1).	68
Tabela 3	- Médias da atividade específica da enzima ATPase, segundo o número de dias decorridos após a implantação da esponja, no momento do sacrifício.	69
Tabela 4	- Médias da atividade específica da enzima ATPase, segundo o grupo e o número de dias decorridos após a implantação da esponja, no momento do sacrifício.	70
Gráfico 1	- Médias da atividade específica da enzima ATPase, segundo o grupo e o número de dias decorridos após a implantação da esponja, no momento do sacrifício.	70
Tabela 5	- Atividade específica da enzima fosfatase alcalina, segundo o grupo e o número de dias decorridos após a implantação da esponja, no momento do sacrifício.	71

Tabela 6	- Análise de variância para os dados apresentados na (TAB. 5).	72
Tabela 7	- Médias da atividade específica da enzima fosfatase alcalina, segundo o número de dias decorridos após a implantação da esponja, no momento do sacrifício.	73
Tabela 8	- Médias da atividade específica da enzima fosfatase alcalina, segundo o grupo e o número de dias decorridos após a implantação da esponja, no momento do sacrifício.	74
Gráfico 2	- Médias da atividade específica da enzima fosfatase alcalina, segundo o grupo e o número de dias decorridos após a implantação da esponja, no momento do sacrifício.	74
Tabela 9	- Atividade específica da enzima 5' nucleotídeo fosfodiesterase, segundo o grupo e o número de dias decorridos após a implantação da esponja, no momento do sacrifício.	75
Tabela 10	- Análise de variância para os dados apresentados na (TAB. 9).	76
Tabela 11	- Médias da atividade específica da enzima 5' nucleotídeo fosfodiesterase, segundo o número de dias decorridos após a implantação da esponja, no momento do sacrifício.	76
Tabela 12	- Médias da atividade específica da enzima 5' nucleotídeo fosfodiesterase, segundo o grupo e o número de dias decorridos após a implantação da esponja, no momento do sacrifício.	77

Gráfico 3 - Médias da atividade específica da enzima 5' nucleotídeo fosfodiesterase, segundo o grupo e o número de dias decorridos após a implantação da esponja, no momento do sacrifício.

78

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATPase	-	adenosina trifosfatase
brush border	-	células filamentosas
°C	-	graus Celsius
cm	-	centímetro
DNA	-	ácido desoxirribonucleico
<i>et al.</i>	-	e outros ("et alii")
Gy	-	Gray
kg	-	quilograma

LISTA DE ABREVIATURAS SIGLAS

kVp	-	quilovoltagem/pico
m	-	metro
M	-	molar
mA	-	miliamperagem
MeV	-	milhão de elétron volt
mg	-	miligrama
ml	-	mililitro
mm	-	milímetro
mM	-	milimolar
mmHg	-	milímetros de mercúrio
N	-	normal
nm	-	nanómetro
pH	-	potencial hidrogeniônico
PVC	-	polivinil
rad	-	radiation absorbed dose
R	-	Roentgen
µg	-	micrograma
µg/ml	-	micrograma por mililitro
µmol	-	micromol
vilo	-	vilosidade intestinal

RESUMO

RESUMO

RESUMO

RESUMO

Neste trabalho tivemos por finalidade pesquisar o efeito de baixas doses de radiação de elétrons na atividade das fosfoesterases no tecido de granulação, grupo enzimático este que tem um papel preponderante na nova formação do tecido. Para tanto, os animais sofreram um procedimento cirúrgico, sendo efetuada a inserção subcutânea do disco de esponja de PVC, possuindo 8 mm. de diâmetro por 4 mm. de espessura a uma distância de 3cm da incisão. Esse procedimento foi repetido em 84 animais, os quais foram divididos em dois grupos experimentais, sendo um **irradiado**, outro **controle**, contendo, cada grupo, 42

animais. Por sua vez, cada grupo teve seus animais distribuídos segundo 7 tempos de evolução do tecido de granulação: 5, 7, 10, 14, 17, 20 e 24 dias, sendo cada tempo composto de 6 animais. Para a irradiação foi utilizado um acelerador linear, com um feixe de elétrons com energia de 6 MeV, a uma distância de 100 cm. (fonte até esponja) com dose simples de 1,0 Gy a 1 cm. de profundidade. A irradiação foi realizada 3 dias após a implantação da esponja sendo os seus corpos protegidos por 4 mm de chumbo com uma abertura permitindo a exposição da área correspondente a 5 mm de diâmetro maior do que o diâmetro da esponja. Decorrido o tempo proposto para o estudo, foram removidos os tecidos formados e mediu-se a atividade específica de 3 enzimas:

- A **Adenosina Trifosfatase (ATPase)**, nos tecidos irradiados, mostrou, quando comparada ao controle, menor atividade, aos 17 dias após a irradiação.
- A **Fosfatase Alcalina** apresentou, aos 11, dias uma maior atividade no grupo irradiado, decaindo dos 14 aos 21, dias porém não significante quando comparada ao grupo controle.
- A **5'Nucleotídeo Fosfodiesterase** apresentou maior atividade nos animais irradiados dos 2 aos 11 dias, sendo que, aos 2 dias, houve diferença significativa em relação ao grupo controle de mesmo tempo. Aos 14 dias houve queda de atividade estatisticamente significativa em relação ao grupo não irradiado, seguida de novo aumento de atividade dos 17 aos 21 dias nos animais do grupo irradiado, com diferença estatisticamente significativa aos 21 dias, quando comparada ao grupo controle.

Palavras chave: Radiação, Elétrons, Tecido de Granulação, Enzimas, Fosfatase Alcalina, Efeitos Biológicos.

ABSTRACT

ABSTRACT

ABSTRACT

This work had the purpose to seek the effect of low doses of electron radiation on the activity of phosphoesterases in granulation tissue, as this enzymatic group has a major role in the new tissue formation. With that purpose, the animals underwent surgical procedure, receiving a subcutaneous insertion of a disc of PVC foam, averaging 8 millimeters diameter and 4 millimeters thick, at a distance of 3 centimeters away from the incision. This procedure was repeated on eighty-four animals, which were divided into two experimental groups, the **irradiated** group and the **control** group, each one with

ABSTRACT

forty-two animals. In their turn, the groups had their animal distributed into seven development times for the granulation tissue: five, 7, 10, 14, 17, 20, and 24 days, performing groups of six animals. A linear accelerator was used for irradiation, with a 6 MeV energy electron beam, at a distance of 100 centimeters from the source to foam, and with a simple dose of 1.0 Gy , 1 centimeter deep. Irradiation was performed three days after surgical procedure, with the body protected by a lead cover, four millimeters thick, with an aperture allowing an exposition of five millimeters surrounding the foam diameter. After the proposed times, the formed tissues were removed and the specific ativity of three enzymes was measured:

- The **Adenosine Triphosphatase (ATPase)** showed a decreased activity, when compared to control, seventeen days after irradiation.
- The **Alkaline Phosphatase** showed, at eleven days, an increased activity in the irradiated group, decreasing at fourteen and twenty-one days but not significant when compared to the control group.
- The **5'Nucleotide Phosphodiesterase** showed an increased activity in the irradiated animals from two to eleven days, with significant difference from the control groups. At fourteen days a decreasing activity occurred, statistically significant, when compared to the non-irradiated group, followed by a new increasing from seventeen to twenty-one days in the animals belonging to the irradiated group with statistically significant difference at twenty-0one days, when compared to the control group.

Key words: Radiation, Electron, Granulation Tissue, Enzymes, Alkaline Phosphatase, Biological Effects.

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

Radiação Ionizante é um termo aplicado para radiações que dão origem à ionização, por ocasião de sua interação com a matéria. Essas radiações compreendem as radiações eletromagnéticas, como os raios X e raios gama, e as radiações corpusculares nas quais temos partículas alfa, partículas beta, pósitrons, nêutrons, prótons e, em particular, radiação por elétrons. A absorção de energia da radiação pelas células predispõe a ionização dos átomos e a produção de íons nessas mesmas células. O exato mecanismo de interação da radiação

1. INTRODUÇÃO

ionizante ainda não é conhecido, entretanto radiação danosa é considerada e relatada como aquela onde ocorrem os eventos acima descritos.

Desde a descoberta dos raios X, por Wilhelm Conrad Roentgen em 1895, até os dias atuais, as radiações ionizantes têm sido largamente estudadas e utilizadas.

Segundo HOBBS & MC. CLELLAN¹², em 1980, logo foi possível detectar os efeitos deletérios que essa forma de energia ocasionava sobre os tecidos vivos e, com a evolução desses estudos, foi sendo observado que tais efeitos deletérios apresentavam-se nas mais diversas formas, conforme a qualidade, a quantidade da radiação, o volume e o tecido exposto.

A interação da radiação com a matéria e o seu poder de penetração, principalmente o das radiações corpusculares, quando usada com finalidade terapêutica, se dá entre energia e tecido vivo. Portanto, um entendimento dos mecanismos biológicos e bioquímicos que ocorrem nos organismos vivos, como o processo de reparação tecidual, é de grande importância. Sabendo-se da ação lesiva dessa radiação sobre os componentes teciduais, é fundamental tentar esclarecer como esses componentes reagem.

Muitos fatores, tanto externos como internos, podem modificar a resposta de uma reparação tecidual, e um deles é a radiação. No entanto, há alguma controvérsia com relação à cura de feridas produzidas em tecidos irradiados antes ou depois do ato cirúrgico, sendo que alguns autores relatam que baixas doses de radiação estimulariam e altas doses retardariam o processo de reparo.

Entre as formas de radiação ionizante do tipo corpuscular, destaca-se a radiação por elétrons, na qual um grande número de pesquisadores utilizaram altas doses dessa radiação, doses estas empregadas com finalidade terapêutica. Esse tipo de radiação é caracterizado por apresentar um poder de penetração menor que aquele dos raios X de megavoltagem, sendo, portanto, destinados ao tratamento de lesões superficiais ou de média profundidade.

1. INTRODUÇÃO

Contudo, há escassez na literatura a respeito de pesquisas sobre os efeitos biológicos provocados pela radiação de elétrons sobre o processo de reparo tecidual; conseqüentemente, nada se conhece sobre o comportamento de proteínas quando são atingidas por baixas doses de radiação de elétrons, em particular sobre o dano que essa radiação pode causar nas enzimas, as quais têm um importante papel no desenvolvimento do processo de reparo, mais especificamente sobre esse tecido néo-formado.

Fundamentado em estudos iniciados por VIZIOLI²⁶ em 1975, BÓSCOLO⁵ em 1989, TOSONI²⁴ no ano de 1992 e ALMEIDA² em 1997, estudou-se o efeito de baixas doses de radiação de elétrons na atividade das fosfoesterases: **fosfatase alcalina** que está ligada ao processo de agregação do colágeno e as glicosaminoglicanas; **ATPase** que gera grandes quantidades de energia para um tecido que está se multiplicando, células em divisão necessitam de energia; **5'nucleotídeo fosfodiesterase** em que os tecidos, nessas condições, apresentam um metabolismo alto e, para permanecer nestes níveis devido ao giro dos nucleotídeos, tem que ter uma atividade alta desta enzima.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2. REVISÃO DA LITERATURA

2. REVISÃO DA LITERATURA

2. REVISÃO DA LITERATURA

A literatura ao nosso alcance demonstrou haver poucas citações de trabalhos que fizessem referência sobre os efeitos das radiações de elétrons no tecido conjuntivo de reparo, principalmente sobre as enzimas que compõem esse tecido. Já com relação à radiação X, os efeitos foram mais estudados e esses trabalhos variam de acordo com a fonte de radiação, dose utilizada, e o componente do tecido estudado.

TRABALHOS ENVOLVENDO RADIAÇÃO X E / OU REPARO

MILLER & RUDOLPH²⁰, em 1990, estudaram lesões que surgem na pele circundante em consequência da radiação ionizante de uma terapia de câncer. Os sintomas agudos (pele eritematosa, seca e descamada ou avermelhada e descamação úmida com ulceração superficial) e as alterações dérmicas crônicas se resolvem dentro de 6 meses. Em alguns pacientes, em resposta a trauma leve e, ou espontaneamente, a pele pode se romper e desenvolver uma úlcera podendo abranger a área de dano pela radiação. A base é torpe e áspera, o tecido de granulação é esparso e não saudável, e a lesão apresenta pequena propensão para se epitelializar ou se contrair, podendo-se estabelecer cânceres de células escamosas. Embora a obliteração microvascular e endarterite obliterativa ocorram na injúria crônica por radiação, vasos normais podem estar presentes ao longo desses tecidos. A hipóxia que ocorre em tecidos subcutâneos, na fase aguda da injúria, torna-se menos evidente 11 semanas após a irradiação, estando acima de 20 mmHg, nível necessário para síntese e acúmulo de colágeno. No tratamento da osteorradionecrose, a indução da angiogênese traz à lesão uma nova população de fibroblastos não irradiados. Alguns experimentos sugerem que a radiação ionizante tem efeito direto na proliferação de fibroblastos e que os mesmos podem ser permanentemente danificados. A diminuição do fluxo de sangue, após a irradiação, pode ser também apontada como uma das causas para a cicatrização pobre ou ausente da pele injuriada. A observação freqüente da pele, pelo paciente e pelo médico, é essencial de modo a reconhecer áreas com tendência á ulceração, ou já ulcerada, de forma a prevenir e/ou minimizar o rompimento da pele. Infelizmente, pequenas úlceras por radiação freqüentemente progridem para úlceras maiores, infectantes e dolorosas. Para pacientes terminais e/ou naqueles em que importantes estruturas repousam dentro dos tecidos lesados, faz-se a cobertura por retalhos, nem sempre com sucesso. Atenção e cuidados constantes podem proporcionar um tratamento bem sucedido para as lesões irradiadas.

2. REVISÃO DA LITERATURA

EHRLICHMAN *et al.*⁹, em 1991, estudaram vários mediadores celulares e bioquímicos requeridos na cicatrização normal de uma ferida. Fatores que promovem proliferação celular (citoquinas), como o fator beta transformante de crescimento (TGF β), fator de crescimento plaqueta - derivado (PDGF), fatores de crescimento ligações heparina / fator de crescimento fibroblástico básico e fator de crescimento fibroblástico ácido (FGF/HBGF básico e ácido), fator alfa transformante de crescimento (TGF α), fator de crescimento epidermal célula derivado (EDGF), fator I de crescimento insulina semelhante/somatomedina-C (IGF-I/SM-C) e interleucina 2 (IL-, IL-2) atuam em suas células alvos através de receptores específicos e de alta afinidade. Alguns desses fatores induzem, também, à transcrição de oncogenes (c - fos) e (c - myc) associados com proliferação celular e possivelmente tumorigênese. Na fase aguda da injúria ao tecido, plaquetas, macrófagos e linfócitos são as principais fontes dessas citoquinas que ampliam a população celular tais como fibroblastos, que migram na ferida e indiretamente influem na síntese de colágeno. O processo de ligações integrina-matriz extracelular é apresentado como um dos meios pelos quais a fase celular da cicatrização da ferida pode ser controlada. Quando complicações se desenvolvem, não ocorrerá a cicatrização da ferida [sepsia, má nutrição, idade avançada, síndrome da deficiência imunológica adquirida (AIDS), em tratamento com quimioterapia, drogas imunossupressivas ou radiação]. A cicatrização da ferida por segunda intenção depende: da formação do tecido de granulação desenvolvido na base da ferida, logo após a fase inflamatória; da contração da ferida onde as células miofibroblásticas especializadas repõem colágeno e promovem a contração do músculo liso; da epitelialização, ou seja, migração de células epiteliais sobre a ferida, o que ocorre simultaneamente com a contração da mesma. Feridas de radiação apresentam tecidos danificados tais como a isquemia tecidual secundária e uma endarterite obliterativa progressiva com fluxo sanguíneo diminuído e um efeito direto da radiação nos fibroblastos e sua proliferação. Miofibroblastos encontram-se atrasados em toda a ferida irradiada e a mesma

2. REVISÃO DA LITERATURA

apresenta baixa resistência tênsil e deposição total de colágeno. Tecidos irradiados apresentam cicatrização extremamente pobre e ulceram facilmente.

BERNSTEIN *et al.*³, em 1993, apresentaram um estudo sobre radiação, desde os tipos de radiação, seus feixes de energia (ortovoltagem e megavoltagem), profundidade da dose máxima (Dmax) e dose de superfície, juntamente com as possíveis conseqüências no campo da biologia celular. Para os efeitos colaterais, agudos e tardios (crônicos) da radiação ionizante, destacam a importância da dose total, tamanho da fração da dose, volume total tratado e tempo decorrido durante a radiação, que atuam de forma variável sobre os diferentes tipos de células que compõem a pele: queratinócitos, melanócitos, fibroblastos dermais e colágenos. Para os fibroblastos dermais, a radiação provoca diminuição na proliferação dos mesmos causando diminuição na habilidade de deposição e remodelamento do colágeno e conseqüente déficit na cicatrização da derme, alterações tardias e fibrose. Para cicatrização de feridas, os autores destacam a habilidade do fator BB de crescimento plaqueta-derivados (PDGF-BB) para reverter cicatrização de feridas prejudicadas por radiação local, o que não se verifica quando a irradiação se dá no corpo todo. Apontam como um dos parâmetros importantes na avaliação de feridas, em aplicação fracionada de doses de radiação, a resistência da pele ao rompimento que tem sua força reduzida com o aparecimento de feridas (RRF), com diminuição de produção de colágeno. Verifica-se a recuperação parcial da resistência da ferida e um aumento na expressão do gene colágeno, tratando-se a ferida irradiada com exógenos TGF- β , PDGF-BB e com injeção, nas feridas, de fibroblastos singênicos normais, revertendo, parcialmente, a cicatrização prejudicada. Cirurgias feitas em tecidos com alterações tardias de radiação podem resultar em morbidade aumentada. O risco de tumores cutâneos são mais prevalentes em peles com alterações crônicas de radiação.

DRAKE & OISHI⁸, em 1995, descreveram o processo normal de cicatrização de lesões nas etapas: inflamação, proliferação e maturação, sendo a primeira a mais sensível aos efeitos da quimioterapia e radioterapia. A injúria do

2. REVISÃO DA LITERATURA

tecido resulta ou do dano direto do DNA celular, ou do dano indireto do DNA celular, pela criação de radicais livres. Dose total de radiação e o tempo de administração são fatores determinantes dos principais efeitos da radioterapia pré-operatória que apresenta complicações na cicatrização. A radioterapia feita após 5 a 7 dias pode ser considerada segura. A derme cronicamente irradiada é mais suscetível à invasão bacteriana, que pode levar à necrose da lesão; portanto, cirurgia, nessa área, deve ser planejada cuidadosamente para evitar bordas minadas que podem desenvolver isquemia do tecido e evitar as complicações de hematomas e seromas. A braquiterapia (implantes radioativos dentro do leito da lesão), a quimioterapia e agentes específicos (adriamicina) são adjuvantes desenvolvidos para aumento da taxa de sobrevivência e intervalos livres de doença. Estudos adicionais sobre as deficiências na cicatrização de lesões causadas por estes agentes e o desenvolvimento de terapias interventivas permitem manipular o meio da lesão para atingir o teto da terapia citorrredutora oncológica, sem efeitos prejudiciais na cicatrização da lesão.

Efeitos de baixas doses de radiação X, na gênese e evolução do tecido de granulação induzido pela implantação de esponjas de PVC sob a pele de ratos, foram motivos de estudos por ABDALLA *et al.*¹ em 1991. Os animais foram divididos em 3 grupos. O grupo 1 não recebeu radiação, ficando como controle, o grupo 2 recebeu uma dose única de radiação, 5,28 R, logo após a implantação da esponja e o grupo 3 recebeu doses fracionadas de radiação, também de 5,28 R, só que a cada 2 dias após o implante da esponja até o 14^o dia, e a cada 4 dias até completar o 28^o dia com uma dose total de: 58,08 R. Os animais foram sacrificados nos tempos: 4, 7, 14, 21 e 28 dias. Os resultados mostraram existir uma parcial inibição na evolução do tecido de granulação, observados tanto no grupo 2 como no grupo 3 quando comparados ao controle, sendo que esta inibição foi mais evidente para o grupo que recebeu dose fracionada. Foi também observado que os efeitos danosos da radiação X são mais intensos nas fases iniciais da evolução do tecido.

2. REVISÃO DA LITERATURA

WATANABE *et al.*²⁹, em 1994, efetuaram estudos sobre os efeitos de baixas doses de radiação sobre a gênese e evolução do tecido de granulação em ratos. Em todos os animais foram efetuadas feridas cirúrgicas na região dorsal e mediana da coluna vertebral. Os animais foram divididos em 3 grupos de 21 animais cada: Grupo Controle: não irradiados; Grupo Dose Única: Irradiados numa exposição total de 7 R, imediatamente após ser feita a ferida; Grupo Dose Dividida, irradiados em 3 etapas: todas subseqüentes à confecção da ferida, sendo a 1ª dose imediatamente após, a 2ª dose 24 horas e a 3ª dose 48 horas. Todos os animais foram sacrificados nos tempos: 2, 4, 7, 11, 14, 21 e 28 dias após ferimento. Segundo os autores, foi possível observar um atraso na gênese e evolução do tecido de granulação para o grupo dose dividida, comparados aos outros dois grupos. A análise qualitativa da organização do tecido de granulação pela impregnação argêntica não mostrou nenhuma alteração significativa dos tecidos irradiados.

LOURENÇO¹⁷, em 1998, também estudou o efeito de baixas doses de radiação X no processo de reparação tecidual em feridas suturadas e não suturadas na região dorsal de ratos. Os animais sofreram um procedimento cirúrgico, sendo efetuada uma ferida de forma retangular com as dimensões de 20 mm. x 5 mm. na porção anterior lado direito da coluna numa profundidade aproximada de 2 mm., sendo retirado o tecido incisado. Esse procedimento foi repetido em 84 animais, os quais foram divididos em 4 grupos: grupo 1: controle sem sutura; grupo 2: irradiado sem sutura; grupo 3: controle com sutura e grupo 4: irradiado com sutura, sendo 3 animais por grupo. O tecido de granulação foi avaliado aos 2, 4, 7, 11, 14, 17 e 21 dias para cada grupo estudado. Os animais pertencentes aos grupos 1 e 3 não sofreram irradiação e serviram de controle para os grupos 2 e 4. Os animais dos grupos 2 e 4, no momento da irradiação, tiveram os corpos protegidos com um protetor de chumbo de 2 mm de espessura com uma abertura permitindo que fosse exposta somente a ferida cirúrgica. Cada animal sofreu 18 segundos de irradiação, totalizando 8 R.

2. REVISÃO DA LITERATURA

O processo de reparação tecidual foi avaliado pelos seguintes métodos: Coloração por **hematoxilina-eosina**, que possibilitou verificar a morfologia do tecido de granulação e a **impregnação argêntica** em que foi observada a síntese de colágeno, através da microscopia de polarização (birrefringência).

Os resultados mostraram que a radiação, apesar de ter causado atraso, não impediu a reparação tecidual, sendo que o grupo que sofreu irradiação e não foi suturado mostrou maior retardo quando comparado aos outros grupos.

TRABALHOS ENVOLVENDO RADIAÇÃO E / OU ENZIMAS

YUKAWA & NAKAZAWA³¹, em 1973, efetuaram estudos sobre o efeito da radiação X na atividade da hidroxilação no fígado de ratos em estágio de aleitamento durante seu desenvolvimento. Com dose de radiação de 200 R foi suprimida parcialmente, e totalmente, com 400 R, deu-se o aumento de atividade no período pós aleitamento, sem mudança evidente no conteúdo de proteína microsomal do fígado. Aos 40 dias de idade, nos ratos irradiados com 400 R, as atividades do sistema de transporte elétron microsomal foram levemente inibidas, mas tanto o conteúdo de citocromo p-450 como a mudança espectral induzida por hexobarbital foram suprimidas consideravelmente. As atividades de 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.

Ainda em 1973, BHATAVDEKAR *et al.*⁴ estudaram bioquimicamente o efeito de uma dose de 120 R de radiação X nas fosfatases alcalina e ácida, nos ácidos nucleicos e nas proteínas em tecidos (fígado, rim, músculo, adrenal e baço) de cobaias normais, irradiada e em recuperação. As concentrações de fosfatase foram significativamente diminuídas nos tecidos irradiados e valores normais não foram encontrados até mesmo em 72 horas de

2. REVISÃO DA LITERATURA

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.

Em 1975, VIZIOLI²⁶, em um de seus estudos, pesquisou a presença e o possível papel do grupo enzimático das fosfomonoesterases no tecido de granulação induzido por implantação de esponjas de policlorovinil (PVC) no tecido subcutâneo do rato. O tecido de granulação 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 atinge 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. E atinge o máximo da atividade aos 15 dias, mantendo-se até 20 dias, quando cai bruscamente. Essa atividade, coincidente com o período máximo de síntese de colágeno e de 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 tem a sua atividade máxima 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.

KAUR *et al.*¹³, em 1975, estudaram a fosfatase alcalina e a glucose-6-fosfatase 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. Foi notado o aumento da atividade enzimática em ambas as enzimas 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 glucose-6-fosfatase permaneceu aumentando mesmo no 3º dia.

2. REVISÃO DA LITERATURA

O aumento máximo da glicose-6-fosfatase foi observado no jejuno. No 9º dia, a fosfatase alcalina foi reduzida abaixo dos controles em todo o intestino, mas voltou ao normal no 10º dia. Entretanto, as atividades da glicose-6-fosfatase no duodeno e jejuno foram comparáveis àquelas de rato controle, mas no íleo, a atividade desta enzima manteve-se abaixo dos valores normais. Parece existir implicações fisiológicas na absorção de glicose ao longo do intestino pela fosfatase alcalina e a glicose-6-fosfatase, e tem sido relatado que o transporte de glicose é diminuído durante o período inicial após a radiação, mas subsequente aumentado após 24 horas. Decorridas 24 horas, a absorção de glicose é marcadamente diminuída e, deste modo, a resposta difásica da absorção 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 e 3, após a radiação. Um declínio da fosfatase alcalina no 9º dia, com uma tendência à normalidade no 10º dia, parece estar associado com a absorção diminuída da glicose pelo intestino irradiado.

PALVA²¹, 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 bioquímicos e histoquímicos sugerem que a atividade da Na-K-ATPase das membranas das células epiteliais dos olhos não é primariamente afetada pela radiação X. Entretanto, deve ser observado que a radiação X causa edema relativamente precoce nas células epiteliais. Desse modo, pode ser sugerido que essas alterações precoces nos olhos, após a radiação X, são, em primeiro lugar, devido a sua permeabilidade passiva aumentada, das membranas celulares aos cátions e não um defeito no sistema ativo da bomba de sódio e potássio.

KRIZALA *et al.*¹⁶, em 1980, estudaram, em cães irradiados com 3.0 Gy de radiação gama, as mudanças da atividade total, em soro sangüíneo, da fosfatase alcalina e de suas isoenzimas óssea e intestinal. As atividades das isoenzimas da fosfatase alcalina foram determinadas pelo método inibição-

2. REVISÃO DA LITERATURA

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 *et al.*¹⁹, em 1982, mediram, em diferentes tempos, a atividade da Na-K-ATPase dos olhos de coelhos expostos a uma dose única de 2000 rads de raios X e compararam com olhos controle contralaterais. Foi observado, primeiro, a diminuição da atividade enzimática em ambos os olhos e no epitélio capsular isolado nas 3ª e 4ª semanas após a radiação, que se tornou significativamente aumentada na 7ª semana e meia após a irradiação. Esses achados coincidiram com suas primeiras observações sobre ser o transporte ativo de cátions reduzido nesses olhos e apoiam a idéia de que a perda da ATPase da membrana é responsável pelo enfraquecimento da bomba de cátions nos olhos irradiados.

CATRAVAS *et al.*⁶, em 1988, estudaram "in vivo" os efeitos da radiação ionizante nas enzimas endoteliais pulmonar conversora de angiotensina e na 5' nucleotidase. Coelhos foram expostos a uma única dose de (30 Gy), utilizando-se um acelerador linear Varian Clinac 4. Este aparelho produz um feixe de raios X de 4MeV bem definido, semelhante ao Co 60. Utilizaram técnicas múltiplas de diluição - indicadora, e foram estudados o metabolismo de [³H] Benzoyl-Phe-Ala-Pro (BPAP) e de [¹⁴C] 5'-AMP, pela enzima conversora angiotensina (ACE) e pela 5' nucleotidase (NCT), respectivamente, durante uma única passagem transpulmonar em coelhos conscientes, cronicamente cateterizados. Dos dados foram calculadas duas constantes cinéticas, Km e Amax. Foi observado um decréscimo significativo no metabolismo das quantidades de BPAP e 5AMP nas 2, 24 e 48 horas após a radiação. Foi observado um igual decréscimo nas taxas das constantes (Amax / Km) de ACE nas primeiras 2 horas, mas que retornou aos níveis de controle nas 24 e 48 horas após radiação. Os valores de Km de ACE para BPAP e NCT para 5' AMP foram elevados nas 2, 24 e 48 horas pós - tratamento, ao passo que a Amax (produto da

2. REVISÃO DA LITERATURA

massa enzimática e a constante de formação de produto, Kcat) de ACE foi elevada nas 2 e 24 horas, mas não nas 48 horas, e Amax para NCT foi elevada somente nas 2 horas pós - tratamento. Não foi observada nenhuma mudança na estrutura endotelial nas 2 horas pós - radiação a níveis de microscópio ótico 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 seqüelas poderem, também, ter contribuído para a diminuição da função enzimática.

BÓSCOLO *et al.*⁵, em 1989, realizaram um trabalho que foi um dos precursores desta linha de pesquisa. Efetuou estudo da variação de enzimas do globo ocular, em cães, com emprego de baixas doses de radiação X, tendo o aparelho operado com os seguintes fatores: 65 kVp e 10 mA, totalizando 7,34 R. de exposição. Foram pesquisadas atividades das enzimas glutathione reductase (GR), glucose-6-fosfatase desidrogenase (G6PD), B-n-acetil hexosaminidase (H) e fosfatase ácida (FA). O olho direito foi utilizado para irradiação, enquanto o outro servia como controle protegido por uma lâmina de 5mm. de chumbo. A dosimetria foi obtida utilizando-se dosímetros termoluminescentes de fluoreto de lítio-700. Os animais, após serem irradiados, foram conservados no canil em condições normais. Os tempos observados após a irradiação foram, 6, 12, 24, 48, 72 e 96 horas. Decorridos os tempos estabelecidos, os animais foram anestesiados; em seguida foi tomada a pressão intra-ocular em ambos os olhos, sendo os animais sacrificados, em grupos de três, nos tempos de 12, 24 e 48 horas, respectivamente. Tempos estes em que, durante a execução do plano piloto, apresentaram-se com algumas alterações na atividade das enzimas. Ambos os olhos foram removidos, lavados em soro fisiológico e secados. Promoveu-se a secção equatorial de cada globo ocular. Na porção anterior de cada olho, foi separado o cristalino do epitélio interno. Da mesma forma, nas secções posteriores, foram removidos os epitélios internos. Essas estruturas foram

2. REVISÃO DA LITERATURA

submetidas à análise bioquímica, e os autores concluíram: redução da atividade da enzima GR do cristalino nos tempos de 24 e 48 horas após a irradiação; aumento da atividade da enzima G6PD no epitélio no tempo de 24 horas e caindo para 48 horas após a irradiação (o mesmo fato ocorrendo ao cristalino); redução da atividade da enzima H do epitélio interno, porção anterior e posterior para 12, 24 e 48 horas após a irradiação; aumento inicial da atividade da enzima FA do epitélio interno, porção anterior e posterior para 12 horas após a irradiação, decaindo para porção anterior e aumentando para a porção posterior nas 48 horas após a irradiação e decaindo na porção posterior 48 horas após a irradiação.

TOSONI²⁴, em 1992, mostrou, em um trabalho na mesma linha de pesquisa, um estudo da atividade enzimática em tecidos de granulação de ratos submetidos a baixas doses de radiação. Foi pesquisada 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 a baixas doses de radiação X. Os animais 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 observada alteração no comportamento da atividade da enzima adenosina trifosfatase (ATPase), quando os 3 grupos foram comparados.

TRABALHOS ENVOLVENDO RADIAÇÃO DE ELÉTRONS

FOWLER *et al.*¹¹, em 1965, determinaram o efeito moderado do fracionamento da dose de radiação de elétrons em um tecido normal, observando a reação da pele irradiada em pata de rato. Os parâmetros usados foram a dose necessária, única ou fracionada, para produzir uma reação combinada na pele que fosse avaliada em uma escala arbitrária. Para isso foram utilizados grupos de 5 a 8 ratos, com 11 semanas de idade. Cada rato foi anestesiado, sendo posicionados aos pares em uma plataforma com uma ponte de perspex, na qual um teve o pé de sua pata traseira esquerda atado com fita adesiva à pata esquerda de um segundo rato. Foram posicionadas sob o centro do diafragma de chumbo - aço com um feixe vertical de 15 MeV de elétrons, do acelerador linear do St. Bartholomew's Hospital (Rotblat 1955). As patas dos animais foram irradiadas a 1,2 m. da fonte de espalhamento do acelerador, com dose fracionada de 1 - 1,5 rads por 1,3 μ s pulso repetida 400 vezes por segundo, dando uma dose total de 400 - 600 rads/s. Cada exposição foi monitorizada por câmara de ionização de perspex, calibrada com uma correção de 4% e as doses recebidas foram checadas com dosímetros termoluminescentes de fluoreto de lítio. As reações da pele nas patas esquerdas dos ratos irradiados foram registradas diariamente, por 30 dias após a irradiação, por um ou mais observadores. Observou-se as reações na pele dos ratos, que foram desde ampla extensão de ruborização até completa necrose do membro. A hipóxia afetou a resposta da pele de rato irradiada quando o animal estava respirando ar e/ou oxigênio em pressão atmosférica normal. A curva dose - resposta mostra que é possível comparar a dose total necessária para produzir uma certa resposta biológica em uma porção da escala que é dose - dependente.

WILLIAMS *et al.*³⁰, em 1979, descreveram com sucesso a modificação de um equipamento fixo para tratamento, de corpo todo, com elétrons de baixa energia em pacientes com micose fungóide. Nesta técnica o paciente é movimentado em relação ao feixe de elétrons de (3 MeV). A 0,9 cm da superfície

2. REVISÃO DA LITERATURA

tem-se 80% da dose máxima. A dose foi checada em fântons e em pacientes, usando-se fluoreto de lítio, e foi confirmado que doses uniformes foram encontradas sobre toda a superfície, exceto virilha e axila. A contaminação pelos raios X foi medida em, no máximo, 2% da dose no centro do feixe de elétrons. Doses de 1600 a 3000 rads foram distribuídas para cada paciente em quatro frações, divididas em campos, completando o tratamento de corpo todo em uma semana, repetindo-se o procedimento por três semanas consecutivas; a maioria dos pacientes receberam 2400 rads em 12 frações em 18 dias. Observou-se, em um paciente, reação eritematosa na superfície medial das coxas com melhora espontânea. Nenhuma descamação seca ou úmida foi vista e a longo prazo não se detectou estigma da pele e nem fibrose subcutânea. As áreas não envolvidas foram protegidas com 2 mm. de chumbo; os olhos foram protegidos e em alguns pacientes toda a cabeça pôde ser protegida com chumbo. A função das glândulas sudoríparas continuou durante e após o tratamento. Nenhum paciente teve alteração significativa no índice hematológico durante o tratamento, tendo a medula óssea apresentado excelente tolerância, o que é um tributo à baixa contaminação por raios X do feixe de elétrons.

Em 1993, CROMACK *et al.*⁷ analisaram ratos adultos machos, divididos em 3 grupos: Irradiados Corpo Todo (ICT), Irradiados Superficial (IS) e Controles não Irradiados (CNI). O grupo ICT recebeu 800 rads e o grupo IS 2500 rads de radiação, dois dias antes de todos animais sofrerem pares de incisões lineares de 6 cm na pele dorsal. As feridas foram coaptadas com três cliques cirúrgicos e limpas com recombinante humano TGF - B1 para os grupos irradiados e veículo para o grupo CNI. Após 7 e 12 dias, os animais foram sacrificados e colhido material das feridas observando-se déficit de cicatrização acentuado nas feridas irradiadas. Os ratos ICT apresentaram uma marcada depressão dos monócitos circulantes e efeitos mínimos nos fibroblastos da derme; enquanto os IS tiveram marcadamente prejudicada a cicatrização superficial, pela inibição da síntese de colágeno da reparação, poupando os monócitos e medula óssea. Nos ratos ICT, o tratamento com TGF-B1 acelerou a reparação do tecido mole e

2. REVISÃO DA LITERATURA

resistência à ruptura, pela indução da síntese de colágeno. Nos animais IS observou-se déficit de cicatrização por prejudicar a função dos fibroblastos da derme.

WANG *et al.*²⁸, em 1994, investigaram a resposta morfológica da cicatrização de feridas em pele de ratos irradiados com elétrons, com profundidade controlada. Para tanto, foram utilizados 24 ratos machos divididos em 2 grupos: – 12 controles e 12 experimental irradiados, sendo os irradiados posicionados em grupos de 3 animais de forma que a posição ventral fosse irradiada com um feixe de elétrons de 4MeV que distribuiu uma dose de corpo parcial simples de no máximo 9,6 Gy e a uma profundidade de 3mm. sobre toda a região, 5 cm. ao longo do dorso do animal. Sete dias após a irradiação, todos os ratos sofreram feridas incisionais, pradrionizadas, de 20 mm. de comprimento, na face médio dorsal da região depilada; o procedimento cirúrgico também foi efetuado no grupo controle. Três ratos de cada grupo experimental foram sacrificados com 1, 3, 7, e 14 dias de intervalos após o ferimento. O efeito morfológico da radiação de elétrons na reparação de cada ferida foi pesquisado pela microscopia de luz e eletrônica de varredura. Observações indicaram que a irradiação de elétrons retardou tanto o espessamento epitelial quanto a união epitelial até o 7º dia. A formação de tecido de granulação foi restaurada em torno de valores controles perto dos 14 dias - pós incisão, ocasião em que os epitélios em ambos os grupos estavam aproximadamente similares em aparência. Na terapia por radiação, em patologias superficiais elétrons-sensitivas, os autores apoiam a pré-irradiação e posterior prática cirúrgica uma vez que a cicatrização normal do tecido não foi impedida.

ALMEIDA², em 1997, na mesma linha de pesquisa, estudou o efeito de baixas doses de radiação por elétrons no processo de cicatrização tecidual em ratos. Feridas retangulares foram feitas na porção dorsal dos animais, os quais foram divididos em 2 grupos controles e 2 irradiados, sendo um destes irradiado imediatamente após abertura da ferida. O processo de cicatrização foi observado nos tempos: 2, 4, 7, 11, 14, 17 e 21 dias. O outro grupo foi irradiado 3

2. REVISÃO DA LITERATURA

dias após o procedimento de abertura das feridas; nesse caso, os tempos de observação e sacrifício dos animais foram: 5, 7, 10, 14, 17, 20 e 24 dias. O processo de reparação tecidual foi observado por 3 métodos de coloração: hematoxilina - eosina, azul de toluidina e impregnação argêntica. Os resultados mostraram que com 1,0 Gy de radiação de elétrons houve retardo, mas não impediu o processo de reparação tecidual em ambos os grupos irradiados. Comparados com os controles, todos os grupos irradiados sofreram prejuízo na reparação tecidual em todos os tempos estudados. Para os irradiados imediatamente após, destaca-se o retardo para os 7º e 14º dias e para o grupo irradiado 3 dias após, o retardo na cicatrização é evidente estatisticamente em todos os tempos. Quando comparados os grupos irradiados, os danos mais evidentes ficam por conta dos irradiados 3 dias após a abertura da ferida, com destaque para os tempos 7, 14 e 17 dias. Na impregnação argêntica, quando analisadas sob luz comum, as lâminas mostram uma coloração mais escura; para os irradiados imediatamente após, o tecido apresenta fibras colágenas mais densas, característica de tecido mais evoluído, enquanto que o irradiado 3 dias após não é tão denso, mostrando atraso na gênese e evolução do tecido de granulação.

3. PROPOSIÇÃO

3. PROPOSIÇÃO

3. PROPOSIÇÃO

3. PROPOSIÇÃO

Sendo a radiação de elétrons, um tipo de energia com propriedades suficientes para criar alterações físico-químicas nos organismos vivos, nos propusemos a estudar o efeito dessa energia sobre a atividade das enzimas adenosina trifosfatase (ATPase), fosfatase alcalina e 5'nucleotídeo fosfodiesterase em tecido de granulação.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4. MATERIAL E MÉTODOS

4. MATERIAL E MÉTODOS

4. MATERIAL E MÉTODOS

MATERIAL

Seleção dos animais

Neste estudo, foram utilizados 84 exemplares *Rattus norvergicus*, *Albinus*, *Wistar* machos, pesando entre 180 e 300 gramas, com idades compreendidas entre 60 e 90 dias (adultos jovens), sendo alimentados durante todo o período do experimento com ração balanceada padrão e água "ad libitum".

4. MATERIAL E MÉTODOS

Procedimentos experimentais

Os procedimentos experimentais para a obtenção do tecido de granulação consistiram do processo de pesagem, identificação, anestesia, tricotomia, incisão e implantação da esponja, irradiação, obtenção do tecido de granulação com posterior sacrifício dos animais e remoção e processamento do tecido para extração das enzimas. Na execução dessas etapas foram utilizados os seguintes materiais:

Pesagem e identificação

- balança, tipo digital, modelo: TEB 1000 (Tecnal)
- recipiente em alumínio com tampa, para pesagem dos animais
- pinças: reta, angulada e porta agulha
- algodão hidrófilo
- azul de metileno

Anestesia e tricotomia

- solução antisséptica incolor Merthiolate
- seringa para insulina com agulha intradérmica 12,7mm.x 0,33mm
- anestésico Hypnol (Pentabarbital Sódico), Laboratório (Fontoveter Divisão Cristália)

Incisão e implantação da esponja

- gaze estéril
- gabarito plástico e caneta hidrográfica para demarcação
- tesouras: ponta fina e romba, reta e curva
- bisturi com lâmina nº 11, estéril
- pinça especial para inserção subcutânea da esponja
- disco de esponja de polivinil (PVC) estéril, na forma de pastilha com 8mm. de diâmetro por 4mm. de espessura
- fio de seda espessura 4.0 com agulha (Ethichon da Johnson & Johnson)

4. MATERIAL E MÉTODOS

Irradiação

- acelerador linear, modelo Mevatron 74, da Siemens
- protetor de chumbo com 4mm. de espessura

Remoção do tecido de granulação

- soro fisiológico, solução de Na Cl a 0,9%
- bomba d'água manual
- frascos de Becker
- placa de Petri
- papel de filtro
- recipiente com gelo

Materiais e drogas utilizadas na extração enzimática

- tris (hidroximetil) aminometano p.a.(Merck)
- phosphatase substrate (Sigma 104)
- adenosine 5'T P dissodium (Sigma)
- P. nitrophenyl phenylphosphonate (Sigma)
- hidróxido de sódio p.a.(Merck)
- 1-amino 2-naphthol 4-sulfônico acid (Sigma)
- ácido sulfúrico (Merck)
- carbonato de sódio (Ecibra)
- reagente de Folim ciocalteau (Sigma)
- ácido tricloroacético (Riedel de Haën)
- tubos de centrífuga para alta rotação
- homogeneizador de tecido marconi modelo TE 099
- centrífuga Incibrás modelo SPIN I
- DU - 65 spectrophotometer BECKMAN

MÉTODOS

Distribuição dos grupos experimentais

Os animais foram divididos de forma aleatória em dois grupos experimentais, sendo um **irradiado** e o outro **controle**, contendo cada grupo 42 animais. Por sua vez, cada grupo teve seus animais distribuídos segundo 7 (sete) tempos de evolução do tecido de granulação; tempos estes em que foram sacrificados os animais e assim definidos: 5, 7, 10, 14, 17, 20 e 21 dias, sendo cada tempo composto de 6 animais, divididos em 2 (duas) gaiolas: gaiola A - animais 1, 2 e 3, gaiola - B animais 4, 5 e 6. Todos os animais sofreram incisão e implantação de esponja e a partir daí foram diferenciados da seguinte forma: um grupo foi irradiado e o outro serviu como controle. O grupo irradiado sofreu irradiação 3 dias após implantação da esponja. Sendo assim, os grupos foram nomeados, utilizando-se os tempos de evolução do tecido de granulação (tempos de sacrifícios), da seguinte forma:

Grupo irradiado

Grupo Irradiado – 05 dias

Grupo Irradiado – 07 dias

Grupo Irradiado – 10 dias

Grupo Irradiado – 14 dias

Grupo Irradiado – 17 dias

Grupo Irradiado – 20 dias

Grupo Irradiado – 24 dias

4. MATERIAL E MÉTODOS

Grupo controle

Grupo Controle – 05 dias

Grupo Controle – 07 dias

Grupo Controle – 10 dias

Grupo Controle – 14 dias

Grupo Controle – 17 dias

Grupo Controle – 20 dias

Grupo Controle – 24 dias

Pesagem e identificação

Todos os animais sofreram o processo de pesagem em balança digital para determinação do peso corpóreo para estabelecer a dosagem do anestésico. Em seguida os animais foram separados em nº de 3 por gaiola, sendo identificados no dorso, porção caudal, por uma marca feita com azul de metileno.

Anestesia e tricotomia

De posse do anestésico Hypnol (Pentabarbital Sódico) solução injetável a 3% do Laboratório Fontoveter Divisão Cristália, devidamente dosado com auxílio de uma tabela previamente elaborada para conversão peso x dosagem do anestésico, promoveu-se a anestesia do animal, via intraperitoneal numa concentração de 40 mg. por kg. de peso corpóreo do animal, sendo feita anti-sepsia prévia do local . A seguir realizou-se a tricotomia do lado direito do dorso de cada animal, da porção mediana para encefálica, manualmente e com auxílio de pinça e tesoura, a fim de evitar-se irritação química na pele do animal (FIG. 1).

4. MATERIAL E MÉTODOS

Incisão e implantação da esponja

Com auxílio de um gabarito plástico e caneta tipo hidrográfica , foram delimitadas as áreas a serem incisadas e implantada a esponja, conservando-se a uniformidade da amostra. Utilizando uma pinça porta agulha, gaze estéril e solução anti-séptica incolor foi executada assepsia do local a ser incisado. Logo após efetuou-se uma incisão de 15 mm. na pele, perpendicularmente ao longo eixo da coluna vertebral; com uma tesoura reta de ponta romba foi efetuada a divulsão do tecido para facilitar a implantação do disco de esponja.

Com auxílio de uma pinça especial para inserção, o disco de esponja devidamente esterilizado foi inserido, de forma subcutânea, através da incisão até o local pré demarcado e já divulgionado, a uma distância de 3 cm. da incisão, a fim de evitar que o processo de cicatrização da incisão interferisse no tecido de granulação em desenvolvimento na esponja (**FIG. 1**).

Uma vez implantada a esponja, a incisão foi suturada com um ponto simples usando uma pinça porta agulha com fio de sutura de seda preta trançada multifilamentar 4-0 de 45 cm. acoplada à agulha tipo atraloc de 1,7 cm. marca Ethichon da (Johnson & Johnson). Decorridos 3 dias, os animais do grupo irradiado foram levados até o aparelho para sofrerem irradiação.

4. MATERIAL E MÉTODOS

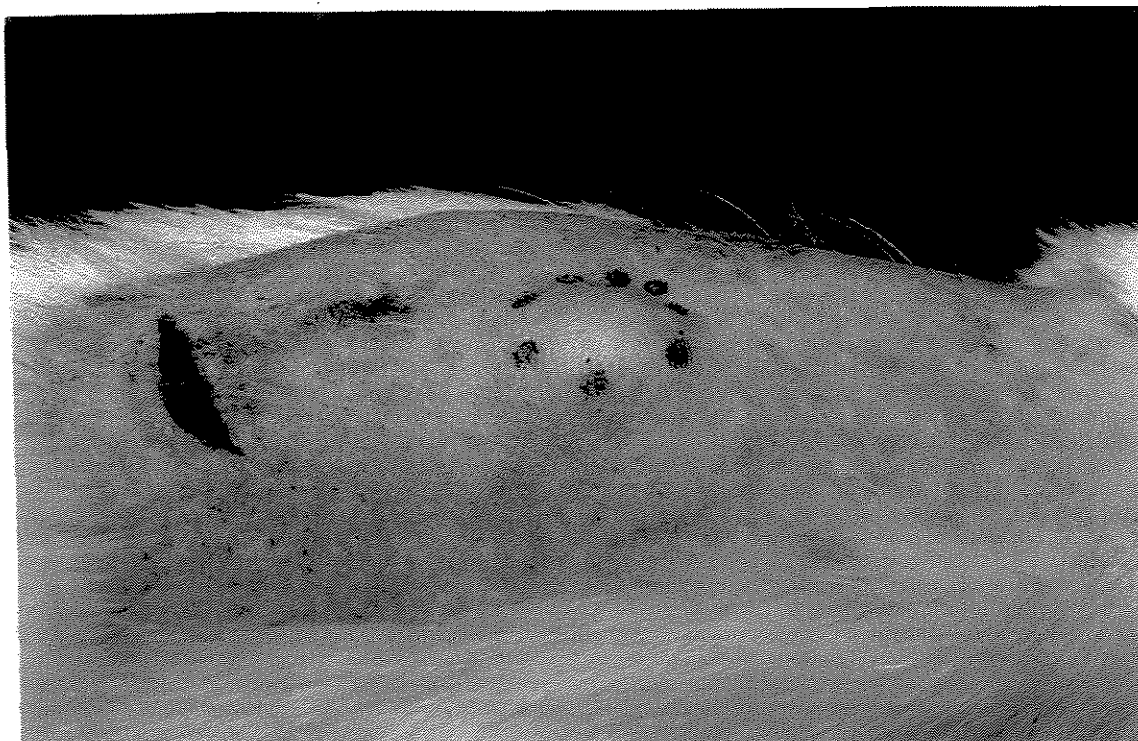


FIGURA 1 - Dorso do animal com a tricotomia efetuada e a demarcação onde se encontra posicionada, sob a pele, a esponja de PVC; observa-se, também, a incisão por onde foi divulgado o tecido até a demarcação.

Irradiação

Precedendo a irradiação, os animais desse grupo foram anestesiados conforme o processo de anestesia e tricotomia anteriormente citado.

Para a irradiação dos animais foi utilizado um acelerador linear, modelo Mevatron 74, da Siemens com um feixe de elétrons com energia de 6 MeV, a uma distância de 100 cm. (fonte até a esponja), a dose simples aplicada foi de 1,0 Gy, que permaneceu por igual a 1 cm. de profundidade. Para a realização desse procedimento, apenas a área demarcada correspondente ao diâmetro da esponja e mais 0,5 cm. além desta demarcação foi irradiada. Todo restante do corpo do animal foi protegido por um avental de chumbo com 4,0 mm. de espessura especialmente confeccionado para esse fim (**FIG. 2**).

4. MATERIAL E MÉTODOS

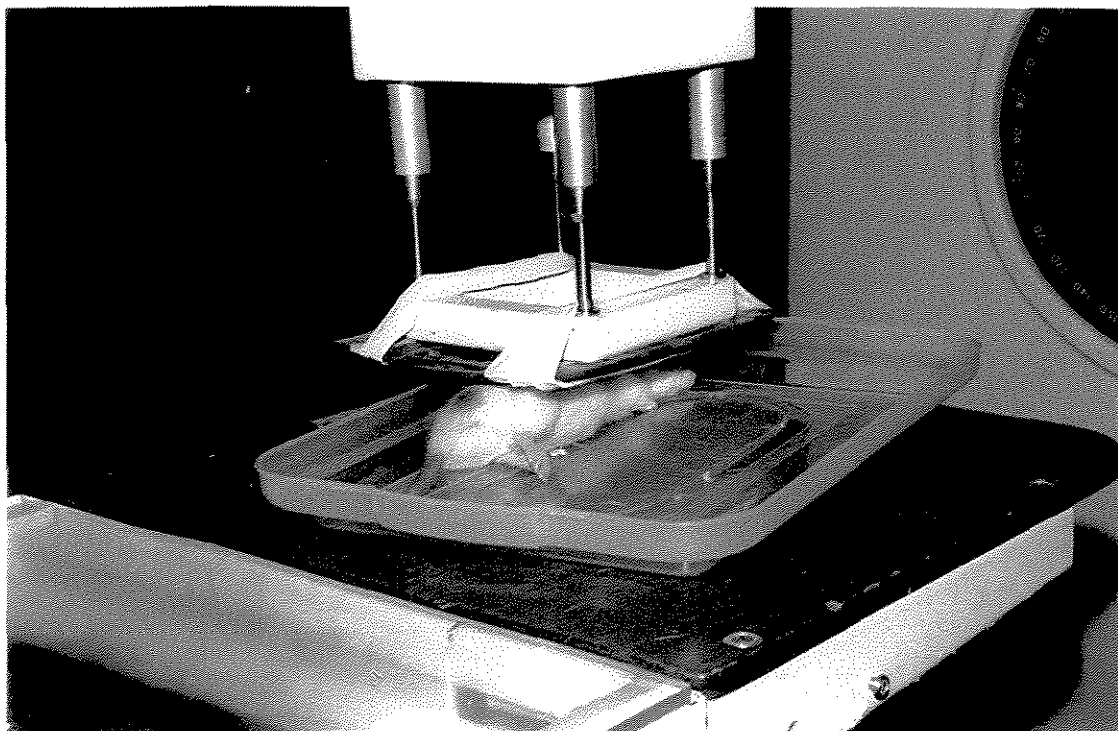


FIGURA 2 - Animal posicionado no momento da irradiação.

Remoção do tecido de granulação

No prazo estabelecido para o sacrifício, os tecidos de granulação foram retirados (**FIG. 3**). Com os ratos mantidos sob anestesia, as peças foram removidas e rapidamente lavadas com soro fisiológico, com auxílio de uma bomba manual d'água provocando jatos em forma de spray. Em seguida, as peças sofreram nova lavagem, passando por dois frascos de Becker contendo também soro fisiológico, a baixa temperatura.

Na sequência, as peças foram colocadas sobre papel de filtro embebido em NaCl a 0,9% em uma placa de Petri e também mantidas a baixa temperatura até o seu processamento (**FIG. 4**).

4. MATERIAL E MÉTODOS

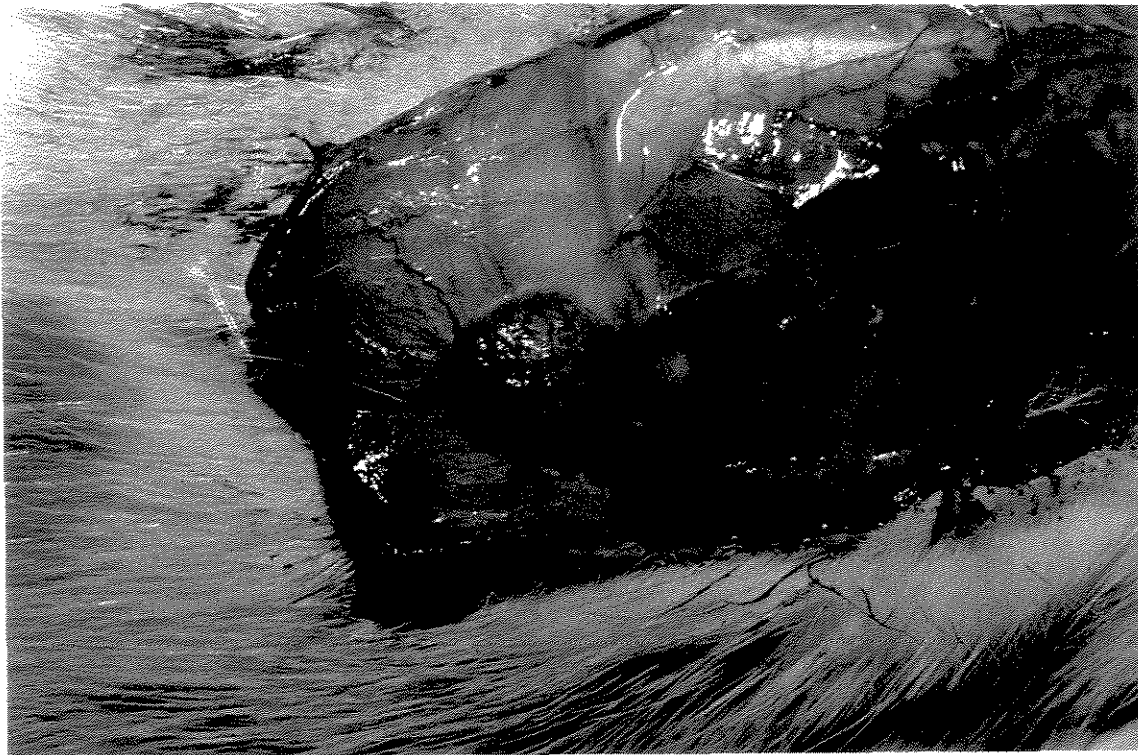


FIGURA 3 - Tecido rebatido, expondo a esponja e o tecido de granulação, no momento da remoção da peça.

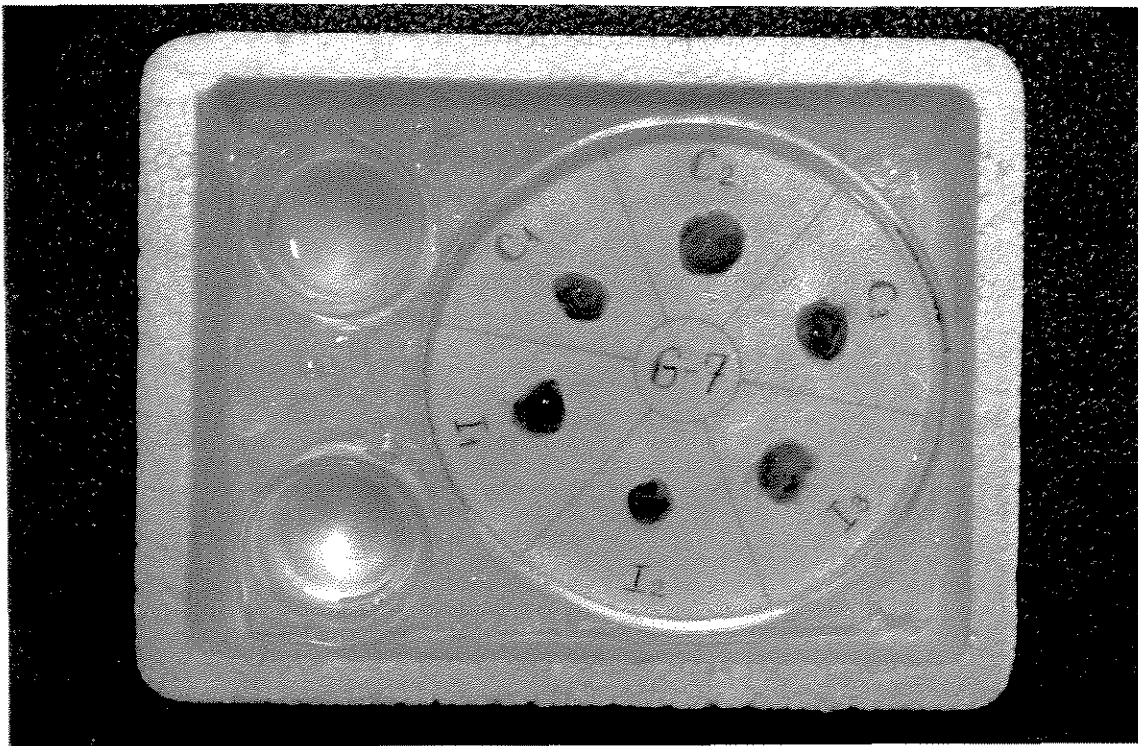


FIGURA 4 - Recipiente com gelo; contendo dois frascos de Becker com soro fisiológico e a placa de Petri com papel de filtro, embebido também em soro fisiológico, contendo as peças removidas.

4. MATERIAL E MÉTODOS

Extração enzimática

A seguir os tecidos foram pesados, com prévia secagem. Na extração das enzimas desse tecido foi utilizada uma solução tampão constituída de Tris-HCl 0,1 M, Mercaptoetanol 1 mM, EDTA 1 mM de pH 7,4 (SASSAKI & NICOLAU²², 1982).

Para cada 100 mg. de peso do tecido, foi acrescentado 1,0 ml de tampão e feita a homogeneização utilizando-se homogeneizador de tecido, tipo Potter- Elvehgen.

Após a homogeneização, o extrato foi centrifugado a 11000 x g por 2 minutos.

Determinação enzimática

O sobrenadante dos extratos foi utilizado para determinação de atividades das enzimas adenosina trifosfatase (ATPase), fosfatase alcalina e 5'nucleotídeo fosfodiesterase.

Fosfatase alcalina

A atividade da enzima fosfatase alcalina foi determinada utilizando-se solução contendo p-nitrofenilfosfato 1mM como substrato e tampão Tris-HCl 0,1 M e pH 9,0 (KELLY & BUTLER¹⁴, 1975). 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 1M e feita a leitura no espectrofotômetro, 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 µmol de produto por minuto, a uma temperatura de 30 °C.

A atividade específica da fosfatase alcalina foi expressa em unidade de enzima por mg de proteína. A medição da quantidade de proteína dos

4. MATERIAL E MÉTODOS

extratos foi feita contra padrão de proteína de 100 µg/ml, através do método de (LOWRY *et al.*¹⁸, 1951).

5' nucleotídeo fosfodiesterase

Para a determinação da atividade da 5'nucleotídeo fosfodiesterase, utilizamos uma solução contendo p-nitrofenilfosfonato 1 mM como substrato em tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 8,0. (KELLY *et al.*¹⁵, 1975)

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 absorbâncias a 400 nm.

Foi estipulado, para a 5'nucleotídeo fosfodiesterase, que uma unidade de atividade enzimática é a quantidade de enzima capaz de liberar 1 µmol de produto por minuto, a uma temperatura de 30 °C.

A atividade específica também foi expressa em unidade de enzima por mg de proteína, como já citado no item anterior.

Adenosina trifosfatase (ATPase)

Foi determinada a atividade da enzima ATPase na solução: ATP (trifosfato de adenosina) 2,0 mM como substrato, tampão Tris-HCl 0,0063 M, MgCl 2,5 mM e pH 7,4 (SEIDEL & GERGELY²³, 1963).

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 & SUBBAROW¹⁰, 1925).

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

4. MATERIAL E MÉTODOS

A atividade específica também foi expressa em unidade de enzima por mg de proteína da mesma forma como já citado.

5. RESULTADOS

5. RESULTADOS

5. RESULTADOS

5. RESULTADOS

As atividades específicas encontradas em cada uma das 3 enzimas foram consideradas isoladamente e submetidas a análise de variância (VIEIRA²⁵, 1981) e estão expressas em unidade de enzima por mg de proteínas.

5. RESULTADOS

A - ATIVIDADE ESPECÍFICA DA ENZIMA ADENOSINA TRIFOSFATASE

Os dados sobre a atividade específica da enzima ATPase em 84 ratos no momento do sacrifício, segundo o grupo e o número de dias decorridos após a implantação da esponja, estão apresentados na (TAB. 1).

TABELA 1

Atividade específica da enzima ATPase, segundo o grupo e o número de dias decorridos após a implantação da esponja, no momento do sacrifício.

Tempo	Controle			Irradiado		
5	3,220	2,220	3,730	4,370	4,700	5,020
	3,490	2,840	3,090	4,050	4,970	4,930
7	6,410	7,080	6,020	6,670	5,930	5,160
	6,860	7,030	8,990	5,570	4,740	7,950
10	3,810	4,200	5,030	4,100	5,270	3,910
	4,700	5,330	4,220	4,730	4,230	4,740
14	4,450	4,590	5,650	3,980	4,130	3,560
	4,950	3,670	4,080	4,590	3,560	3,850
17	5,050	4,400	3,910	5,500	4,180	5,140
	5,070	6,390	5,150	4,470	3,690	3,860
20	12,010	3,650	5,310	0,030	5,720	5,150
	5,000	5,500	5,600	4,810	5,520	5,980
24	5,330	6,190	4,510	5,060	6,150	5,340
	5,000	5,170	4,620	4,380	5,660	4,010

Os dados apresentados na (TAB. 1) foram submetidos à análise de variância para verificar se a irradiação e o tempo decorrido após a implantação da esponja têm efeito sobre a atividade específica da ATPase. Essa análise está apresentada na (TAB. 2)

5. RESULTADOS

TABELA 2

Análise de variância para os dados apresentados na (TAB. 1).

Causas da variação	G.L	Q.M	F	P
Tempos	6	9,0793	6,36	0,0000
5	1	7,4419	5,22	0,0239
7	1	3,3814	2,37	0,1243
10	1	0,0080	0,01	0,9386
14	1	1,1532	0,81	0,6249
17	1	0,8164	0,57	0,5416
20	1	8,1016	5,68	0,0188
24	1	0,0040	0,00	0,9566
Resíduo	70	1,4266		

Os valores F apresentados na (TAB. 2) mostram que existe diferença entre as médias de tempos. Então, as médias de tempos, apresentadas na (TAB. 3), foram comparadas pelo teste de Tukey. Com base nos resultados desse teste, pode-se afirmar que, decorridos 7 dias após a implantação da esponja, a atividade da ATPase é, em média, maior do que decorridos 5, 10, 14 ou 17 dias após a implantação da esponja. Isso significa que a atividade da ATPase tem um pico aos 7 dias e depois diminui significativamente, nos dois grupos.

5. RESULTADOS

TABELA 3

Médias da atividade específica da enzima ATPase, segundo o número de dias decorridos após a implantação da esponja, no momento do sacrifício.

Tempo	Média de tempos
5	3,8858 B
7	6,5342 A
10	4,5225 B
14	4,2550 B
17	4,7342 B
20	5,3567 AB
24	5,1183 AB

NOTA: Letras diferentes indicam que as médias são significativamente diferentes.

As médias de cada grupo, em cada tempo, estão na (TAB. 1), e no (GRAF. 1). Os valores *F* apresentados na (TAB. 2) mostram que existe diferença entre as médias de grupos decorridos 5 e 20 dias após a implantação da esponja. É interessante notar que, decorridos 5 dias após a implantação da esponja, a atividade da ATPase era maior no grupo irradiado, mas depois a situação mudou (TAB 4). Embora não existam diferenças estatisticamente significantes, é fácil ver, observando o (GRAF. 1), que a atividade específica da ATPase é, em geral, maior no grupo controle do que no grupo irradiado.

5. RESULTADOS

TABELA 4

Médias da atividade específica da enzima ATPase, segundo o grupo e o número de dias decorridos após a implantação da esponja, no momento do sacrifício.

Tempo	Controle	Irradiado
5	3,0983 A	4,6733 B
7	7,0650 A	6,0033 A
10	4,5483 A	4,4967 A
14	4,5650 A	3,9450 A
17	4,9950 A	4,4333 A
20	6,1783 A	4,5350 B
24	5,1367 A	5,1000 A

NOTA: Letras diferentes indicam que as médias são significativamente diferentes.

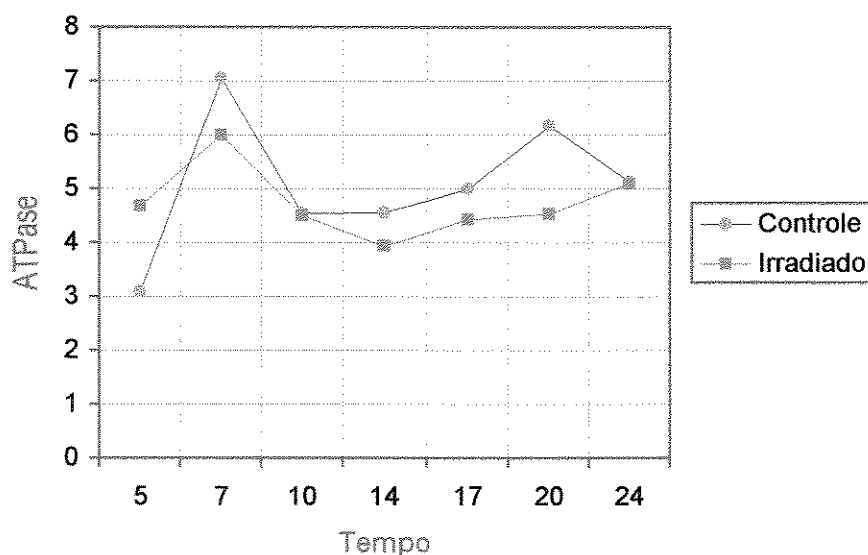


GRÁFICO 1 - Médias da atividade específica da enzima ATPase, segundo o grupo e o número de dias decorridos após a implantação da esponja, no momento do sacrifício.

5. RESULTADOS

B - ATIVIDADE ESPECÍFICA DA ENZIMA FOSFATASE ALCALINA

Os dados sobre a atividade específica da enzima fosfatase alcalina dos 84 ratos no momento do sacrifício, segundo o grupo e o número de dias decorridos após a implantação da esponja, estão apresentados na (TAB. 5).

TABELA 5

Atividade específica da fosfatase alcalina, segundo o grupo e o número de dias decorridos após a implantação da esponja, no momento do sacrifício.

Tempo	Controle			Irradiado		
5	1,556	1,036	1,390	1,720	1,292	2,125
	1,406	1,294	1,575	1,728	1,301	1,017
7	0,634	0,999	1,382	1,746	0,917	0,277
	0,845	0,685	0,801	0,775	0,468	1,914
10	1,745	1,663	2,330	2,238	1,735	1,831
	2,007	1,939	1,779	2,857	1,568	1,674
14	1,518	1,643	1,658	1,536	1,915	1,740
	1,352	1,107	1,631	2,152	1,715	1,755
17	2,435	1,714	1,884	1,724	1,347	1,576
	1,937	2,115	1,529	1,523	1,575	3,137
20	1,744	1,851	2,200	1,387	1,632	2,084
	1,420	1,820	1,176	1,129	1,278	1,611
24	1,935	1,698	1,311	1,176	2,432	1,903
	1,764	2,895	2,132	1,446	1,526	1,579

Para verificar se a irradiação e o tempo decorrido após a implantação da esponja têm efeito sobre a atividade específica da fosfatase

5. RESULTADOS

alcalina, submeteram-se os dados apresentados na (TAB. 5) à análise de variância. Essa análise está apresentada na (TAB. 6).

TABELA 6

Análise de variância para os dados apresentados na (TAB. 5).

Causas da variação	G.L	Q.M	F	P
Tempos	6	1,3655	8,08	0,0000
5	1	0,0715	0,42	0,5247
7	1	0,0470	0,28	0,6060
10	1	0,0161	0,10	0,7563
14	1	0,3021	1,79	0,1823
17	1	0,0448	0,26	0,6150
20	1	0,0990	0,59	0,5471
24	1	0,2332	1,38	0,2424
Resíduo	70	0,1690		

Existe diferença estatística entre as médias de tempos. Para comparar essas médias, duas a duas, optou-se pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância. Com base nesse teste, pode-se afirmar que, decorridos 7 dias da implantação da esponja, a fosfatase alcalina apresenta, em média, menor atividade que aos 10, 14, 17, 20 e 24 dias. Então, a atividade da fosfatase alcalina aumenta significativamente após os 7 dias, nos dois grupos.

5. RESULTADOS

TABELA 7

Médias da atividade específica da enzima fosfatase alcalina, segundo o número de dias decorridos após a implantação da esponja, no momento do sacrifício.

Tempo	Média de tempos
5	1,4533 AB
7	0,9536 B
10	1,9472 A
14	1,6435 A
17	1,8747 A
20	1,6110 A
24	1,8164 A

NOTA: Letras diferentes indicam que as médias são significativamente diferentes.

Não existe diferença estatística entre as médias de grupos em cada tempo, conforme mostram os valores *F* da (TAB. 6) Essas médias estão apresentadas na (TAB. 7) e no (GRAF. 2). É fácil ver, observando esse gráfico, que embora não existam diferenças significantes entre grupos, a atividade da enzima é maior no grupo irradiado até os 14 dias e, dos 17 dias em diante, no grupo controle.

5. RESULTADOS

TABELA 8

Médias da atividade específica da enzima fosfatase alcalina, segundo o grupo e o número de dias decorridos após a implantação da esponja, no momento do sacrifício.

Tempo	Controle	Irradiado
5	1,3762	1,5305
7	0,8910	1,0162
10	1,9105	1,9838
14	1,4848	1,8022
17	1,9357	1,8137
20	1,7018	1,5202
24	1,9558	1,6770

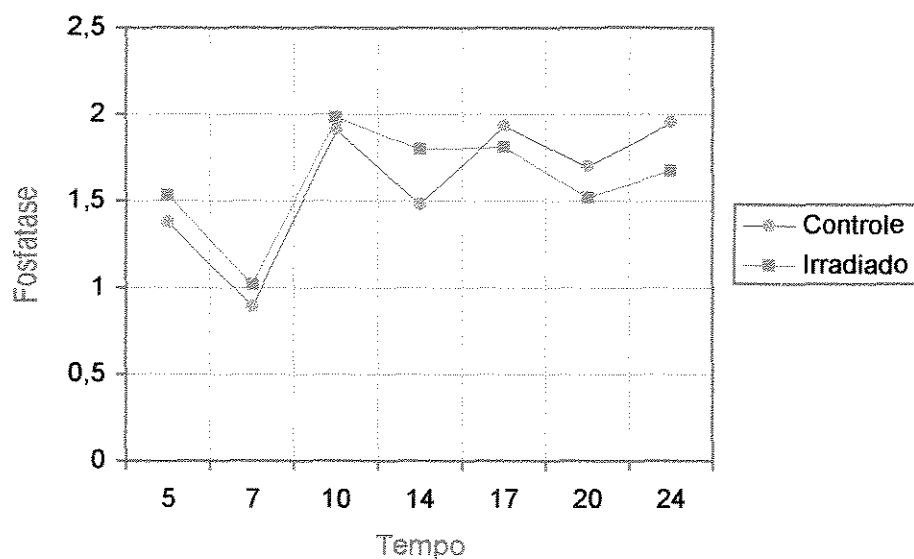


GRÁFICO 2 - Médias da atividade específica da enzima fosfatase alcalina, segundo o grupo e o número de dias decorridos após a implantação da esponja, no momento do sacrifício.

5. RESULTADOS

C - ATIVIDADE ESPECÍFICA DA ENZIMA 5' NUCLEOTÍDEO FOSFODIESTERASE

A (TAB. 9) apresenta os dados sobre a atividade específica da enzima fosfodiesterase nos 84 ratos estudados, segundo o grupo e o número de dias decorridos após a implantação da esponja, no momento do sacrifício.

TABELA 9

Atividade específica da enzima fosfodiesterase, segundo o grupo e o número de dias decorridos após a implantação da esponja, no momento do sacrifício.

Tempo	Controle			Irradiado		
5	1,011	0,911	1,034	1,813	0,992	1,695
	1,080	0,858	1,320	1,277	1,599	1,921
7	1,500	1,398	1,382	1,898	2,285	1,192
	1,237	1,977	1,639	1,431	1,682	2,388
10	1,089	1,124	1,492	0,965	1,940	1,596
	0,751	1,603	1,924	1,694	1,714	1,405
14	1,155	1,073	1,025	1,013	1,180	0,994
	1,006	0,752	0,615	1,537	0,942	1,556
17	1,371	1,207	1,270	0,809	0,743	1,103
	0,951	1,994	0,968	0,720	0,988	1,118
20	0,964	0,710	0,938	1,128	1,118	1,013
	1,030	1,630	1,351	1,261	1,360	1,237
24	1,099	1,623	1,140	1,373	2,690	1,405
	1,363	1,514	0,271	1,299	2,089	1,174

A análise de variância para os dados apresentados na (TAB. 9) está na (TAB. 10). Os valores F , nesta tabela, mostram que existe diferença

5. RESULTADOS

estatística entre as médias de tempos. Essas médias estão apresentadas na (TAB. 11).

TABELA 10

Análise de variância para os dados apresentados na (TAB. 9).

Causas da variação	G.L	Q.M	F	P
Tempos	6	0,5689	4,58	0,0006
5	1	0,7921	6,38	0,01323
7	1	0,2532	2,03	0,15415
10	1	0,1476	1,18	0,27891
14	1	0,2123	1,71	0,19239
17	1	0,4332	3,49	0,06264
20	1	0,0203	0,16	0,68967
24	1	0,7600	6,12	0,01503
Resíduo	70	0,1242		

TABELA 11

Médias da atividade específica da enzima fosfodiesterase, segundo o grupo e o número de dias decorridos após a implantação da esponja, no momento do sacrifício.

Tempo	Média de tempos
5	1,2926 AB
7	1,6674 A
10	1,4414 AB
14	1,0707 B
17	1,1035 B
20	1,1450 B
24	1,4200 AB
Média	1,3058

NOTA: Letras diferentes indicam que as médias são significantemente diferentes.

5. RESULTADOS

Com base no resultado do teste *F* e nos resultados do teste de Tukey ao nível de 5% de significância apresentados na (TAB. 11), pode-se afirmar que, decorridos 7 dias após a implantação da esponja, a atividade da fosfodiesterase é, em média, maior do que decorridos 14, 17 e 20 dias após a implantação da esponja. Então, a atividade da fosfodiesterase atinge um pico aos 7 dias e depois decresce.

As médias de fosfodiesterase em cada grupo e em cada tempo estão apresentadas na (TAB. 12) e no (GRAF. 3). Existe diferença estatística entre as médias de grupos nos tempos 5, 17 e 24 dias. Os valores de fosfodiesterase são, em média, maiores no grupo irradiado do que no grupo controle; mas, aos 17 dias, a média do grupo controle foi significativamente maior do que no grupo irradiado.

TABELA 12

Médias da atividade específica da enzima fosfodiesterase, segundo o grupo e o número de dias decorridos após a implantação da esponja, no momento do sacrifício.

Tempo	Controle	Irradiado
5	1,0357 A	1,5495 B
7	1,5222 A	1,8127 A
10	1,3305 A	1,5523 A
14	0,9377 A	1,2037 A
17	1,2935 A	0,9135 B
20	1,1038 A	1,1862 A
24	1,1683 A	1,6717 B

NOTA: Letras diferentes indicam que as médias são significativamente diferentes.

5. RESULTADOS

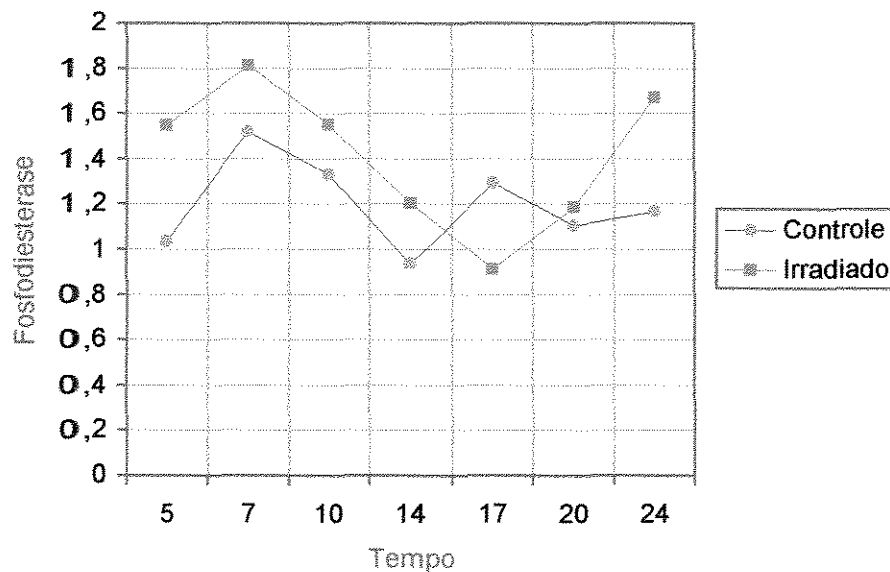


GRÁFICO 3 - Médias da atividade específica da enzima fosfodiesterase, segundo o grupo e o número de dias decorridos após a implantação da esponja, no momento do sacrifício.

6. DISCUSSÃO

6. DISCUSSÃO

6. DISCUSSÃO

6. DISCUSSÃO

Procurando estudar o comportamento do processo de cicatrização em feridas que receberam baixas doses de radiação, pudemos observar, na literatura, que os efeitos da radiação X na terapia de câncer, como citam MILLER & RUDOLPH²⁰, 1990, têm os sintomas agudos e as alterações dérmicas crônicas resolvidas dentro de um prazo de seis meses, sendo que a hipóxia que ocorre no tecido subcutâneo, na fase aguda da injúria, torna-se menos evidente onze semanas após a irradiação, estando com valores acima de 20mmHg, nível necessário para síntese e acúmulo de colágeno. Os autores citam, ainda, que

6. DISCUSSÃO

alguns experimentos sugerem que a radiação ionizante tem efeito direto na proliferação de fibroblastos, que são responsáveis pela reposição do colágeno, fato que também foi observado por EHRLICHMAN *et al.*⁹, 1991, ao estudarem vários mediadores celulares e bioquímicos requeridos na cicatrização de feridas, em que a cicatrização por segunda intenção depende da formação do tecido de granulação, e feridas irradiadas apresentam tecidos danificados tais como isquemia tecidual secundária, endoartrite obliterativa progressiva com fluxo sangüíneo diminuído e efeito direto nos fibroblastos e sua proliferação, efeito este também citado por BERNSTEIN *et al.*³, 1993, que mencionam a diminuição e a habilidade de deposição e remodelamento do colágeno e conseqüente déficit na cicatrização.

Utilizando baixas doses, porém, de radiação X, ABDALLA *et al.*¹, 1991 e WATANABE *et al.*²⁹, 1994, encontram resultados que mostraram uma inibição parcial na evolução do tecido de granulação sendo mais intensa nas fases iniciais da evolução do tecido. Resultados estes que coincidem com as alterações nas atividades das enzimas por nós estudadas, embora, no nosso caso, a radiação utilizada tenha sido de elétrons e 1,0 Gy, portanto maior. LOURENÇO¹⁷, 1998, também encontrou um atraso na cicatrização de feridas irradiadas, com e sem suturas, porém como nos dois autores acima citados, ao final de vinte e oito dias a reparação tecidual se apresentava normal.

Utilizando doses duas e quatro vezes maiores do que as por nós utilizadas, e de radiação X, portanto mais penetrante, YUKAWA & NAKAZAWA³¹, 1973, encontraram um aumento nas atividades da adenosina trifosfatase e da iosina difosfatase, enquanto que a atividade da glucose-6-fosfatase foi menor do que no grupo controle, para o mesmo tempo. Do mesmo modo, BHATAVDEKAR *et al.*⁴, 1973, estudaram bioquimicamente o efeito de uma dose de 120 R de radiação X, na atividade de enzimas e entre elas a fosfatase alcalina e ácida, e encontraram uma diminuição significativa na atividade dessas enzimas, mesmo depois de setenta e duas horas de recuperação, resultado este que difere

6. DISCUSSÃO

dos nossos, já que nós encontramos um aumento de atividade na fosfatase alcalina.

Contudo devemos salientar que, em nosso estudo, embora a dose seja muito próxima, utilizamos radiação de elétrons com profundidade de apenas 1cm e somente no local da injúria, enquanto que os autores citados utilizaram dose de corpo todo e radiação X, muito mais penetrante.

No nosso caso, os demais tecidos e o conjunto sistêmico estavam preservados. Porém, os nossos resultados foram próximos dos encontrados por KAUR *et al.*¹³, 1975, quando estudaram as atividades de enzimas, e entre elas a fosfatase alcalina, em que utilizaram 400 R de radiação gama no corpo todo, um resultado que também difere dos encontrados por BHATAVDEKAR *et al.*⁴, 1973, embora essa seja uma dose quatro vezes maior e mais penetrante do que a que nós utilizamos, e o autor relata um aumento de atividade dessa enzima até o terceiro dia. Nós também encontramos um ligeiro aumento, em relação ao grupo controle, permanecendo até o décimo primeiro dia, e depois essa atividade decresce até o vigésimo primeiro dia, tempo em que a reparação foi considerada completada.

É oportuno lembrar os estudos de VIZIOLI²⁶, 1975, sobre o possível papel do grupo enzimático das fosfomonoesterases no tecido de granulação induzido, cujos resultados mostraram que a síntese de colágeno e de mucopolissacarídeos ácidos se inicia logo nos primeiros dias de desenvolvimento do tecido de granulação e atinge o ponto máximo entre quinze e vinte dias, decaindo visivelmente após esse tempo. A fosfatase alcalina tem atividade progressivamente crescente a partir do décimo dia de evolução do tecido, atingindo o máximo no décimo quinto dia. Essa atividade coincide com o período máximo de síntese de colágeno e de mucopolissacarídeos ácidos e demonstra que a fosfatase alcalina tem um papel importante na agregação do complexo colágeno-mucopolissacarídeos ácidos. Assim também, a ATPase e a 5'-nucleotidase têm a sua atividade máxima entre o décimo dia e o vigésimo dia, sendo portanto relacionadas com os processos energéticos de alta intensidade,

6. DISCUSSÃO

exigidos pelo tecido cujo metabolismo é muito alto. Baseados nesse estudo, e ao irradiarmos o tecido de granulação com 1,0 Gy de radiação de elétrons, pudemos observar um aumento da atividade da fosfatase alcalina no tecido irradiado, ainda que não significativo, quando comparado ao grupo controle, porém decrescendo após o décimo quarto dia. Esse resultado mostra um efeito marcante da radiação de elétrons sobre a atividade dessa enzima: primeiro um ligeiro aumento e depois uma diminuição em relação ao controle.

Com relação a 5'-nucleotideo fosfodiesterase, os resultados foram semelhantes a fosfatase alcalina, com um ligeiro aumento até o décimo primeiro dia, um decréscimo significativo no décimo quarto dia e um aumento no décimo sétimo e no vigésimo primeiro dia, sendo neste último significativamente maior.

Aqui também iremos notar uma influência marcante da ação da radiação de elétrons quando comparada com o grupo controle. Essa mesma ação marcante da radiação iremos observar com relação à atividade da enzima ATPase na qual temos um aumento significativo no segundo dia após a irradiação e depois um decréscimo de atividade até o vigésimo primeiro dia, mostrando resultados diferentes dos encontrados para o grupo controle.

O efeito das radiações ionizantes tem suscitado inúmeras pesquisas a respeito da ação da radiação X sobre a atividade de enzimas, e autores como PALVA²¹, 1978, MATSUDA *et al.*¹⁹, 1982, estudaram a atividade da Na-K-ATPase em olho de ratos e cobaias. BÓSCOLO *et al.*⁵, 1989, também estudando a variação de enzimas em globo ocular, só que em cães, com emprego de 7,34 R de exposição de radiação X, constataram também a predominância da redução da atividade das enzimas glutathion redutase, glucose-6-fosfato desidrogenase, B-n-acetil hexosaminidase e fosfatase ácida. Já KRIZALA *et al.*¹⁶, 1980, estudaram a ação da fosfatase alcalina e de suas isoenzimas no soro sangüíneo, em cães irradiados com 3Gy de radiação gama no corpo todo, e também encontraram uma diminuição pronunciada principalmente nessas últimas.

6. DISCUSSÃO

CATRAVAS *et al.*⁶, 1988, estudaram os efeitos de 30 GY de radiação X nas enzimas pulmonárias convertoras de angiotensina e 5'-nucleotidase, e constataram também uma diminuição na ação dessas enzimas.

Comparando os nossos resultados com os de TOSONI²⁴, 1992, iremos notar algumas diferenças, tais como: na ATPase, nós encontramos uma atividade diminuída até o vigésimo primeiro dia, porém significativa somente nos segundo e décimo sétimo dias, e TOSONI²⁴, 1992, não encontrou essa significância; na fosfatase alcalina esse autor encontrou uma maior atividade no décimo quarto dia, enquanto que nós encontramos uma ligeira diminuição na atividade, porém não significativa. Nos demais tempos, os resultados coincidiram, e na 5'-nucleotídeo fosfodiesterase os resultados foram semelhantes até o décimo quarto dia e depois nós obtivemos um aumento significativo da atividade até o vigésimo primeiro dia. Essa diferença nos resultados possivelmente esteja associada aos tipos e doses de radiações utilizadas, pois nós utilizamos 1,0 GY (100 rads) de elétrons com 6 MeV de energia e TOSONI²⁴, 1992, utilizou 5,7 rads de radiação X, portanto quase vinte vezes menos energia.

Outros autores que também estudaram os efeitos da radiação de elétrons na cicatrização foram CROMACK *et al.*⁷, 1993, porém utilizando doses que variaram de 800 rads no corpo todo e 2500 rads na injúria e em ambos os casos foi observado um déficit acentuado na cicatrização das feridas.

O mesmo resultado também foi observado por WANG *et al.*²⁸, 1994, que concluiu que houve retardo na cicatrização até o décimo quarto dia, e a partir deste momento houve uma similaridade entre o grupo controle e o irradiado. Esse autor utilizou radiação de elétrons de 4 MeV de energia e nós utilizamos 6 MeV de energia, energias muito próximas e os resultados foram semelhantes.

Os nossos resultados também foram coincidentes com os encontrados por ALMEIDA², 1997, em estudo histológico e histoquímico do efeito de 1,0Gy de radiação de elétrons no processo de reparo de feridas. O autor estudou a reparação em feridas irradiadas imediatamente e três dias após o ato cirúrgico e constatou que em ambos os casos houve prejuízo na cicatrização,

6. DISCUSSÃO

Em nosso estudo, e também nos de outros autores, pudemos constatar que por menor que seja a dose de radiação empregada, independente do tipo, sempre haverá um efeito, ainda que transitório, e que o organismo, ao final pode repará-lo.

7. CONCLUSÕES

7. CONCLUSÕES

7. CONCLUSÕES

7. CONCLUSÕES

Os nossos resultados nos permitem concluir que:

1 - Adenosina trifosfatase (ATPase)

- A atividade da ATPase, decorridos 5 dias após a implantação da esponja, foi maior no grupo irradiado.
- Esse incremento de atividade enzimática, no grupo irradiado, foi temporário; a partir do 7º dia, o grupo controle manteve-se na dianteira.

7. CONCLUSÕES

- Houve diferenças significantes entre os grupos nos tempos 5 e 20 dias, sugerindo a princípio uma maior geração de energia no sistema para os animais irradiados aos 5 dias, podendo estar associada a um tecido que esteja se multiplicando mais intensamente naquele exato momento.
- Para a situação do tempo de 20 dias, uma atividade enzimática apresentou-se mais acentuada no grupo controle em relação aos irradiados, sugerindo que a ausência de radiação possa estar estimulando uma maior divisão celular.

2 - Fosfatase alcalina

- Com relação à fosfatase alcalina, embora não haja diferenças entre grupos, a atividade foi maior no grupo irradiado até os 14 dias e, dos 17 em diante, no grupo controle.
- Poderíamos sugerir a partir do tempo 17 dias que a alteração da atividade enzimática causada pela radiação de elétrons de alguma forma interferiu no processo de agregação de colágeno e as glicosaminoglicanas.

3 - 5'nucleotídeo fosfodiesterase

- A atividade da enzima 5'nucleotídeo fosfodiesterase mostrou que houve diferenças significantes entre os grupos nos tempos 5, 17 e 20 dias.
- Os valores das atividades foram, em média, maiores no grupo irradiado do que no controle, mas aos 17 dias a média do grupo controle foi significativamente maior do que no irradiado.
- Pudemos notar que houve um comportamento diferente das atividades dessa enzima para os grupos; uma vez iniciado o declínio de atividade enzimática, o grupo irradiado demorou uma fração de tempo maior para reagir e aumentar a atividade enzimática e poderia induzir a uma formação não satisfatória de colágeno e glicosaminoglicanas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

1. ABDALA, C. M., *et al.* Estudo histológico da gênese e evolução do tecido de granulação sob efeito de baixas doses de radiação X. **Rev. Fac. Odont. Univ. São Paulo**, v.5, n.2, p.90-95, jul./dez. 1991.
2. ALMEIDA, S. M., **Efeito da radiação de elétrons na reparação tecidual.** Tese (Doutorado em Radiologia) - Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas, 1997. 103p.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

3. BERNSTEIN, E. F., *et al.* Biology of chronic radiation effect on tissues and wound healing. **Ci. Plast. Surg.**, v.20, n.3, p.435-453, July 1993.
4. 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.
5. BÓSCOLO, F. N., CURY, J. A., GONÇALVES, N. Estudo da variação de enzimas, provocada pelo emprego da radiação no globo ocular de cães. Utilização de baixas doses e dosimetria termoluminescente. **Rev. Odont. USP**, São Paulo, v.3, n.2, p.338-44, abr./jun. 1989.
6. 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.
7. CROMACK, D. T., *et al.* Acceleration of tissue repair by transforming growth factor β_1 : Identification of in vivo mechanism of action with radiotherapy-induced specific healing deficits. **Surg.**, v.113, n.1, p.36-42, Jan. 1993.
8. DRAKE, D. B., OISHI, S. N. Wound healing considerations in chemotherapy and radiation therapy. **Clin. Plast. Surg.**, v.22, n.1, p.31-37, jan. 1995.

9. EHRLICHMAN, R. J., *et al.* Common complications of wound healing. **Surg. Clin. North Am.**, v.71, n.6, p.1323-1351, Dec. 1991.
10. FISKE, C. H., SUBBAROW, Y. The colorimetric determination of phosphorus. **J. Biol. Chem.**, v.66, p.375-400, 1925.
11. FOWLER, J. F., *et al.* The effect of divided doses of 15 MeV electrons on the skin response of mice. **Int. J. Rad. Biol.**, v.9, n.3, p.241-252, Sep. 1965.
12. HOBBS, C. H., Mc. CLELLAN, R. O. Radiation and radioactive materials. *In*: CASARETI, L. J. **Toxicology, The basic science of poisons**. 2.ed. New York. Macmillan Publishing CO. Inc., 1980. cap.19, p.497-530.
13. 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.
14. KELLY, S. J., BUTLER, L. G. Enzyme hydrolysis of phosphonate esters. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v.66, p.316-21, 1975.
15. 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.

16. 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.
17. LOURENÇO, R. M. **Efeito de baixas doses de radiação X em feridas suturadas e não suturadas.** Dissertação (Mestrado em Radiologia) - Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas, 1998, 93 p.
18. LOWRY, O. H., *et al.* Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.**, v.193, p.265-75, 1951.
19. MATSUDA, H., GIBLIN, F. J., REDDY, V. N. The effect o X-irradiation on Na-K-ATPase and cation distribution in rabbit lens. **Invest. Ophtalmol. Via. Sci.**, v.22, p.180-5, 1982.
20. MILLER, S. H. & RUDOLPH, R. Healing in the Irradiated Wound. **Clin. Plast. Surg.**, v.17, n.3, p.503-508, July 1990.
21. 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 Ophtalmol**, v.56, p.431-8, 1978.

22. 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.
23. 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.
24. TOSONI, G. M. **Estudo da atividade enzimática em tecidos de granulação de ratos submetidos a baixas doses de radiação.** Tese (Mestrado em Radiologia) - Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas, 1992, 63p.
25. VIEIRA, S. Análise de variância. In: _____, **Introdução à bioestatística** Rio de Janeiro: Editora Campus Ltda, 1981. cap.14, p.223-45.
26. VIZIOLI, M. R. **Relação entre fosfomonoesterases e a síntese de colágeno e mucopolissacarídeos ácidos no tecido de granulação.** Tese (Docência Livre) - Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas, 1975. 61p.
27. 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 CH3 mice. **Beitr. Pathol. Bd.**, v.151, p.234-47, 1974.

28. WANG, Q., *et al.* Electron irradiation slows down wound repair in rat skin: a morphological investigation. **British Journal of Dermatology.**, v.130, p.551-560, 1994.
29. WATANABE, P. C. A., *et al.* Efeitos de baixas doses de radiação sobre a gênese e evolução do tecido de granulação. **Rev. Odontol. Univ. São Paulo**, v.8, n.2, p.137-143, abr./jun. 1994.
30. WILLIAMS, P. C., HUNTER, R. D., JACKSON, S. M. Whole body electron therapy in mycosis fungoides - a successful translational technique achieved by modification of an established linear accelerator. **British Journal of Radiology.**, v.52, n.616, p.302-307, April 1979.
31. 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.