

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

Guilherme Monteiro TOSONI*

Frab Norberto BÓSCOLO**

Jaime Aparecido CURY***

Plauto Christopher Aranha WATANABE****

- **RESUMO:** No presente trabalho procurou-se pesquisar a atividade das enzimas fosfatase alcalina, 5' nucleotídeo fosfodiesterase e adenosina trifosfatase (ATPase) no tecido de granulação induzido por implantação de esponjas de polivinil (PVC) no tecido subcutâneo de ratos submetidos a baixas doses de raios X. Cento e quatorze ratos Wistar foram divididos em três 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 três enzimas nos dias 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 7 e mais baixa nos dias 28 e 21. Não foi observada alteração no comportamento da atividade da enzima adenosina trifosfatase (ATPase), quando os três grupos foram comparados.
- **PALAVRAS-CHAVE:** Fosfatase alcalina; fosfodiesterases; adenosina trifosfatase; radiação.

Introdução

Desde a descoberta dos raios X a radiação ionizante tem sido largamente estudada. Esta descoberta trouxe considerável progresso à ciência em geral, particularmente à saúde, quando houve um avanço significativo, tanto no auxílio ao diagnóstico como na terapêutica de inúmeras doenças.

* Departamento de Diagnóstico e Cirurgia - Faculdade de Odontologia - UNESP - 14801-903 - Araraquara - SP.

** Departamento de Diagnóstico Oral - Faculdade de Odontologia - UNICAMP - 13414-900 - Piracicaba - SP.

*** Departamento de Ciências Fisiológicas da Faculdade de Odontologia - UNICAMP - 13414-900 - Piracicaba - SP.

**** Departamento de Estomatologia - Faculdade de Odontologia - USP - 14040-904 - Ribeirão Preto - SP.

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

Desde então, surgiram pesquisas visando a um melhor entendimento dos efeitos deletérios da radiação em tecidos e a esclarecer a necessidade de se tomar corretas medidas de proteção.

Essas pesquisas, em sua grande maioria, utilizaram-se de altas doses de radiação, geralmente empregadas em radioterapia. Contudo, há na literatura uma escassez de pesquisas sobre os efeitos biológicos causados por baixas doses de raios X (Bailey²), que são geralmente empregadas no radiodiagnóstico e, em particular, na odontologia.

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

Na literatura, encontramos poucos trabalhos sobre o efeito de baixas doses de raios X no processo de reparo de tecidos (Raveli et al.,²¹ Abdalla et al.,¹) que mostram alterações morfológicas do tecido irradiado, de onde se conclui haver um atraso ou retardo na reparação do tecido.

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

Em 1975, Vizioli²⁶ estudou a relação entre fosfomonoesterases e a síntese de colágeno e mucopolissacarídeos ácidos no tecido de granulação e descobriu a importância que as enzimas fosfatase alcalina, adenosina trifosfatase (ATPase) e 5' nucleotidase têm no processo de desenvolvimento desse tecido. Tal fato nos despertou para um estudo do efeito da radiação sobre a atividade de enzimas e sua relação com a formação do tecido de granulação.

Sendo assim, nos propusemos a estudar o efeito da radiação sobre a atividade das enzimas fosfatase alcalina (EC 3.1.3.1), 5' nucleotídeo fosfodiesterase (EC 3.1.4.1) e adenosina trifosfatase (ATPase) (EC 3.6.1.3) em tecido de granulação submetido a baixas doses de raios X.

Material e método

Foram utilizados 114 ratos Wistar (*Rattus Norvegicus Albinus*) machos, pesando entre 150 e 180 gramas, os quais após anestesiados com éter etílico foram depilados na região dorsal mediana-traseira para em seguida proceder-se à incisão de aproxi-

madamente 15 mm, perpendicularmente ao longo do eixo da coluna vertebral. Depois de feita a divulsão dos tecidos com uma tesoura de ponta romba, introduziu-se fragmento de esponja de Polivinil (PVC), na forma de disco com 8 mm de diâmetro por 4 mm de espessura, a cerca de 20 mm da incisão, evitando-se assim que a formação de tecido de granulação na esponja fosse prejudicada pela cicatrização da incisão.

Após implantadas as esponjas, os animais foram divididos em três grupos: Grupo I – controle, Grupo II – irradiado com dose única e Grupo III – irradiado com dose dividida.

Foi utilizado um aparelho de raios X GE 1000 eletrônico, modelo 46-158840 GI, operando com 65 kVp e 10 mA. Acoplado ao cabeçote do aparelho foi utilizado um colimador metálico de 120 mm de comprimento por 20 mm de diâmetro, padronizando a distância foco-lesão.

Os animais do Grupo II foram irradiados com uma única dose de 7,14 R, logo após a implantação da esponja. Os animais do Grupo III receberam 7,14 R de forma dividida, 6 segundos de exposição logo após o implante da esponja, no 3º e 5º dias seguintes.

Os animais foram todos sacrificados com inalação de clorofórmio nos 7º, 11º, 14º, 21º e 28º dias de desenvolvimento do tecido.

As esponjas com os tecidos de granulação foram retiradas e rapidamente lavadas em NaCl 0,9%, sendo o excesso de solução removido por compressão entre duas folhas de papel de filtro, em seguida os tecidos foram pesados.

O tecido foi homogeneizado em tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 7,4, contendo Mercaptoetanol 1 mM e EDTA 1 mM (Sasaki & Nicolau²³), na proporção de 1:10 (p/v), em homogeneizador tipo Potter-Elvehjem, marca Marconi, modelo TE 099. O homogenado foi centrifugado a 11000 x g durante 2 minutos.

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

A atividade da fosfatase alcalina foi medida de acordo com o método de Kelly & Butler⁸, usando p-nitrofenilfosfato como substrato. A atividade da 5' nucleotídeo fosfodiesterase foi determinada segundo Kelly et al.⁹ e a da adenosina trifosfatase de acordo com Seidel & Gergely.²⁴ O fósforo liberado foi medido pelo método de Fiske & Subbarow.⁵

Foi estipulado para a fosfatase alcalina e 5' nucleotídeo fosfodiesterase que uma unidade de atividade enzimática é a quantidade de enzima capaz de liberar 1 umol de produto por minuto, a uma temperatura de 30°C; para a ATPase, a unidade de atividade enzimática é a quantidade de enzima capaz de liberar 1 ug de fósforo por minuto, a uma temperatura de 30°C.

A proteína foi determinada de acordo com Lowry et al.,¹¹ usando como padrão a albumina de soro bovino.

Resultado

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

Tabela 1 - Atividade da fosfatase alcalina (U/mg de proteína) (média \pm SD*) dos tecidos de granulação, segundo os diferentes períodos de tempo (dias após o implante) e grupo

GRUPO	MEDIDAS	TEMPO				
		7	11	14	21	28
I	\bar{x}	0,49	0,81	0,78	0,50	0,50
	SD	0,12	0,61	0,18	0,06	0,18
II	\bar{x}	0,62	0,71	1,01	0,58	0,41
	SD	0,07	0,15	0,10	0,13	0,10
III	\bar{x}	0,69	0,81	0,66	0,49	0,39
	SD	0,19	0,14	0,11	0,06	0,18

* Desvio Padrão

Tabela 2 - Atividade da 5' nucleotídeo fosfodiesterase (U/mg de proteína) (média \pm SD) do tecido de granulação, segundo os diferentes períodos de tempo (dias após o implante) e grupo

GRUPO	MEDIDAS	TEMPO				
		7	11	14	21	28
I	\bar{x}	0,50	0,57	0,59	0,48	0,41
	SD	0,13	0,12	0,15	0,16	0,18
II	\bar{x}	0,71	0,62	0,63	0,44	0,56
	SD	0,17	0,15	0,05	0,09	0,17
III	\bar{x}	0,69	0,53	0,81	0,35	0,49
	SD	0,13	0,14	0,32	0,11	0,17

Tabela 3 – Atividade enzimática da ATPase (U/mg de proteína) (média \pm SD) do tecido de granulação, segundo os diferentes períodos de tempo (dias após o implante) e grupo

GRUPO	MEDIDAS	TEMPO				
		7	11	14	21	28
I	\bar{x}	2,99	5,12	9,08	4,82	7,03
	SD	0,49	1,99	1,39	0,84	0,82
II	\bar{x}	2,81	4,46	9,06	4,69	6,76
	SD	0,48	0,33	1,81	0,31	1,41
III	\bar{x}	3,74	5,47	9,86	4,64	6,57
	SD	0,93	1,25	2,05	0,56	0,65

Através da análise de variância²⁵ dos resultados obtidos, em nível de 5% de significância, foram constatadas algumas diferenças significativas. Compararam-se, então, as médias de tempo dentro do grupo e grupo dentro do tempo através do Teste de Tukey,²⁵ onde as d.m.s. para a fosfatase alcalina, 5' nucleotídeo fosfodiesterase e adenosina trifosfatase são respectivamente 0,21, 0,25 e 1,81.

Dessa maneira, a atividade da fosfatase alcalina no Grupo I foi maior nos dias 11 e 14 e no Grupo II, no 14º dia, com relação aos demais períodos do mesmo grupo. No Grupo III, a atividade foi maior nos dias 11, 7 e 14, e mais baixas nos dias 21 e 28. Quando comparamos os grupos dentro de cada tempo, podemos observar que no 14º dia o Grupo II mostrou atividade enzimática significativamente maior que o Grupo I e III. Nos demais dias, não houve diferença significativa entre os grupos.

Com relação à 5' nucleotídeo fosfodiesterase, observamos que não há diferença significativa entre os dias no Grupo I; porém, no Grupo II, o 7º dia apresentou maior atividade, e o 21º dia foi de menor atividade; no Grupo III a atividade foi maior nos dias 14 e 7 e mais baixa nos dias 28 e 21. Não houve diferença significativa entre os três grupos quando analisados dentro de cada dia.

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

Discussão

Considerando ser a síntese de colágeno dependente da atividade enzimática e ser possível haver um efeito da radiação sobre essa atividade, encontramos em nosso trabalho que a enzima fosfatase alcalina, no Grupo II, apresentou-se com a atividade aumentada por volta do 14º dia, com 29,5% maior do que no mesmo período no grupo controle, resultado esse também encontrado por Wachsmuth & Torhorst²⁷ e Kaur et al.,⁷ que estudaram esta enzima em intestino de ratos, com doses de 1.200 R e 400 R, respectivamente, sendo que no 9º dia após a radiação havia uma diminuição dessa enzima em relação ao controle.

No Grupo III, que recebeu o mesmo montante de radiação, porém dividido, a fosfatase alcalina esteve com sua máxima atividade no 11º dia, menor, contudo, do que no Grupo II, e praticamente igual ao grupo controle.

Ainda com respeito à dose, autores como Bhatavdekar et al.,³ que utilizaram 120 R de raios X, Krizala et al.,¹⁰ 3.0 Gy de radiação gama, obtiveram em seus trabalhos uma diminuição da atividade da fosfatase alcalina, o que difere dos nossos resultados. Contudo, as doses foram muito superiores e, portanto, mais lesivas.

Com relação à enzima 5' nucleotídeo fosfodiesterase, pudemos observar pelos resultados que a atividade foi diferente do que ocorreu no grupo controle, que não apresentou diferença significativa entre os dias. Catravas et al.⁴ encontraram uma diminuição da atividade da 5' nucleotidase, porém em pulmão de coelhos expostos a 30 Gy de raios X.

A atividade enzimática da adenosina trifosfatase foi semelhante nos três grupos estudados, como observamos nos resultados, o que está de acordo com Vizioli,²⁶ e com Palva,¹⁵ quando dizem que 1.500 R de raios X não afetam primariamente a atividade da ATPase. Já Yukawa & Nakazawa²⁸ observaram um aumento da atividade. Matsuda et al.¹² também encontraram resultados diferentes dos nossos: com 2.000 rads de raios X, observaram uma diminuição da atividade enzimática nas 3ª e 4ª semanas, e, nas 7ª e 5ª, após a irradiação, esta atividade aumentou.

Autores como Abdalla et al.,¹ Grillo & Potsaid,⁶ Maximow,¹³ Nathanson,¹⁴ Pohle & Ritchie,¹⁶ Pohle et al.,^(17,18) Powers et al.,¹⁹ Raveli et al.,²¹ Ritchie²² estudaram histológica e/ou macroscopicamente o efeito das radiações X sobre o tecido de reparo e observaram um atraso nesse processo, com exceção de Nathanson¹⁴ que, com baixas doses, encontrou uma aceleração no processo de reparo, e também de Pohle et al.,¹⁷ que não encontraram diferença no tempo de cura entre as porções irradiadas e não irradiadas.

Rantanen²⁰ expôs o tecido de granulação à irradiação no 3º, 7º e 15º dia após a implantação, observando diferentes alterações no colágeno nessas fases. No 3º dia, constatou uma diminuição no conteúdo e aumento na solubilidade do colágeno, e a síntese de colágeno não excedeu àquela do tecido controle, fato por nós comprovado.

Considerando que Vizioli²⁶ relacionou a atividade das enzimas estudadas com o desenvolvimento do tecido de granulação, poderíamos levantar a hipótese de um mecanismo de ação da radiação sobre o desenvolvimento desse tecido. Poderíamos sugerir que a alteração da atividade da fosfatase alcalina, causada pela radiação, de alguma forma interfere no processo de agregação do colágeno sob a forma de feixes, realizado por meio das glicosaminoglicanas, talvez agindo na formação das cadeias de carboidratos necessárias ao processo.

Com relação à 5' nucleotídeo fosfodiesterase notamos uma alteração no comportamento desta enzima nos grupos irradiados. A sua atividade está relacionada à síntese dos ácidos nucléicos e conseqüente aumento do giro de nucleotídeos. Assim, poderíamos considerar que, de alguma forma, essa alteração enzimática poderia induzir a uma formação não satisfatória de colágeno e glicosaminoglicanas, assunto interessante para um estudo mais aprofundado.

Conclusão

1. A radiação X, aplicada nas condições da presente pesquisa, produziu alteração na atividade das enzimas fosfatase alcalina e 5' nucleotídeo fosfodiesterase, retiradas de tecido de granulação induzido pela implantação de esponjas de PVC em ratos.

2. Com uma única dose de radiação X (7,14 R), a enzima fosfatase alcalina mostrou uma maior atividade no 14º dia, em relação ao grupo controle e ao grupo irradiado de forma dividida.

3. A atividade da enzima 5' nucleotídeo fosfodiesterase no grupo controle foi semelhante em todos os dias estudados. Porém, o grupo irradiado com uma única dose mostrou-se maior no 7º dia e menor no 21º dia.

4. A atividade da enzima 5' nucleotídeo fosfodiesterase no tecido de granulação que recebeu radiação de forma dividida foi mais alta nos dias 14 e 7, e mais baixa nos dias 28 e 21.

5. Não houve alteração no comportamento da adenosina trifosfatase (ATPase).

- **ABSTRACT:** This paper was designed to investigate in the rat subcutaneous sponge-induced granulation tissue, under low doses of X-ray, the activity of alkaline phosphatase, 5'nucleotide phosphodiesterase and adenosine triphosphatase (ATPase) enzymes. One hundred and fourteen Wistar rats were divided into three groups, as follows: Group I as control, Group II that received single 7,14 R X-ray irradiation immediately after sponge-implantation and Group III that received 7,14 R in split-dosis immediately after sponge-implantation at the 3rd and 5th days postoperatively. Biopsies were taken after 7, 11, 14, 21 and 28 days and the activity of the three enzymes was determined. The results have shown that in Group II alkaline phosphatase had higher activity in the 14th day of tissue evolution when compared to Groups I and III. The 5'nucleotide phosphodiesterase activity in Group I was similar in all days checked, although in Group II the enzyme showed higher activity in 7th day and lower in 21st. In Group III the activity was higher after 14 and 7 days and lower after 28 and 21 days. There was no observation of changing in adenosine triphosphatase (ATPase) activity when the three groups were compared.
- **KEYWORDS:** Alkaline phosphatase; phosphodiesterases; adenosine triphosphatase; radiation.

Referências bibliográficas

1. ABDALLA, C. M. et al. Estudo histológico da gênese e evolução do tecido de granulação sob efeitos de baixas doses de radiação X. *Rev. Odontol. USP*, v. 5, p. 90-5, 1991.
2. BAILEY, A. J. Effect of ionizing radiation on connective tissue components. *Int. Rev. Connect. Tiss. Res.*, v. 4 p. 233-81, 1968.
3. BHATAVDEKAR, J. M., CHINYOY, 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.
4. 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.
5. FISKE, C. H., SUBBAROW, Y. The colorimetric determination of phosphorus. *J. Biol. Chem.*, v. 66, p. 375-400, 1925.
6. GRILLO, H. C., POTSAID, M. S. Studies in wound healing. IV. Retardation of contraction by local X-radiation, and observations relating to the origin of fibroblasts in repair. *Ann. Surg.*, v. 154, p. 741-50, 1961.
7. 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.
8. KELLY, S. J., BUTLER, L. G. Enzymic hydrolysis of phosphonate esters. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v. 66, p. 316-21, 1975.
9. 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.

10. 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.
11. LOWRY, O. H. et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, v. 193, p. 265-75, 1951.
12. MATSUDA, H., GIBLIN, F. J., REDDY, V. N. The effect of X-irradiation on Na-K-ATPase and cation distribution in rabbit lens. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, v. 22, p. 180-5, 1982.
13. MAXIMOW, A. A. Studies on the changes produced by roentgen rays in inflamed connective tissue. *J. Exper. Med.*, v. 37, p. 319-40, 1922.
14. NATHANSON, I. T. The effect of the gamma-ray of radium on wound healing. *Surg. Gynecol. Obstet.*, v. 59, p. 62-9, 1934.
15. PALVA, M. The effect of X-irradiation on the sodium potassium-activated adenosine typhosphatase (Na-K-ATPase) activity in epithelium of the rat lens: a histochemical and biochemical study. *Acta Ophthalmol.*, v. 56, p. 431-8, 1978.
16. POHLE, E. A., RITCHIE, G. Studies of the effect of roentgen rays on the healing of the wounds. II – Histological changes in skin wounds in rats following post-operative irradiation. *Radiology*, v. 20, p. 102-8, 1933.
17. POHLE, E. A., RITCHIE, G., MOIR, W. W. Studies of the effect of roentgen rays on healing of wounds. III – Histological changes in skin wounds in rats following post-operative irradiation with very small and moderate doses. *Radiology* v. 52, p. 707-13, 1949.
18. POHLE E. A., RITCHIE, G. , WRIGHT, C. S. Studies of the effect of roentgen rays on the healing of wounds. I. Behavior of skin wounds in rats under pre-or post-operative irradiation. *Radiology*, v. 16, p. 445-60, 1931.
19. POWERS, W. E., OGURA, J. H., PALMER, L. A. Radiation therapy and wound healing delay. *Radiology*, v. 89, p. 112-5, 1967.
20. RANTANEN, J. Radiation injury of connective tissue. A biochemical investigation with experimental granuloma. *Acta Radiol.*, Suppl. 330, 1973.
21. RAVELI, D. B. et al. Influência da radiação X na cronologia do processo de reparo em feridas de extração dental. Estudo histomorfológico em ratos. *Rev. Odontol. USP*, v. 4, p. 119-25, 1990.
22. RITCHIE, G. Effect of roentgen irradiation on the healing of wounds. *Arch. Pathol.*, v. 16, p. 839-51, 1933.
23. 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.
24. SEIDEL, J. C., GERGELY, J. Studies on myofibrillar adenosine triphosphatase with calcium-free adenosine triphosphatase. 1 - The effect of ethylenediaminetetraacetate, calcium, magnesium, and adenosine triphosphate. *J. Biol. Chem.*, v. 238, p. 3648-53, 1963.
25. VIEIRA, S. *Introdução à bioestatística*. Rio de Janeiro: Ed. Campos, 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*. Piraciaba, 1975. Tese (Livre-Docência em Patologia) – Faculdade de Odontologia, Universidade de Campinas.

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 C3H mice. *Beitr. Pathol. Bd*, v. 151, p. 234-47, 1974.
28. 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.

Recebido em 17.6.1993.