

Roselaine Moreira Coelho

*Avaliação do Efeito Radioprotetor do
Pycnogenol® na Reparação Alveolar
em Ratos Irrradiados*

*Dissertação apresentada à Faculdade de
Odontologia de Piracicaba, da
Universidade Estadual de Campinas,
para obtenção do Título de Mestre em
Radiologia Odontológica. Área de
Radiologia Odontológica.*

Orientadora: Profa. Dra. Solange Maria de Almeida

*Piracicaba
2007*

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA**
Bibliotecário: Marilene Girello – CRB-8ª. / 6159

C65a Coelho, Roselaine Moreira.
Avaliação do efeito radioprotetor do Pycnogenol® na
reparação Alveolar em ratos Irrradiados. / Roselaine Moreira
Coelho. -- Piracicaba, SP : [s.n.], 2007.

Orientador: Solange Maria de Almeida.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de
Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Radiação ionizante. 2. Radioterapia. 3. Alvéolo
dental. I. Almeida, Solange Maria de. II. Universidade
Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de
Piracicaba. III. Título.

(mg/fop)

Título em Inglês: Evaluation of the radioprotective effect of Pycnogenol® in the
alveolar healing in irradiated rats

Palavras-chave em Inglês (Keywords): 1. Radiation, ionizing. 2. Radiotherapy. 3.
Tooth socket

Área de Concentração: Radiologia Odontológica

Titulação: Mestre em Radiologia Odontológica

Banca Examinadora: Pedro Duarte Novaes, Solange Aparecida Caldeira
Monteiro, Solange Maria de Almeida

Data da Defesa: 26-02-2007

Programa de Pós-Graduação: Radiologia Odontológica



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Dissertação de MESTRADO, em sessão pública realizada em 26 de Fevereiro de 2007, considerou a candidata ROSELAINÉ MOREIRA COELHO aprovada.

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Solange Maria de Almeida".

PROF^a. DR^a. SOLANGE MARIA DE ALMEIDA

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "Solange Aparecida Caldeira Monteiro".

PROF^a. DR^a. SOLANGE APARECIDA CALDEIRA MONTEIRO

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "Pedro Duarte Novaes".

PROF. DR. PEDRO DUARTE NOVAES

Dedico este trabalho ...

*A Deus e a Virgem Maria pela constante proteção,
sempre guiando-me e colocando o melhor em meu caminho.*

*Aos meus pais Continentino e Maria Zélia, exemplos de honestidade, dignidade e fé. Nada
seria possível sem o apoio e o amor de vocês.*

Agradecimentos Especiais...

*À minha querida e admirável orientadora: Professora Dra. Solange Maria de Almeida.
Obrigada pelo seu carinho e paciência, por tranquilizar-me nos momentos de angústia e
por TODA sua ajuda nos momentos que mais encontrarei dificuldades.*

*Feliz aquele que transfere o que sabe e
aprende o que ensina...
(Cora Coralina)*

À minha irmã Rosilene, obrigada pela sua amizade sincera, pela sua presença em todos os momentos da minha vida e por apoiar-me sempre. Você é um presente de Deus em minha vida. Amo você!!!

Ao meu irmão Osmane e minha cunhada Lúcia pela disposição em ajudar-me. Obrigada pela amizade e por sempre ter uma palavra de incentivo e de carinho.

Aos meus irmãos Osmar, Rosemar, Rosane e meus cunhados Luis e Nixon, pelo apoio e amizade

Aos meus tão amados sobrinhos Kênia, Ivan e Renan que, mesmo sem saberem, são motivos de enorme alegria em minha vida.....

À madrinha e tia Leides pelo incentivo, carinho e por sempre ajudar-me ao longo dessa caminhada. Muito Obrigada!!!

Ao Nivaldo, obrigada pela amizade sincera, por ensinar-me a ter força e por sempre torcer para que tudo desse certo.

*O que importa não é o que você tem na vida,
mas quem você tem na vida.*

(Shakespeare)

Agradecimentos...

À Faculdade de Odontologia de Piracicaba – UNICAMP, na pessoa do seu diretor professor Dr. Francisco Haiter Neto pela oportunidade de mais esta conquista em minha vida profissional.

Ao professor Dr. Frab Norberto Bóscolo pelo exemplo de dedicação à radiologia. Obrigada por nos acolher como filhos e por tudo o que tem nos ensinado. Minha eterna admiração.

Ao professor Dr. Francisco Haiter Neto pelo exemplo de caráter e determinação.

Ao professor Dr. Flávio Ricardo Manzi a quem não tenho palavras que possam descrever meu carinho, admiração e gratidão. Obrigada pela atenção, incentivo e acima de tudo pela amizade.

Ao professor Dr. Pedro Duarte Novaes pela valiosa colaboração durante o desenvolvimento deste trabalho.

Ao professor Dr. Mário Roberto Vizioli pela disponibilidade e dedicação em nos auxiliar.

À professora Dra. Gláucia Maria Bovi Ambrosano pelo auxílio na elaboração e análise estatística dos resultados deste trabalho. Obrigada pela paciência e dedicação.

Ao professor Tasso Schusterschitz (in memoriam) exemplo de pessoa e profissional. Obrigada pela sua amizade e por ter despertado em mim o interesse pela radiologia. Meu eterno respeito e admiração. Você será inesquecível!!!

À amiga-irmã Andréa Kuroiva, às vezes também um pouco mãe, obrigada pela amizade, pela companhia e todos os bons momentos, você mora em meu coração.

Aos irmãos de coração Sérgio, Juliana Giraldi, Juliana Monteiro e Nayene. Agradeço a Deus simplesmente por vocês existirem. Minha eterna gratidão por tudo que fizeram e fazem por mim....e daro pelos bons momentos de descontração.... “Bons amigos são a família que nos permitiram escolher”.

A todos os amigos de Belo Horizonte em especial, Karina, Ivan, Juliana Gradinda, Juliana Milagres, Daniela Borges, Maria de Fátima, Bruno Justo, Renato, Marilandes e família, por sempre torcerem e acreditarem em mim. “As verdadeiras amizades continuam a crescer mesmo a longas distâncias” (Shakespeare).

À Flávia pela ajuda singular durante todo o desenvolvimento deste trabalho. Obrigada por acalmar-me nos momentos de desespero.....

Aos colegas de pós-graduação Alynne, Daniela, Ellen, Maria, Mario e Nayene (mestrado) e Adriana, Andréa Kuroiva, Andréa Pontual, Déborah, Fábio, Flávia, Janaína, Juliana, Márcia, Raphael, Sandro e Sérgio (doutorado). Obrigada pelo companheirismo, amizade e alegrias compartilhadas.

Aos funcionários da radiologia Fernando, Giselda, Roberta e Waldeck pela amizade e pela disponibilidade em nos ajudar.

Ao Departamento de Morfologia – Área de Histologia da FOP – UNICAMP por gentilmente cederem seus laboratórios para a realização da parte prática deste trabalho.

Às técnicas do laboratório de Histologia, Cidinha e Ivani, à técnica e bióloga do laboratório de Microscopia Eletrônica, Eliene, e ao Gustavo pela valiosa colaboração durante a execução da fase laboratorial. Obrigada pela atenção, amizade e alegria contagiante.

Aos colegas de pós-graduação da Histologia Cristiane Borges, Cristiane Salmon, Nádía, Juliana, Alexandre, José, Marcos e Marcelo, pela amizade e bons momentos compartilhados.

Às bibliotecárias Suely e Marilene pela atenção e auxílio na comutação dos artigos científicos e elaboração da ficha catalográfica.

Aos bioteristas Fábio e Wanderley pelo auxílio na manipulação dos animais.

Ao CEON - Centro de Oncologia do Hospital dos Fornecedores de Cana de Piracicaba, na pessoa do seu diretor Dr. Sérgio Carlos Estevan por gentilmente ceder o aparelho de radioterapia para irradiação dos animais.

Às funcionárias da área de radioterapia do CEON, Eliete, Mayra e Vilma pela presteza e eficiência que nos auxiliou quando da irradiação dos animais.

Às demais pessoas que, embora não citadas, foram de igual importância para a realização deste trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq pela concessão da bolsa de estudos.

*“O tempo muito me ensinou.
Ensinou a amar a vida.
Não desistir da luta.
Recomeçar na derrota.
Renunciar às palavras e pensamentos negativos.
Acreditar nos valores humanos.
Ser otimista.
Creio numa força imanente
Que vai ligando a família humana.
Numa corrente luminosa de fraternidade universal.
Creio na solidariedade humana.
Creio na superação dos erros e angústias do presente.
Creio nos milagres da ciência e
na descoberta de uma profilaxia futura
dos erros e violências do presente.
Aprendi que mais vale lutar...
Antes acreditar do que duvidar.”
(Cora Coralina)*

Resumo

Devido à importância da radioterapia para tratamento de lesões malignas na região de cabeça e pescoço e da freqüente necessidade de extrações dentárias associada ao tratamento, este trabalho foi realizado com a finalidade de avaliar o efeito radioprotetor do pycnogenol® (Extrato da casca da pinha marítima francesa) na reparação alveolar em ratos da variedade *Wistar*. A amostra foi composta de 100 ratos divididos em quatro grupos experimentais: controle, irradiado, pycnogenol e pycnogenol irradiado. Todos os animais foram submetidos a cirurgia para extração do incisivo superior esquerdo. Os animais dos grupos pycnogenol e pycnogenol irradiado receberam, via intragástrica, três doses de 200mg/kg de peso corpóreo de pycnogenol®, administradas 72, 48 e 6 horas anterior à irradiação *sham* e à irradiação, respectivamente. Os animais dos grupos controle e irradiado receberam na mesma proporção, três doses de solução base de carboximetilcelulose e água destilada nos mesmos intervalos de tempo. Três dias após a cirurgia, o grupo irradiado e o grupo pycnogenol irradiado foram expostos a dose única de 15Gy de radiação X na região de cabeça e pescoço. Os

animais foram sacrificados aos 4, 7, 14, 21 e 28 dias após a cirurgia. Após processamento histológico das peças, as lâminas foram coradas com Hematoxilina-Eosina para avaliação qualitativa, por meio da morfologia do tecido, e quantitativa, pela histometria óssea. Qualitativamente observou-se que o grupo irradiado e o grupo pycnogenol irradiado apresentaram padrão de reparação alveolar semelhante e atrasados em relação aos grupos controle e pycnogenol em todos os tempos de estudo. Os grupos controle e pycnogenol também se apresentaram semelhantes em todos os intervalos de tempo. Quantitativamente aos 4 dias não foi observada diferença estatisticamente significativa entre os grupos estudados. Nos demais intervalos de tempo houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos não irradiados e os grupos irradiados. Conclui-se que morfologicamente, pelas análises qualitativa e quantitativa, não se observou a ação radioprotetora do pycnogenol® no processo de reparação alveolar em ratos irradiados.

Palavras chave: Pycnogenol®, Radiação ionizante, Reparação alveolar, Radioprotetor.

Abstract

Due to importance of the radiotherapy in malignant injuries treatment in the head and neck regions and of the frequent necessity of dental extractions associated to this treatment, this study was carried through the purpose to evaluate the radioprotector effect of pycnogenol® (French maritime pine bark extract) in the alveolar healing in rats of the Wistar variety. The sample was composed of 100 rats divided in four experimental groups: *control*, *irradiated*, *pycnogenol* and *pycnogenol irradiated*. All the animals were submitted to surgery for the left superior incisor extraction. The groups *pycnogenol* and *pycnogenol irradiated* had received, orally, three doses of pycnogenol® that consisted in 200mg/kg. These doses were administrated in 72, 48 and 6 hours previous to the irradiation *sham* and the irradiation, respectively. The animals of the *control* and *irradiated groups* had received, in the same ratio, three doses of carboxymethylcellulose solution and distilled water in the same intervals of time. After three days of the surgery, the *irradiated group* and the *pycnogenol irradiated group* were exposed to a dose of 15Gy of x-radiation, in the head and neck regions. The animals were sacrificed

after the surgery in the days 4, 7, 14, 21 and 28. After histological processing and coloration by Hematoxylin-Eosin the qualitative evaluation (by the morphology of the tissue) and the quantitative evaluation (by histometric study) were proceeded. It was observed, qualitatively, that the *irradiated* and the *pycnogenol irradiated* groups had presented seemed patterns of alveolar healing and related to the *control* and *pycnogenol* groups they were delayed in all the study times. The *control* and *pycnogenol* groups also had the same features related to all the times intervals. Quantitatively after the 4 days was not observed statistically significant difference between the studied groups. In the others intervals of time there was a statistically significant difference between the *not irradiated* groups and the *irradiated* groups. It was concluded, by the qualitative and quantitative analyses, that there was not radioprotector action of pycnogenol® in the process of alveolar healing in irradiated rats.

Key words: Pycnogenol®, Ionizing radiation, Alveolar healing, Radiation-protective agents.

Sumário

1 – Introdução	1
2 – Revisão da Literatura	4
3 – Proposição	42
4 – Material e Métodos	43
5 – Resultados	51
6 – Discussão	65
7 – Conclusão	78
Referências	79
Anexo	85

1 Introdução

Desde a descoberta dos raios X, em novembro de 1895, por Wilhelm Konrad Rontgen, estes vêm sendo utilizados para fins de diagnóstico e/ou terapêutico. Apesar de seus inúmeros efeitos benéficos, os raios X podem causar efeitos deletérios aos organismos vivos. O primeiro indício desses efeitos foi observado pouco tempo após a sua descoberta, quando Emil H. Grubbé, fabricante de tubo a vácuo, apresentou dermatite localizada em sua mão.

Quando a radiação ionizante é utilizada com finalidade terapêutica, esta causa diversos efeitos colaterais devido à alta dosagem e a capacidade de ionização. Assim, pacientes submetidos à radioterapia na região de cabeça e pescoço apresentam inúmeros efeitos colaterais como perda de apetite e do paladar, além de lesões na cavidade bucal tais como mucosite, ulceração de língua e lesões leucoeritroplásicas (Coelho & Manzi, 2005). Há concordância entre vários autores que dentes apresentando prognóstico duvidoso devem ser removidos antes do tratamento radioterápico, entretanto o intervalo entre a

extração e o início da radioterapia é motivo de controvérsia (Frandsen, 1962; Starcke & Shannon, 1977; Guglielmotti *et al.*, 1986). Contudo, apesar de outros fatores associados, as exodontias realizadas após a radioterapia é indicada como a principal causa de osteorradionecrose, sendo este um dos efeitos colaterais de maior preocupação devido à complexidade de tratamento.

Na presença da radiação ionizante a cicatrização é diminuída em tecidos traumatizados cirurgicamente, em especial o osso, que além de apresentar menor resistência à infecção, pode resultar em radiosteomielite e/ou osteorradionecrose. Portanto, um marcante atraso no processo de reparação alveolar é provocado pela radiação X (Frandsen, 1962; Raveli *et al.*, 1990; Cordeiro *et al.*, 1992; Raveli *et al.*, 1996).

Entretanto, no momento que a radiação ionizante é absorvida pelos tecidos vivos, são produzidos nas células radicais livres provenientes de reações físico-químicas, principalmente a radiólise da água. Assim, várias substâncias vêm sendo pesquisadas com a finalidade de atuarem sobre os radicais livres, sendo conhecidas por essa ação como substâncias radioprotetoras, dentre elas a vitamina E e o selenito de sódio. Mais recentemente, o pycnogenol® (extrato da casca da pinha marítima francesa – *Pinus Pinaster Aiton*), por apresentar característica anti-oxidante, uma vez que possui a capacidade de reagir facilmente com os radicais livres, vem sendo estudado também como radioprotetor.

Embora sua composição química não esteja completamente elucidada, o pycnogenol® é um fitoquímico composto de moléculas fenólicas, amplamente divididas em monômeros (catequina, epicatequina e taxifolina) e principalmente flavonóides condensados classificados como procianidinas/proantocianidinas (procianidinas oligoméricas). O pycnogenol® contém também ácidos fenólicos tais como caféico, ferúlico e *p*-hidroxibenzóico e, como menores constituintes produtos da glicosilação.

Os efeitos biológicos do pycnogenol[®], mistura não vitamínica de bioflavonóides, têm sido bastante estudados tanto *in vitro*, utilizando cultura de células, quanto *in vivo*, em animais e humanos (Shimoi *et al.*, 1994; Virgili *et al.*, 1998; Grimm *et al.*, 2006) uma vez que, entre outros efeitos benéficos, o pycnogenol[®] age como poderoso antioxidante, desempenha atividade antiinflamatória, (Nelson *et al.*, 1998; Harborne & Williams, 2000; Virgili *et al.*, 2000; Saliou *et al.*, 2001) apresenta ação protetora contra radiação ultravioleta (Saliou *et al.*, 2001; Sime & Reeve, 2004) e proteção ao dano causado por radiação X em mucosa intestinal (Ramos *et al.*, 2006).

Portanto, uma vez que pacientes submetidos à radioterapia na região de cabeça e pescoço freqüentemente necessitam de extrações dentárias no decorrer do tratamento ou logo após este e de não ter sido localizado na literatura pesquisada trabalhos que avaliassem a ação de substâncias radioprotetoras em reparação óssea alveolar, esta pesquisa foi idealizada com a finalidade de avaliar o efeito radioprotetor do Pycnogenol[®] (extrato da casca da pinha marítima francesa) na reparação alveolar em ratos irradiados.

2 Revisão da Literatura

Para melhor compreensão do assunto este capítulo foi subdividido em:

2.1 – O Tecido Ósseo

2.2 - Efeitos da Radiação no tecido Ósseo

2.3 – Reparação alveolar

2.4 - Efeitos da radiação na reparação alveolar

2.5 - Flavonóides e Pycnogenol[®]

2.5.1 - Metabolismo dos flavonóides e pycnogenol[®]

2.5.2 - Mecanismo da ação antioxidante dos flavonóides e pycnogenol[®]

2.5.3 - Ação radioprotetora dos flavonóides e pycnogenol[®]

2.1) O Tecido Ósseo

Em 1980, MCINNIS *et al.*, avaliaram o relacionamento do fluxo sangüíneo no tecido ósseo, deposição de estrôncio (Sr_{85}) e nova formação óssea endosteal durante o processo de reparo ósseo. Para isso foram realizados defeitos bilaterais, de 4,4mm X 11mm, no terço distal das tíbias de oito cães e unilateralmente em quatro cães. O fluxo sangüíneo foi medido por desgaste I-Ap, (I-Ap determinado sobre a área de cicatrização óssea) assim como foi determinada a deposição do elemento marcador Sr_{85} . A formação de novo osso endosteal foi determinada por um método combinado de microradiografia e tetraciclina. Houve correlação significativa entre fluxo sangüíneo determinado por desgaste e nova formação de osso endosteal, expresso como relacionamento da área de novo osso endosteal na área total cercada pelo defeito e a cavidade medular da tíbia. Essa porcentagem variou de 12% a 62%, estando diretamente relacionada ao fluxo sangüíneo ósseo.

BRUDER *et al.*, em 1994, realizaram um estudo sobre os eventos celulares e moleculares responsáveis pela formação óssea durante a embriogênese e durante o reparo e remodelamento de fraturas. Os autores relataram que esses eventos envolvem um pequeno número de células progenitoras, chamadas células-tronco mesenquimais. A diferenciação das células-tronco mesenquimais dentro de cada linhagem é um processo bastante complexo, envolvendo discretas transições celulares. A progressão do próximo estágio celular depende da presença de fatores bioativos específicos, nutrientes e outras condições ambientais que vão contribuir para o fenômeno de diferenciação. As células-tronco mesenquimais estão em constante processo de reprodução, sendo que uma porção torna-se comprometida com a linhagem celular mesenquimal e se diferenciam em células que formarão tecidos tais como osso, cartilagem, tendão, ligamento e músculo. É relatado ainda que o entendimento dos eventos celular e molecular da diferenciação osteogênica das células-tronco

mesenquimais, fornece base para o aparecimento de uma nova tecnologia terapêutica para várias condições clínicas.

WANG, em 2000, avaliou se a orientação dos elementos da cortical óssea da diáfise é restabelecida durante 18 meses de reparação. Para tanto, foram criados cirurgicamente orifícios com brocas de 3mm de diâmetro na cortical do fêmur e da tíbia de coelhos adultos. Os animais foram sacrificados em 1, 4, 8 e 16 semanas e 6, 12 e 18 meses após a cirurgia, sendo removido a região do defeito ósseo para análise histológica por microscopia de luz e polarização. Foi observado que de 16 semanas a 12 meses, os defeitos foram reparados completamente com osso lamelar, entretanto a orientação espacial longitudinal da reparação lamelar apresentou um ângulo diferente daquele do osso original. Aos 18 meses, a organização interna dos maiores elementos microscópicos individuais (ósteons) foi reconstituída de uma maneira similar àquela do osso original; contudo a orientação espacial tridimensional dos ósteons na reparação óssea relativa ao longo eixo dos ósteons do osso original adjacente e do osso removido para criar o defeito não foi restabelecida completamente. O autor concluiu que a disposição espacial imperfeita dos elementos microscópicos do tecido ósseo pode contribuir significativamente para uma nova fratura de um osso longo, após reparo de um defeito circular como, por exemplo, a remoção de parafusos, com ou sem placas, usados para estabilização de fraturas ou osteotomia dos ossos longos.

GUYTON & HALL, em 2002, descreveram que a etapa inicial na produção do osso consiste na secreção de moléculas de colágeno e de substância fundamental pelos osteoblastos. Entretanto, há uma contínua deposição óssea pelos osteoblastos e absorção onde osteoclastos estiverem ativos, sendo que histologicamente a absorção óssea ocorre imediatamente adjacente aos osteoclastos. Esse mecanismo ocorre na seguinte seqüência: os osteoclastos emitem projeções semelhantes a vilosidades em direção ao osso. Essas vilosidades secretam dois tipos de substâncias: (1) enzimas proteolíticas que

digerem ou dissolvem a matriz orgânica do osso, e (2) vários ácidos, incluindo o ácido cítrico e o ácido láctico, que causam a solubilização dos sais ósseos. Em geral, os osteoclastos são encontrados em pequenas massas concentradas que, quando começam a se desenvolver, habitualmente corroem o osso, escavando um túnel cujo diâmetro varia de 0,2 a 1mm, com vários milímetros de comprimento. Ao final desse processo, os osteoclastos desaparecem e o túnel é invadido por osteoblastos; a seguir, começa a se desenvolver novo osso. Normalmente, exceto nos ossos em crescimento, a intensidade de deposição e de absorção óssea é igual entre si, de modo que a massa total de osso permanece constante. Nos casos de fratura óssea há uma máxima ativação dos osteoblastos além da formação de novos osteoblastos a partir das denominadas células osteoprogenitoras, que são células-tronco do osso, localizadas na membrana óssea. Após pouco tempo surge, entre as duas extremidades fraturadas do osso, grande proeminência de tecido osteoblástico e se desenvolve nova matriz óssea orgânica, seguida da deposição de sais de cálcio.

NAKASE & YOSHIKAWA, em 2006, apresentaram uma revisão da literatura em relação às proteínas ósseas morfogenéticas, fundamentais ao processo de reparação e regeneração esquelética. Os autores relataram que em algum momento as proteínas ósseas morfogenéticas desempenham papel fisiológico, enquanto que em outros elas desempenham papel patológico. Diversos membros da família das proteínas ósseas morfogenéticas, tais como proteína óssea morfogenética-2, -4, -7 (Proteína Osteogênica-1), e fator de diferenciação de crescimento-5 (Proteína morfogenética derivada de cartilagem-1), assim como suas moléculas sinalizadoras, foram identificadas durante o processo de reparo e regeneração esquelética. Essas proteínas são induzidas por estímulos, tais como o impacto de fratura e estresse mecânico em regiões submetidas à formação de tecidos ósseos. Em particular as proteínas ósseas morfogenéticas -2 e -4 podem agir como mediadores do reparo esquelético precoce e de reações regenerativas. As proteínas morfogenéticas derivadas de cartilagem-1 podem desempenhar

papéis mais distintos, tais como a promoção do reparo de condrogeneses e tendão. As proteínas ósseas morfogenéticas têm sido também identificadas em diversas desordens esqueléticas patológicas que apresentam formação óssea e de cartilagem. As ações das proteínas ósseas morfogenéticas têm sido mostradas por estudos *in vivo* e *in vitro*, sendo que a provável participação dessas proteínas em ambas as condições fisiológica e patológica, fornecem evidências para suas possíveis aplicações no tratamento de desordens ortopédicas.

2.2) Efeitos da Radiação no tecido Ósseo

O efeito da radiação X no processo de mineralização primária no osso foi estudado por SELA *et al.* (1982) através de métodos bioquímicos e ultraestrutural. Uma dose única de 1500R foi administrada na região de cabeça de ratos. Os animais foram sacrificados imediatamente e 1, 2 e 3 semanas após a irradiação para análise de frações isoladas de células e vesículas da matriz extracelular do osso alveolar maxilar. O índice de proteína e as atividades da fosfatase vesicular foram determinados em ambas as frações. Uma diminuição contínua na atividade da fosfatase alcalina foi observada em frações de células e vesículas da matriz extracelular durante as 3 semanas seguintes a irradiação. A atividade da fosfatase alcalina diminuiu somente na fração das vesículas. A análise por microscopia eletrônica de transmissão do tecido ósseo irradiado revelou que muitas vesículas da matriz extracelular apresentavam-se rompimento das membranas e ausência de cristais de apatita. Os autores sugerem que a irradiação interfere nos processos enzimáticos associados com a mineralização óssea primária.

ALTOBELLI *et al.* (1987), compararam a cicatrização de enxertos de costela, livre e microvascular e dos tecidos adjacentes a um defeito ósseo mandibular irradiado. Foram utilizados 9 cães dos quais foi extraído os dentes

canino, pré-molares, primeiro e segundo molares inferiores, bilateralmente, pelo menos 12 semanas antes do início da irradiação. Um animal foi submetido apenas a extração sendo o controle. As mandíbulas foram irradiadas, bilateralmente, com 50Gy de radiação gama fracionados em 20 sessões de 2,5Gy durante um período de 4 semanas. Os enxertos foram colocados 18 a 28 dias após o término da irradiação e os animais sacrificados de 2 a 40 semanas após o enxerto. No cão controle, sacrificado em 32 semanas, não houve nenhum desarranjo intra ou extra-oral, em ambos os lados da mandíbula; já os animais do grupo irradiado apresentaram uma diferença marcante na integridade da mucosa alveolar com os dois enxertos. A união do enxerto ósseo microvascular ao osso receptor ocorreu dentro de seis semanas. Por outro lado, após este período o enxerto livre apresentava-se isolado em todos os animais. Um achado inesperado com ambos os tipos de enxerto foi a marcante formação óssea subperiosteal. O quadro histológico em 32 semanas foi de osso maturo, em 40 semanas ambos enxertos nas mandíbulas irradiadas tinham uma aparência histológica comparável com o enxerto controle. Os autores sugerem que o perióstio irradiado pode desempenhar um importante papel na osteogênese.

LORENTE *et al.*, em 1992, tiveram como objetivo desenvolver um sistema de modelo de ratos para mandíbula irradiada, examinando a contribuição do perióstio, do tecido mole e do osso, na reparação de um defeito ósseo em uma área irradiada. Foi avaliado o efeito do tempo de reparação de cirurgia após irradiação. A contribuição do componente tecidual na reparação de defeito ósseo foi estudada usando pó de osso desmineralizado irradiado ou não. Os animais foram irradiados com dose total de 45Gy de Cobalto 60 e a cirurgia para produção do defeito ósseo no ramo mandibular foi realizada 2 ou 4 semanas depois de completada a irradiação. Os animais foram sacrificados 4 semanas após a cirurgia. A melhor reparação do defeito ósseo ocorreu no grupo controle no qual foi produzido apenas o defeito ósseo e não foi irradiado e não houve enxerto com pó de osso desmineralizado. Em mandíbulas não irradiadas e preenchidas por pó

de osso desmineralizado não irradiado a região sem osso sólido era significativamente menor, entretanto a reparação do defeito ósseo nesse grupo foi superior ao grupo tratado com pó de osso desmineralizado não irradiado em mandíbula irradiada e, por último, na mandíbula não irradiada com pó de osso desmineralizado irradiado. Sendo assim o leito não é o fator limitante em reparação de defeitos ósseos, podendo o componente osteogênico de osso no pó de osso desmineralizado ser mais afetado pela irradiação. No leito irradiado, o defeito produzido 2 semanas após irradiação curou-se mais rapidamente do que aqueles realizados 4 semanas. Portanto, o tempo para realização da cirurgia após irradiação também desempenha importante papel no processo de reparação, com cirurgia prematura produzindo melhores resultados.

Radiografia de diagnóstico após cirurgia para avaliação da osseointegração de implantes dentais vem sendo desaprovada, devido à possibilidade dos efeitos nocivos da radiação ionizante na reparação e remodelamento ósseo. Para avaliar esta possibilidade, DARE *et al.*, em 1997, estudaram o efeito da radiação ionizante na proliferação e diferenciação de osteoblastos, usando culturas de células semelhantes a osteoblastos, isoladas da calvária de ratos recém nascidos (ROB) e uma linha de células osteoblásticas clonais (MC3T3-E1). As células foram expostas no terceiro dia de cultura à dose única de raios X de 40, 100, 400 ou 4000mGy. O efeito da radiação sobre o crescimento celular e atividade específica de fosfatase alcalina foi avaliada, em intervalos de três dias após a irradiação, até o 12º dia em células isoladas da calvária de ratos recém nascidos e em células osteoblásticas clonais. Exposições de 4000mGy diferentemente afetaram os dois tipos de células, inibindo o crescimento celular, a atividade da fosfatase alcalina e a formação de nódulos semelhantes a ossos em células da calvária de ratos recém nascidos e, levemente aumentou a atividade da fosfatase alcalina e inibiu o conteúdo de DNA em células osteoblásticas clonais. Já as exposições até 400mGy não alteraram, significativamente, o crescimento celular, a atividade da fosfatase alcalina e

formação de nódulos semelhantes a ossos em células ROB, assim como não induziu alteração significativa no DNA e atividade da fosfatase alcalina em células osteoblásticas clonais. Os autores concluem que altas doses de radiação (4000mGy) podem exercer efeitos diferentes sobre a proliferação e diferenciação celular de osteoblastos *in vitro*, dependendo do tipo de célula afetada. Entretanto, baixas doses de radiação ionizante, incluindo radiação com qualidade diagnóstica, apresentam pouco efeito sobre o processo de reparação e remodelamento ósseo.

WÜRZLER *et al.* em 1998, investigaram o potencial de proteínas ósseas morfogenéticas em melhorar a reparação óssea prejudicada pela irradiação. Dois defeitos de 3mm de diâmetro foram criados na calvária de ratos. Os defeitos foram tratados com diferentes doses de proteínas ósseas morfogenéticas-2 recombinante humano (rhBMP-2) usando colágeno tipo I como um carreador. A irradiação com dose única de 1.200rads foi aplicada sobre a calvária dos animais, 2 ou 7 dias pré-operatório, sendo que animais não irradiados serviram como controle. Nova formação óssea foi avaliada por análise da densidade radiográfica dos defeitos ósseos e, histologicamente no 21º dia após a cirurgia. Nos animais não tratados e não irradiados ocorreu reparação óssea espontânea dos defeitos de aproximadamente 90% aos 21 dias, já aqueles irradiados e não tratados apresentaram diminuição significativa do preenchimento ósseo. Para os animais irradiados e tratados com proteínas ósseas morfogenéticas-2 recombinante humano houve aumento significativo de nova formação óssea. Os autores concluíram que, a radiação induziu prejuízo na reparação da calvária, o qual pode ser evitado pela proteína óssea morfogenética-2 recombinante humano. Assim, o conceito de regeneração induzida pela proteína óssea morfogenética-2 tem potencial aplicação em cirurgia crânio-maxilo-facial reconstrutiva após irradiação.

DUDZIAK *et al.*, em 2000, relataram que a radiação ionizante pode diminuir o processo de reparo ósseo pela alteração da expressão de citocinas,

resultando em alterações na diferenciação osteoblástica, causando alteração na proliferação de osteoblastos e formação da matriz extracelular. Para tanto, tiveram como objetivo investigar o efeito da radiação ionizante na proliferação, maturação e produção de citocinas de células semelhantes a osteoblastos (MC3T3-E1), *in vitro*. As culturas de células foram irradiadas com doses de 0, 40, 400 e 800cGy de radiação gama (Césio-137) para análise da expressão do fator de crescimento β 1 (TGF- β 1), fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), fosfatase alcalina, proliferação de células semelhantes a osteoblastos, capacidade de regulação da proliferação de células endoteliais aórticas bovinas e o efeito do adenovírus mediado pela terapia de gene do fator de crescimento β 1, na tentativa de evitar danos em osteoblastos irradiados. A exposição de células semelhantes a osteoblastos à radiação ionizante resultou em diminuição na proliferação celular, estimulou a diferenciação celular e causou diminuição na produção total do fator de crescimento β 1 e proteína do fator de crescimento endotelial vascular de forma dose-dependente. Em contraste, nas células controle não houve estímulo da proliferação de células endoteliais aórticas bovinas e finalmente quando houve reprodução do adenovírus do fator de crescimento β 1 antes da irradiação resultou em aumento da produção celular de proteína do fator de crescimento β 1 e do fator de crescimento endotelial vascular. Os autores levantaram a hipótese de que as alterações induzidas pela radiação ionizante no perfil das citocinas e estado de diferenciação de osteoblastos, podem proporcionar mecanismo celular intrínseco fundamental para a osteorradionecrose e dano na reparação de fraturas.

SZYMCZYK *et al.*, em 2004, com a finalidade de testar a hipótese de que a radiação induz a osteorradionecrose pela indução da apoptose de células ósseas, expuseram células semelhantes a osteoblastos (MC3T3-E1) à radiação gama (Césio-137) em doses de 0 a 60Gy. Essas células foram tratadas com agentes apoptógenos. Foi avaliada a viabilidade celular e medida a atividade de desidrogenase dos osteoblastos 24 horas após a irradiação, sugerindo que houve uma pequena diminuição na viabilidade celular. Entretanto as análises citométrica

e histológica demonstraram que essa redução foi causada pela inibição da proliferação celular e não pela indução a apoptose. Foi demonstrado também que houve interrupção da fase G2 do ciclo celular dos osteoblastos irradiados e alteração na expressão de moléculas que regulam esse ciclo, causando distúrbio na atividade do ciclo celular. Os osteoblastos também apresentaram alterações na sensibilidade a apoptose, sendo dependente do agente apoptótico a que foi exposto. Os autores concluíram que a radiação ionizante pode induzir uma interrupção da fase G2 de divisão celular e sensibilizar células ósseas à apoptose, ativando o processo de morte celular. Além de causar profunda alteração na função osteoblástica e uma resultante diminuição na massa óssea e força mecânica, induzindo a osteorradionecrose.

Os efeitos deletérios dos raios X no osso são conhecidos há quase um século e continuam a ser estudados devido à melhora na sobrevivência dos pacientes tratados com radioterapia, associada ou não a outros tratamentos. Em 2006, WILLIAMS & DAVIES realizaram uma revisão da literatura das características radiográficas, por tomografia computadorizada, cintilografia e ressonância magnética, dos efeitos deletérios da radiação no esqueleto imaturo e pós-fusão, assim como são discutidos os processos patofisiológicos fundamentais para o desenvolvimento desses danos. No esqueleto em formação os danos são maiores ao físico resultando em distúrbios do crescimento. No esqueleto maduro há um espectro de alterações de leve osteopenia, devido às desordenadas tentativas de reparação, com variados graus de esclerose, e radionecrose que pode levar a fraturas agudas sem capacidade de reparação às complicações das transformações sarcomatosas.

2.3) Reparação alveolar

Em 1968, KING *et al.*, avaliaram o processo de cicatrização do alvéolo dental de cão por meio de tratamento com terapia de ondas curtas. Foram utilizados 12 cães adultos, sendo seis pertencentes ao grupo controle e seis pertencentes ao grupo tratado. Todos os animais foram submetidos a cirurgia para extração do 1º pré-molar superior e inferior direito. O grupo tratado foi dividido em três subgrupos: terapia no lado direito da face, com frequência de 600 ciclos/segundo, 10 minutos antes da cirurgia; terapia no lado direito da face, com frequência de 600 ciclos/segundo imediatamente após a cirurgia e duas vezes ao dia durante 10 dias e terapia na região do fígado, com frequência de 400 ciclos/segundo imediatamente após a cirurgia e duas vezes ao dia durante 10 dias, sendo esta justificada pelo papel do fígado no mecanismo de defesa corporal. Os animais foram sacrificados 3, 5, 8, 10, 20 e 30 dias após a cirurgia. O tratamento com a terapia de ondas curtas de alta frequência aumentou a resposta inflamatória e a taxa de deposição de colágeno no alvéolo dos cães durante a fase inicial de cicatrização, ou seja, até o 8º dia pós-cirúrgico. Nos animais sacrificados 10, 20 e 30 dias após a cirurgia não houve diferença significativa entre o grupo controle e o grupo tratado.

Em 1969, AMLER avaliou por meio de biópsia, a seqüência de tempo da regeneração do tecido humano normal em cicatrização alveolar após a extração dental. Foram realizadas, aproximadamente, 185 biópsias em pessoas aparentemente saudáveis e com idade entre 30 e 50 anos. Na técnica de biópsia foi evitada a remoção do osso alveolar e os tecidos foram removidos somente até o 50º dia. Após 2 dias da extração pode-se observar que a organização de fibrina era aparentemente grande e em formação espiral, assim como a presença de células vermelhas do sangue. Aos 4 dias células sanguíneas e fibrina estavam presentes, mas apresentavam-se infiltradas e parcialmente substituídas por células do tecido de granulação e algumas células conjuntivas jovens. As

primeiras fibras osteogênicas pareciam evidentes no 7º dia em áreas isoladas, presas a espículas ósseas ou no alvéolo apical, sendo ainda observado, neste mesmo período, a substituição do coágulo por tecido de granulação. No 8º dia de cicatrização observou-se tecido de granulação e desenvolvimento de tecido conjuntivo jovem, sendo o mesmo observado no 10º dia pós-extração. Já a cicatrização óssea e osteogênese estavam presentes no 12º dia, quando observaram as primeiras proliferações da regeneração epitelial, sendo esta mais efetiva no 16º dia de cicatrização. Nesse estudo, um período de 20 dias foi necessário para total substituição do tecido de granulação por tecido conjuntivo. Aos 21 dias pôde-se observar a maturação dos osteóides, indicando o início do desenvolvimento ósseo, já ocorrendo a mineralização óssea. Neste período, a epitelização continuava com crescimento linear sobre a superfície da cicatrização, mas ainda não havia regenerado completamente, sendo observado no 22º dia de cicatrização a completa regeneração do epitélio. A formação óssea completa foi observada no 35º dia após a exodontia.

JOHANSEN, em 1970, realizou um estudo a fim de esclarecer a proliferação celular na reparação alveolar pós-extração e estruturas circunjacentes. Foram utilizados 18 ratos dos quais foi extraído o primeiro molar inferior esquerdo e posteriormente sacrificados em um período que variou de 0 a 20 dias após a extração. O primeiro molar do lado direito permaneceu intacto e foi utilizado como controle. A análise dos resultados mostrou que, após um dia o alvéolo era preenchido por coágulo sanguíneo contendo filamentos de fibrina e células sanguíneas, e ao longo do osso alveolar, tecido conjuntivo e células endoteliais foram encontradas entre o remanescente das fibras do ligamento periodontal. No 2º dia, tanto o epitélio juncional quanto o epitélio oral da gengiva estavam em proliferação para revestir a ferida da extração. Após 4 dias o epitélio revestia a ferida da extração e a queratinização já havia se iniciado, sendo completa aos 11 dias após a cirurgia. Após 3-4 dias a formação óssea iniciava-se ao longo da parede alveolar, enquanto a reabsorção era observada em outras

partes e no 6º dia, o alvéolo já era preenchido por novo osso. Essa formação óssea ocorria diretamente sobre a parede alveolar original e nenhuma atividade osteoclástica prévia parecia essencial para este processo. Observou-se também que na superfície da crista alveolar notável formação óssea ocorreu entre o 6º e 21º dia pós-cirúrgico.

Em 1973, OKAMOTO & RUSSO avaliaram morfológicamente e por reatividade histoquímica, estruturas intra e extracelulares do tecido conjuntivo durante as diferentes fases do processo de reparo em feridas de extração dental de ratos. Foram utilizados 32 ratos, dos quais foi extraído o dente incisivo superior direito e os animais sacrificados nos tempos 1, 4, 7, 10, 13, 16, 19 e 21 dias após a cirurgia. Verificou-se no 1º dia a formação do coágulo e início da proliferação das células do tecido conjuntivo. Aos 4 dias já foi observado, no terço apical, leve neoformação do trabeculado ósseo e aos 7 dias presença de numerosos osteoblastos, ocorrendo intensa neoformação óssea. Nesta fase inicial as figuras mitóticas foram mais numerosas e a reatividade citoplasmática celular extremamente pequena. No 10º dia pós-operatório observou-se intensa neoformação óssea e presença de grande número de fibroblastos e células indiferenciadas, entretanto o trabeculado não estava bem organizado. O processo de reparo alveolar aos 13 e 16 dias pós-extração dental eram semelhantes ao do 10º dia, no entanto apresentava-se com progressiva neoformação óssea e melhor organização das trabéculas. Já no 19º e 21º dias pós-operatórios o alvéolo parecia estar completamente preenchido por tecido ósseo. Durante o período de formação do tecido conjuntivo de reparação, os citoplasmas celulares apresentavam granulações contendo proteínas com elevada concentração de lisina-hidroxilisina, glicoproteínas, ácido siálico, ácidos mucopolissacárides, lípidos e ácido ribonucléico, além de substância fundamental. Os autores concluíram que à medida que a mineralização se processa, as estruturas intra e extracelulares se tornam menos reativas, sugerindo uma reorganização físico-química dos colóides texturais durante a mineralização.

VALDRIGHI *et al.*, em 1974, descreveram a seqüência de mudanças que ocorrem nos alvéolos durante o processo de reparação após extração dentária em macacos. Além disso, avaliaram a importância da membrana periodontal e mudanças no remodelamento das paredes do espaço alveolar do osso. Foram extraídos o primeiro e terceiro pré-molares inferiores direitos de todos os animais e estes foram sacrificados aos 1, 3, 5, 7, 11, 16, 23, 31, 42 e 56 dias após a extração, sendo as peças obtidas em direção mesiodistal e bucolingual. Os autores concluíram que a membrana periodontal remanescente tem um importante papel na organização do coágulo sanguíneo e que o início da ossificação ocorreu aos 11 dias, continuando até os 56 dias.

No mesmo ano, VIZIOLI *et al.*, realizaram um estudo sobre o aparecimento e evolução da reticulina durante o processo de reparação alveolar após extração dentária em macacos. Foram utilizados 30 animais dos quais foram extraídos o primeiro e terceiro pré-molares inferiores de todos os animais e estes foram sacrificados após 3, 5, 7, 11, 16, 23, 31, 42, 56 e 75 dias após a extração. A análise dos resultados mostrou que a reticulina aparece no processo de reparação alveolar de sagüis pelo 6º e 7º dias pós-operatório. No 11º dia o tecido de granulação substituiu completamente o coágulo sanguíneo, havia uma maior proliferação da reticulina e o epitélio de superfície fechava toda a ferida cirúrgica, mas a membrana basal ainda não estava presente, sendo esta evidente no 16º dia. A osteogênese iniciou-se, aproximadamente, 12 a 16 dias após a extração, sendo que a reticulina não foi visualizada dentro da matriz óssea, mas sim próximo às trabéculas ósseas neoformadas, em contato com a superfície óssea. Os espaços medulares encontravam-se preenchidos por um único componente fibroso, o qual era a reticulina. Aos 75 dias pós-extração evidenciou-se apenas glóbulos de gordura nos espaços medulares e a reticulina estava presente somente em algumas regiões próximo ao osso.

De CARVALHO *et al.*, em 1980, avaliaram por meio dos métodos histológico e densitométrico, o processo de mineralização em feridas de extração dentária em ratos. Utilizou-se 30 ratos, os quais foram submetidos a cirurgia para extração do incisivo superior direito. Esses animais foram sacrificados imediatamente após a exodontia (zero dia), 6, 12, 18, 21 e 24 dias pós-operatórios. Foi observado aumento significativo das densidades ópticas das imagens radiográficas, em nível das faces vestibulares e linguais dos terços alveolares entre 0 e 6 dias pós-cirúrgicos, entre o 6º e o 12º dia houve decréscimo, não significativo da densidade óssea e evidenciou-se a presença de trabéculas ósseas esparsas em toda a extensão do alvéolo. Do 12º ao 18º dia houve aumento significativo da mineralização, o que foi comprovado pelo estudo histológico quando evidenciou-se trabéculas ósseas preenchendo o alvéolo em quase sua totalidade. Já do 18º ao 21º dia houve aumento não significativo da mineralização, embora o trabeculado ósseo se apresentasse mais espesso neste período. No 24º dia nos três terços alveolares encontrou-se trabeculado ósseo maduro, muito embora a diferença densitométrica entre o 21º e o 24º dia não tenha sido significativa, sugerindo o início de remodelação do trabeculado ósseo pré-existente ou neoformado. Os autores concluíram que, densitometricamente, ocorreu constante aumento da mineralização de todo o alvéolo, a partir do 6º dia até o 21º dia, confirmado também pelo estudo histológico, pelo aumento da maturação das trabéculas ósseas.

BODNER *et al.* (1993) avaliaram, por meio de um método radiográfico, as alterações que ocorrem durante a cicatrização alveolar após extração dental. Foram utilizados 35 ratos dos quais foi extraído o 1º molar inferior esquerdo e sacrificados aos 0, 7, 14, 21, 28, 45 e 60 dias após a cirurgia. Posterior a remoção, as mandíbulas foram radiografadas junto com uma escala de alumínio para análise da densidade alveolar. Aos 7 dias foi observado aumento da densidade da imagem das áreas apical e de crista do alvéolo, indicando a neoformação óssea. Na área apical a densidade máxima foi alcançada no 28º dia pós-extração. Na

área de crista a densidade aumentou em velocidade mais lenta durante todo o experimento sendo significativamente menor, quando comparado a área apical, entre o 7º e o 45º dias pós-cirúrgico, já em 60 dias a diferença não foi significativa. Os autores relataram que as alterações de densidade estavam de acordo com os achados histológicos descritos para a cicatrização alveolar em ratos.

CARVALHO *et al.* (1997) quantificaram o tempo de cicatrização da ferida alveolar após extração dental em ratos saudáveis, sendo que a avaliação da cronologia da cicatrização foi realizada para os terços apical, médio e cervical, por meio do método estereológico padrão (volumetria por contagem de pontos). Foi extraído o incisivo superior direito de cada animal, e estes foram sacrificados após 1, 2, 3 e 6 semanas pós-operatória. Seis mil pontos sobre o coágulo, vasos sanguíneos, tecido conjuntivo e trabéculas ósseas foram contados nos três terços de cada alvéolo. A análise histométrica permitiu a quantificação da neoformação óssea progressiva em paralelo a uma diminuição na porcentagem do volume do tecido conjuntivo até a sexta semana após a extração dental. Foi observado também uma porcentagem de volume significativamente menor de trabéculas ósseas no terço cervical do alvéolo nos tempos de 1, 2 e 3 semanas após a exodontia, não sendo observado esta diferença apenas na sexta semana pós-operatória. Histologicamente na primeira semana foi observada a presença de delicado trabeculado ósseo nos terços médio e apical. Na segunda semana houve progressiva neoformação óssea e na terceira semana o alvéolo parecia estar preenchido com trabéculas ósseas espessas em toda sua extensão. Os autores concluíram que, ao contrário do descrito na literatura, a neoformação óssea persiste além da terceira semana pós-operatória, conforme demonstrado pela análise histométrica.

DEVLIN *et al.*, em 1997, investigaram a natureza da estrutura colágena sobre a qual ocorre a formação de novas trabéculas ósseas durante a cicatrização alveolar após a extração dental em roedores, assim como o sistema de

cicatrização óssea. Os animais foram submetidos à cirurgia para a extração do molar superior direito e foram sacrificados em vários tempos pós-cirúrgico. Aos 2 dias o alvéolo encontrava-se preenchido por coágulo sanguíneo e remanescentes do ligamento periodontal; aos 4 dias foi observado presença de trabéculas ósseas radiando da margem para o centro do alvéolo, sendo que aos 5, 6 e 7 dias a margem do alvéolo apresentava-se revestida por osso. Cerca de 50% do alvéolo encontrava-se preenchido por osso neoformado aos 10 dias pós-cirúrgico, sendo que nos intervalos finais de observação, ou seja, 17, 20 e 30 dias após a extração dental, o remodelamento ósseo alveolar estava presente. O colágeno tipo IIA mRNA foi produzido por células osteoblásticas sobre o alvéolo, mas o colágeno tipo II, quando presente, representava menos que 0,01% do total de proteínas no tecido. Foi observado também a presença de colágeno tipo I e V no tecido removido após 7 dias da cirurgia. Durante a formação óssea, fibras de Sharpey's foram vistas radiando do osso periférico para o centro do alvéolo. Os autores concluíram que a disposição e composição das fibras colágenas sugerem que elas constituem uma estrutura preliminar sobre a qual ocorre a deposição do tecido ósseo trabecular.

Em 2004, ELSUBEIHI & HEERSCHKE avaliaram quantitativamente a cicatrização e remodelamento do rebordo alveolar após extração unilateral dos molares e incisivos inferiores de ratas. Foram utilizadas 50 ratas das quais foram extraídos os 3 molares inferiores e uma semana depois foi extraído o incisivo. Os animais foram sacrificados aos 0, 14, 28, 56 e 112 dias após a extração do incisivo. Tanto a metade edêntula quanto a dentada de cada mandíbula foram processadas para avaliação histológica, sendo avaliada a densidade de osso mineral e realizada mensuração histomorfométrica do volume ósseo total, assim como alteração na extensão, altura e largura sobre imagens de cortes transversais da mandíbula. Houve aumento total de 28% na densidade mineral óssea do corpo da mandíbula e 35,1% de aumento no volume ósseo total em 112 dias pós-extração. Aumento máximo de 25% na densidade mineral óssea foi observado em

14 dias após a extração, sendo que este aumento máximo ocorreu entre os dias 0 e 28, com subsequente diminuição. O volume ósseo total aumentou 9,5% em 14 dias, sendo observado aumento progressivo até o 56º dia, entretanto do 56º ao 112º dias houve um leve, mas não significativo aumento do volume ósseo total. A cicatrização foi associada com uma redução na área (altura e largura) da mandíbula observada no corte transversal em 112 dias após a extração. A densidade mineral óssea da mandíbula edêntula após extração dos molares e incisivo de um mesmo lado da mandíbula aumentou até o 56º dia, embora o volume ósseo total tenha aumentado até 112 dias pós-cirúrgico. Os autores relataram que, para detecção de pequeno aumento na formação óssea em estágios tardios da cicatrização, a mensuração do volume ósseo é mais sensível que a mensuração da densidade mineral óssea, possivelmente devido às alterações na geometria da mandíbula edêntula após extração dental. A análise histomorfométrica mostrou que a mandíbula edêntula sofreu significante redução no tamanho como resultado da redução da altura e da largura até 112 dias após a extração.

2.4) Efeito da radiação na reparação alveolar

FRANSEN, em 1962, avaliou histologicamente, o processo de cicatrização de extrações realizadas em ratos tanto antes quanto após a irradiação, assim como objetivou-se esclarecer a patogênese da radiosteomielite. Os animais foram submetidos à extração do 1º molar inferior esquerdo. O grupo controle foi composto por animais não irradiados e os demais foram divididos em 3 grupos: extração 8 dias após a irradiação com 1725R; extração 5 dias antes da irradiação com 1725R e extração 8 dias após a irradiação com 2400R. Os animais foram sacrificados em vários períodos pós-operatórios, os quais variaram de 2 a 63 dias. As alterações patológicas presentes eram epilação, eritema e exudação da área da pele irradiada e alterações orais que variavam de pequenas lesões do

soalho de boca a radiosteomielite dos maxilares, com ocasional fístula orocutânea. A frequência de radiosteomielite foi 5 a 6 vezes maior nos ratos irradiados antes da extração que naqueles irradiados após a extração. Microscopicamente, a irradiação causou alterações necróticas nos tecidos duro e mole circunjacentes ao alvéolo, as quais foram demonstradas em pequeno tempo após a extração. Estas alterações foram acentuadas pelo trauma da extração. A organização do tecido de granulação do coágulo mostrou baixa celularidade e, igualmente, a proliferação epitelial foi prejudicada devido às alterações teciduais e a supressão da proliferação celular. A reabsorção óssea foi proeminente, mas foram vistas áreas com formação óssea.

Em 1963, FRANDSEN, por meio de ampla revisão da literatura e estudo clínico descreveu os efeitos da radiação ionizante sobre a cicatrização alveolar e tecidos periodontais em ratos, assim como a possível função desempenhada pela doença periodontal no desenvolvimento de radiosteomielite. Apenas a região de molar foi exposta a dose única de 1725R ou 2400R de radiação X e os animais foram submetidos à extração do 1º molar inferior esquerdo. Os animais foram sacrificados em vários intervalos de tempo pós-operatório. Com dose de 1725R as extrações provocaram radiosteomielite em 6 de 14 ratos irradiados 8 dias antes da extração e somente em 1 de 13 animais expostos a irradiação 5 dias depois da extração. Já os animais que receberam 2400R com extração realizada 8 dias após a irradiação, 5 de 10 animais desenvolveram radiosteomielite, sendo esta considerada como uma seqüela direta da extração dental. As alterações histológicas associadas com o desenvolvimento da radiosteomielite eram as seguintes: alteração degenerativa da parede do alvéolo e membrana periodontal, atraso na formação de tecido de granulação e proliferação epitelial, extensiva reabsorção óssea e diminuição da resposta inflamatória. A importância dos três fatores etiológicos da radiosteomielite, ou seja, injúria por radiação, trauma e infecção, foi confirmada nesse estudo. Uma vez que as extrações foram realizadas no lado esquerdo da mandíbula, os lados direito da mandíbula e, direito

e esquerdo da maxila foram utilizados para avaliação periodontal. Foi encontrado que os ratos do grupo controle apresentavam grau variado de inflamação do tecido interdental variando de discreta alteração inflamatória a verdadeiro abscesso periodontal sendo que papila interdental intacta foi raramente encontrada. Não houve grande diferença nas alterações patológicas entre os animais irradiados com 1725R ou 2400R, já as diferenças entre ratos irradiados e controle foi bastante significativa. Os presentes achados não apresentaram relação direta entre lesão periodontal e desenvolvimento de radiosteomielite, mas foi observado que a radiosteomielite e as lesões periodontais ocorriam simultaneamente.

Em 1973, ZACH *et al.*, avaliaram o efeito das radiações X e gama (Co_{60}) em tecido oral e dental traumatizado cirurgicamente. Foram utilizados 36 macacos *rhesus* dos quais 34 foram submetidos a tratamento cirúrgico e radioterápico, um animal somente a tratamento cirúrgico e outro somente a radioterapia, sendo que os dois últimos serviram como controle. Os animais receberam dose fracionada de 333R, três vezes por semana, de uma dose total de 6000R. Os procedimentos cirúrgicos consistiam da extração do primeiro molar inferior direito, gengivectomia na face bucal para exposição da crista óssea alveolar na mesial do segundo molar inferior direito e extirpação da polpa do incisivo central superior direito, sendo o canal radicular preenchido por guta percha e selado com pasta de óxido de zinco-eugenol. Os procedimentos cirúrgicos foram realizados antes da irradiação, intercorrente com a irradiação (após receber metade da dose total), ou depois de completada a irradiação. O tempo de sacrifício variou de 1 a 12 meses após a cirurgia. Foi observada depilação facial após aproximadamente 1000R de radiação X, sendo raramente encontrados nos animais irradiados por Co_{60} ; radiodermites por ambas radiações, a qual foi mais intensamente causada pela radiação gama e também foi observada radiogengivite desenvolvida nos dois grupos, porém mais severa nos animais expostos à radiação X. Em todos os animais que desenvolveram

osteorradionecrose esta era severa, para ambas modalidades de irradiação, e precedida por extensa escara gengival. Foi observado ainda que os animais irradiados apresentaram atraso na cicatrização, quando comparados ao controle. Tanto para a radiação X quanto para a radiação gama a resposta à cicatrização era mais prejudicada nos animais submetidos a tratamento cirúrgico durante ou após a irradiação, porém a radiação X produziu respostas uniformemente mais severas do que o Co_{60} .

Com o propósito de avaliar a resposta pós-irradiação de pacientes que tiveram dentes removidos e que receberam radiação diretamente no local cirúrgico, assim como as seqüelas intraoral em relação ao período de tempo entre as extrações e o início da radioterapia, STARCKE & SHANNON (1977) acompanharam 62 pacientes portadores de tumor na região de cabeça e pescoço. A dose média de irradiação recebida pelos pacientes foi de 6000rads e o intervalo entre a extração e o início da irradiação variou de 5 a 72 dias. Somente um paciente desenvolveu necrose após a radioterapia, sendo que tal acontecimento não estava relacionado à extração pré-irradiação. Estes resultados indicaram que o tempo de cicatrização entre as extrações e o início da radioterapia pode não ser crítico, uma vez que a exodontia pré-irradiação não pôde ser associada com o aumento das sérias seqüelas pós-irradiação, visto que a incidência de osteorradionecrose nestes pacientes foi extremamente baixa. Os autores sugerem que um intervalo de 10 a 14 dias de cicatrização entre as extrações e a radioterapia seja adequado. Entretanto, quando isto não for possível, assim como quando é indicada a urgência da radioterapia, um menor tempo de cicatrização não está, necessariamente, associado com maior risco de seqüelas e não deve ser considerado como completamente inaceitável.

HORN *et al.*, em 1979, tiveram como propósito avaliar o efeito de dose única de 1500R de radiação X sobre a cicatrização alveolar inicial em ratos. Todos os animais tiveram o primeiro molar superior direito extraído e foram divididos em

3 grupos sendo um controle, o qual foi somente submetido a cirurgia; um grupo irradiado duas semanas anterior à exodontia e outro irradiado imediatamente após a cirurgia. Os sacrifícios ocorreram 48, 72, 96 horas e 1 semana após a extração. O grupo controle exibiu padrão de cicatrização normal em todos os tempos, já os animais irradiados apresentaram atraso no processo de cicatrização alveolar sendo mais severo nos animais irradiados duas semanas anterior à cirurgia.

Em 1986, GUGLIELMOTTI *et al.* determinaram, por meio de método radiográfico, histológico e histométrico, a resposta do tecido ósseo durante a cicatrização alveolar após diferentes doses de radiação X aplicada após a extração dental em ratos. Os animais do grupo controle foram submetidos apenas a cirurgia e os demais foram irradiados na região da cabeça com 15, 20 ou 30Gy de radiação X aos 0, 3 ou 7 dias posteriores a cirurgia. Os animais foram sacrificados 14 dias pós-cirúrgico. Todos os animais dos grupos controle e 7 dias sobreviveram até o final da pesquisa, já os animais que receberam 20 ou 30Gy aos 0 e 3 dias após a cirurgia morreram antes do final do experimento. Em todos os métodos de avaliação, quando comparado ao controle, a cicatrização alveolar apresentava-se mais atrasada nos grupos irradiados, sendo mais evidente nos grupos irradiados 0 e 3 dias após a extração. Além disso, a porcentagem de formação óssea encontrava-se diminuída quanto maior era a dose de radiação. Diante destes achados, os autores recomendam que a irradiação não deve ser iniciada em menos de uma semana após a extração dentária.

Em 1989, PINTO *et al.* avaliaram a ação da radiação X sobre as glândulas submandibular e sublingual no processo de reparo alveolar após a extração dental. Foram utilizados 75 ratos divididos em três grupos. Grupo controle, o qual foi submetido a exodontia do incisivo superior direito; grupo irradiado, no qual foi realizada cirurgia para exposição das glândulas submandibulares e sublinguais, as quais foram irradiadas com 138R e três dias após esta cirurgia foi extraído o incisivo superior direito de cada animal; e grupo

simulado, o qual foi submetido às mesmas intervenções do grupo irradiado e embora não tenha sido irradiado, as glândulas foram expostas durante um tempo igual ao gasto para irradiação dos animais do grupo irradiado. Os animais foram sacrificados aos 3, 6, 9, 15 e 21 dias após as exodontias. Os grupos controle e simulado apresentaram resultados semelhantes. Já o grupo irradiado evidenciou um atraso na reparação a partir do 6º dia pós-operatório, com subsequente diminuição de neoformação óssea, além de osteoclasias de trabéculas ósseas neoformadas bem evidentes no 9º dia após a exodontia. Os autores concluíram que a reparação alveolar em animais expostos à irradiação das glândulas submandibulares e sublinguais, quando comparados ao grupo controle, apresentaram atraso na maturação do tecido de granulação e subsequente diminuição da neoformação óssea no processo de reparo alveolar.

RAVELI *et al.* (1990), avaliaram a influência da radiação X sobre a cronologia do processo de reparo alveolar em ratos. Foram utilizados 60 ratos dos quais foi extraído o incisivo superior direito. Os animais foram divididos em três grupos sendo um controle e os outros dois que tiveram a área dos alvéolos exposta à 1,25 ou 1,75Sv de radiação X imediatamente após as extrações. Os animais foram sacrificados aos 3, 7, 14 e 28 dias pós-operatórios. Em todos os intervalos de tempo, o grupo controle apresentou reparação alveolar mais adiantada, em relação aos grupos irradiados. Os autores concluíram que a radiação X provocou alterações ainda em nível de organização do coágulo e retardo na proliferação epitelial da mucosa gengival nos animais submetidos à irradiação X, proporcionando considerável atraso na cronologia do processo de reparo alveolar em feridas de extração dental de forma dose-dependente.

CORDEIRO *et al.*, em 1992, avaliaram a cronologia do processo de reparo em feridas de extração dental de ratos expostos à radiação X. Foram extraídos os incisivos superiores direitos de 50 ratos divididos em dois grupos, sendo um o controle e o outro o grupo irradiado no qual os animais receberam no

corpo todo, dose única de 1,8Gy imediatamente após a extração dental. Os animais foram sacrificados aos 1, 3, 7, 14 e 28 dias pós-cirúrgicos. Em todos os períodos de tempo foi observado que os animais do grupo irradiado, em relação ao grupo controle, apresentaram atraso na organização do coágulo, na proliferação do epitélio que encobre o alvéolo e, conseqüentemente, no processo de reparação óssea, sendo que no 28º dia o processo de reparo ainda não havia se completado no grupo irradiado.

Em 1996, RAVELI *et al.*, também avaliaram a influência da radiação X sobre a cronologia do processo de reparo alveolar em ratos. Foram utilizados dois grupos de animais, sendo um grupo controle e um grupo irradiado. Foi extraído o incisivo superior direito de todos os animais. Os animais do grupo irradiado receberam dose única de 1,72Gy de radiação X na área dos alvéolos, 24 horas antes da cirurgia. Os animais foram sacrificados aos 3, 7, 14, 21, 28 e 40 dias pós-operatórios. O grupo controle apresentou padrão de reparo alveolar normal, já no grupo irradiado a reparação alveolar mostrou-se atrasada em todos os períodos de tempo estudados. Os autores concluíram que houve retardo no início da proliferação fibroblástica e de vasos sanguíneos no grupo irradiado e que a irradiação 24 horas antes do ato cirúrgico provocou um severo atraso na cronologia do processo de reparação alveolar.

Em 2002 KURIHASHI *et al.*, avaliaram o estágio inicial do processo de cicatrização alveolar pós-extração em ratos. A razão da área do tecido ósseo pela área da cavidade alveolar (BS/TS) e o número de células TRAP-positivas foram avaliadas. Foram utilizados 18 ratos divididos igualmente em dois grupos, um irradiado e outro não irradiado. Os animais irradiados foram expostos a dose única de 10Gy de radiação X na região de cabeça e pescoço e após 7 dias foram submetidos a cirurgia para extração do primeiro molar superior esquerdo. Os sacrifícios foram realizados 3, 7 e 14 dias após a exodontia. As células TRAP-positivas estavam presentes no fundo do alvéolo e nas margens do septo ósseo

alveolar sendo que 3 dias após a exodontia o número destas células era significativamente maior no grupo irradiado, indicando maior atividade osteoclástica. Após 7 dias da extração a razão BS/TS foi significativamente menor no grupo irradiado que no grupo não irradiado. Aos 14 dias pós-extração o alvéolo do grupo não irradiado apresentava-se quase completamente preenchido por novo osso. Já no grupo irradiado, apesar da presença de novo tecido ósseo, a quantidade de osso depositado era menor que no grupo não irradiado, ocupando apenas 1/3 do alvéolo. O processo de cicatrização alveolar pós-extração foi mais prolongado no grupo irradiado, assim como foi encontrada, neste grupo, formação deficiente de tecido de granulação, reduzido número de fibroblastos e hipoplasia fibrosa.

2.5) FLAVONÓIDES E PYCNOGENOL®

2.5.1 - Metabolismo dos flavonóides e do pycnogenol®

O ácido ferúlico é um importante constituinte do pycnogenol® portanto, VIRGILI *et al.* (2000) avaliaram a excreção urinária do ácido ferúlico livre e conjugado. O pycnogenol® foi administrado, via oral, por 11 voluntários humanos adultos, sendo usada dosagem única de 200mg ou, duas doses de 100mg e outra de 200mg em intervalo de 48 horas. Antes da ingestão e nas 24 horas após a ingestão das respectivas dosagens de pycnogenol® foi coletada amostra de toda urina produzida. Os resultados demonstraram que proporção considerável de ácido ferúlico foi excretada como glicoronido ou sulfato em todos os voluntários após o consumo de pycnogenol®. A cinética padrão de excreção correspondendo à administração de 100mg de pycnogenol® foi similar àquela obtida após 200mg de pycnogenol®. A média de excreção total do ácido ferúlico apresentou-se intimamente associada com a quantidade de pycnogenol® ingerida, indicando uma

relação dose-dependente entre a ingestão e excreção e, confirmando a excreção renal do ácido ferúlico como um biomarcador para a biodisponibilidade do pycnogenol®. Todos pacientes apresentaram significativa, embora variável, nível de excreção do ácido ferúlico após suplementação com pycnogenol®, no entanto, os dados proporcionaram evidências que os componentes fenólicos do pycnogenol® são absorvidos, metabolizados e eliminados por humanos.

ROHDEWALD (2002) realizou ampla revisão da literatura relatando algumas das funções básicas do pycnogenol®, as quais contribuem para seu efeito na normalização de funções corporais. O pycnogenol® tem baixa toxicidade tanto aguda quanto crônica, apresenta rápida absorção dos compostos fenólicos de baixo peso molecular e lenta absorção e metabolismo das procianidinas. Entre outros efeitos benéficos do pycnogenol® sobre as funções fisiológicas, estudos clínicos indicam que o pycnogenol® age como um potente desoxidante de radicais livres e protege contra carga oxidativa em vários sistemas celulares dobrando a síntese intracelular de enzimas antioxidativas. Além disso, o pycnogenol® reduz a produção de espécies oxigênio e nitrogênio reativas em células imune ativadas. Outros efeitos antioxidantes envolvem a regeneração e proteção das vitaminas C e E, assim como minimiza danos causados ao DNA pelo radical hidroxil, *in vitro*. Atividade antiinflamatória tem sido demonstrada *in vitro* e *in vivo* em modelos animais e proteção contra eritema induzido por radiação ultravioleta foi encontrada em estudo clínico após ingestão oral do pycnogenol®.

RICE-EVANS (2004) estudou a absorção, o metabolismo e a bioatividade dos flavonóides e isoflavonas. O autor relatou que o número de grupos hidroxil fenólicos e a posição destes grupos sobre a estrutura dos flavonóides interfere em funções como a atividade moduladora de enzima, atividade antioxidante, agente citotóxico e agente anti-mutagênico *in vitro* e *in vivo*. Os flavonóides são substratos para várias enzimas localizadas no intestino delgado e cólon e para o metabolismo hepático, sendo que os parâmetros que

controlam as propriedades biológicas são influenciados pela conjugação e metabolismo intracelular ou sobre a absorção *in vivo*. Vários metabólitos dos flavonóides podem ser absorvidos no intestino grosso e, subseqüentemente, sofrer adicional metabolismo hepático.

A cicloxigenase (COX) desempenha papel de importância fundamental no processo inflamatório portanto, em 2005, SCHAFFER *et al.* tiveram como objetivo determinar, por meio de amostra do sêrum de voluntários humanos, uma possível inibição da atividade enzimática da COX-1 e COX-2 após a ingestão de doses regulares de pycnogenol[®]. Foi obtida amostra de sangue de 5 voluntários e estes tomaram durante 5 dias um comprimido contendo 200mg de pycnogenol[®]. Nova amostra sanguínea foi colhida 4 horas após a ingestão do último comprimido. Um segundo grupo de 10 voluntários receberam dose única de 300mg de pycnogenol[®], sendo que 30 minutos antes e após a ingestão do comprimido foi obtida amostra sanguínea de cada indivíduo. Na dosagem de 200mg de pycnogenol[®] foi observado efeito inibitório moderado sobre a atividade de ambas COX-1 e COX-2, já para o grupo que recebeu 300mg de pycnogenol[®] foi observado que somente 30 minutos após a ingestão do pycnogenol[®] a amostra do sêrum induziu um aumento, estatisticamente significativo, da inibição de ambas COX-1 e COX-2. Os autores concluíram que os efeitos farmacológicos moleculares moderados observados com plasma de voluntários após a administração de pycnogenol[®] consistiam com as descrições clínicas dos efeitos antiinflamatórios e de inibição plaquetária *in vivo*.

Em 2006, GRIMM *et al.*, tiveram como objetivo determinar se o plasma humano após ingestão de pycnogenol[®] contém concentrações suficientes de princípios ativos para inibir a matriz metaloproteinase-9, mediador chave da inflamação. Foram selecionados sete voluntários que, após 24 horas de dieta livre de flavonóides, tiveram uma amostra de sangue coletada, subseqüentemente os voluntários ingeriram durante 5 dias, um comprimido por dia contendo 200mg de

pycnogenol®. Após 4 horas da ingestão do último comprimido foi obtida nova amostra de sangue dos voluntários. As amostras de sangue foram avaliadas tanto quanto à inibição da liberação da matriz metaloproteinase-9 de monócitos humanos, quanto à ativação do gene de expressão pró-inflamatório NF-κB-dependente. Quando comparado aos valores base, as amostras de plasma obtidas após a ingestão de pycnogenol® apresentaram inibição estatisticamente significativa, tanto da liberação da metaloproteinase-9 de monócitos humanos quanto da ativação do gene de expressão NF-κB-dependente. Diante dos resultados, os autores proporcionaram evidências que os princípios ativos biodisponíveis do pycnogenol® exercem efeitos antiinflamatórios pela inibição do gene de expressão pró-inflamatório, sendo coerentes com observações clínicas documentadas.

2.5.2 - Mecanismo da ação antioxidante dos flavonóides e do pycnogenol®

O pycnogenol® tem sido denominado como um fitoquímico antioxidante, assim como potente desoxidante de radicais livres. Em 1998, NELSON *et al.*, utilizando macrófagos murino da linhagem J774 avaliaram *in vitro*, a atividade antioxidante do pycnogenol® sobre o rompimento oxidativo dessas células, a oxidação da lipoproteína de baixa densidade (LDL) do plasma e dano ao DNA induzido pelo radical hidroxil. Para análise da ruptura oxidativa, as células foram pré-incubadas com pycnogenol® nas concentrações de 0; 2,5; 5; 10; 20; 40; 80 e 160µg/ml durante uma hora, sendo o dano oxidativo desencadeado pelo polissacarídeo zymozan. O pycnogenol® demonstrou supressão concentração-dependente do rompimento oxidativo dos macrófagos. Quando a LDL foi incubada com CuSO₄ por 24 horas, foi observado significativo aumento da TBARS (substância reativa ao ácido tiobarbitúrico), indicando a oxidação da LDL; já a co-incubação com pycnogenol® nas concentrações de 0, 2, 3 e 4µg/ml resultou em

diminuição concentração-dependente da TBARS, demonstrando a inibição da oxidação da LDL pelo pycnogenol®. O sistema ácido ascórbico/ferro foi utilizado para produzir o radical hidroxil que causa a fragmentação do DNA, manifestada pela marcação da plasmida pBR322. Quando as células foram tratadas com 1,25; 2,5; 3,75; 5 e 6,25µg/ml de pycnogenol®, a clivagem da pBR322 DNA foi significativamente minimizada. Portanto demonstraram amplo efeito antioxidante do pycnogenol® em nível celular, lipoprotéico e do DNA.

Em 1998, VIRGILI *et al.* estudaram, por meio de um sistema de co-cultura, o efeito de espécies nitrogênio-reativas produzidas por crescimento de macrófagos RAW 264,7 em filtros e ativados por lipopolissacárides e interferon- γ sobre o nível de α -tocoferol em células endoteliais ECV 304. Uma hora após serem ativados, os meios eram incubados por 24 horas. O efeito protetor sobre o nível de α -tocoferol foi avaliado pelo extrato padronizado da casca da pinha contendo procianidinas (Pycnogenol®) nas células endoteliais alteradas pelos macrófagos ativados ou pela adição direta de peroxinitrito. O pycnogenol® em concentrações de 10, 25 e 50µg/ml, foi adicionado ao meio de cultura o qual era incubado por mais 16 horas. A análise dos resultados mostrou que as espécies nitrogênio-reativas produziram significativa diminuição de α -tocoferol em células endoteliais. No entanto, a pré-incubação com pycnogenol® além de proteger o α -tocoferol das células endoteliais, melhorou cerca de 15% o nível endógeno basal desta substância. Os autores demonstraram também que os flavonóides participam da rede antioxidante celular e sugeriram que o pycnogenol® pode apresentar um importante papel na proteção do endotélio contra oxidações estresse-induzidas por espécies nitrogênio-reativas, sendo estas espécies possíveis fatores causais de disfunção endotelial e de doenças cardiovasculares.

PACKER *et al.* (1999) realizaram ampla revisão da literatura sobre o Pycnogenol®, o qual é composto de uma mistura de flavonóides. O pycnogenol®

demonstrou maior efeito biológico como uma mistura, que seus componentes individualmente, indicando que estes interagem sinergicamente. Além das substâncias orgânicas, estão também presentes na composição do pycnogenol[®] substâncias inorgânicas como cálcio, ferro, manganês, zinco, cobre e selênio. Os autores relataram inúmeros efeitos benéficos do pycnogenol[®], assim descritos: efeitos cardiovasculares tais como atividade vasorelaxante, inibição da atividade da enzima angiotensina-convertase e habilidade em melhorar a microcirculação pelo aumento da permeabilidade vascular, além da inibição da agregação plaquetária; atividade desoxidante de radicais livres contra espécies oxigênio-reativas e nitrogênio-reativas; participação na rede antioxidante celular indicado pela capacidade de regeneração do radical ascórbico e proteção à glutathione e vitamina E endógena contra cargas oxidativas; regulação da resposta inflamatória em condições normais e patológicas; ação hipotensiva em humanos; inibição da atividade da enzima elastase, a qual está relacionada com a resposta inflamatória em varias condições patológicas e com o processo de envelhecimento. O pycnogenol[®] tem sido estudado também em relação à sua capacidade de agir como fator protetor contra injúrias causadas por radiação ultravioleta. O espectro de diferentes efeitos do óxido nítrico na circulação e no sistema nervoso sugere a potencial aplicação do pycnogenol[®] em desordens imune e circulatória, assim como em doenças neurodegenerativas. O pycnogenol[®] pode ainda aglutinar proteínas, alterando suas estruturas e assim modulando a atividade da enzima chave e proteínas envolvidas nos trajetos metabólicos. A maioria dos estudos, apresentados nessa revisão, foram conduzidos *in vitro*, usando culturas de células, ou modelos animais e os dados adicionais sobre sua atividade antioxidante e propriedades biológicas em humanos demonstraram ser seguros.

HARBORNE & WILLIAMS (2000), também realizaram ampla revisão da literatura quanto aos avanços das pesquisas em flavonóides. Além de inúmeras atividades biológicas os flavonóides apresentam também propriedades bioquímicas como proteção contra radiação ultravioleta e agente antimicrobiano

em plantas. Os autores descreveram as propriedades medicinais dos flavonóides, tais como a atividade antioxidante, sendo que os flavonóides agem como desoxidante de varias espécies oxidativas; inibição de enzimas como, por exemplo, a xantina oxidase; proteção contra doenças coronárias, uma vez que inibe a oxidação da LDL (Lipoproteína de Baixa Densidade); atividade antiinflamatória; atividade vascular, na qual os flavonóides agem em vários componentes do sangue tais como plaquetas (podendo inibir a adesão, agregação e secreção plaquetária), monócitos, LDL e músculo liso; atividade vasodilatadora; atividade anticarcinogênica, havendo relatos de que os flavonóides podem induzir a apoptose, a qual pode ser um mecanismo primário para sua atividade anticarcinogênica e suprimir a angiogênese, processo chave para o aumento de vasos sanguíneos, requerido para o crescimento e metástase tumoral.

CHO *et al.* (2001) avaliaram o efeito do pycnogenol® sobre os genes pró-inflamatórios interleucina-1 β (IL-1 β) LPS-induzido e interleucina 2 (IL-2) PMA/Io-induzidas em células RAW264,7 e células linfocíticas Jurkat E6.1, respectivamente. O pycnogenol® exerceu forte atividade desoxidante contra as espécies oxigênio-reativas produzidas pelo peróxido de hidrogênio nas células RAW264,7. A estimulação de macrófagos com LPS aumentou a produção de IL-1 β ; entretanto, o pré-tratamento das células com pycnogenol® (20 ou 50 μ g/ml) inibiu significativamente a produção da IL-1 β em 25% e 40%, respectivamente. Resultados similares foram encontrados usando o método de imunoanálise, o qual demonstrou que o pycnogenol®, dose-dependente, impediu a produção de IL-1 β nas células RAW264,7 estimuladas com LPS. O pré-tratamento dos macrófagos LPS estimulados com pycnogenol® (1, 10 ou 50 μ g/ml) também resultou em diminuição, dose-dependente, dos níveis de RNAm em IL-1 β . Além disso, nas células RAW264,7 o pycnogenol® impediu a ativação do fator nuclear κ B (NF- κ B) e proteína-1 ativadora (AP-1). Quanto ao efeito do pycnogenol® no gene de expressão da IL-2, o pré-tratamento com 20 ou 50 μ g/ml de Pycnogenol® diminuiu o nível do RNAm da IL-2 PMA/Io induzidas. Nas células Jurkat E6.1

PMA/lo-estimuladas, o pycnogenol® inibiu a atividade de ambas NF-AT e AP-1 CAT (Acetiltransferase Cloranfenicol) de maneira dose-dependente, entretanto o pycnogenol® não teve efeito sobre a atividade do fator NF-κB CAT. Concluiu-se que, baseado nos diversos mecanismos de ação, os bioflavonóides podem ser utilizados como agentes terapêuticos úteis no tratamento de muitas doenças inflamatórias, autoimune e cardiovascular.

DEVARAJ *et al.* (2002), avaliaram por meio de análise sangüínea o efeito antioxidante de uma suplementação com pycnogenol® em 25 voluntários humanos saudáveis. Os participantes receberam 150mg de pycnogenol® diariamente por seis semanas, sendo coletado 50 ml de sangue em jejum, no dia inicial, após três e seis semanas de suplementação com pycnogenol® e ainda quatro semanas depois de encerrado o uso desta suplementação. Apesar da falta de efeito sobre o nível de colesterol total, o pycnogenol® apresentou uma significativa redução do nível de LDL-colesterol após seis semanas, retornando ao nível do dia base no final das quatro semanas seguintes. Já o nível de HDL-colesterol aumentou significativamente no período de uso do pycnogenol®, permanecendo elevado após quatro semanas. Para determinar se o antioxidante fenólico do pycnogenol® aumentou, o nível de fenol total no plasma foi medido no início do estudo e após três semanas de suplementação, aumentando significativamente neste período e demonstrando a absorção de pycnogenol® no sangue. As concentrações de ácido ascórbico não alteraram com o uso do pycnogenol®, porém quanto à capacidade de absorção de radical oxigênio no plasma, o pycnogenol® demonstrou aumentá-la significativamente em humanos, embora tenha-se retornado ao nível inicial ao final das quatro semanas seguintes. Medindo a peroxidação lipídica, o pycnogenol® não apresentou alterações significativas na oxidação do plasma. Os autores concluíram que o pycnogenol® apresentou aumento dos fenóis, assim como melhorou a capacidade de absorção do radical oxigênio, manifestou potenciais efeitos antioxidantes e ainda teve uma

conseqüência favorável sobre dois fatores de risco para doenças cardiovasculares, diminuindo o LDL-colesterol e aumentando o HDL-colesterol.

HORÁKOVÁ *et al.* (2003) avaliaram quatro substâncias potencialmente antioxidantes em culturas de células neoplásicas feocromocitoma PC12 em cargas oxidativas induzidas por peróxido de hidrogênio. Foram utilizados os antioxidantes sintéticos Stobadine e Trolox derivados do α -tocoferol e dois extratos padronizados de plantas, *Ginkgo biloba* e pycnogenol®, constituídos principalmente por flavonóides. Para obter dano à maior fração de células, foi utilizado 2mM de peróxido de hidrogênio. A viabilidade das células PC12 foi determinada na presença de cada antioxidante, 3 horas após o tratamento com o peróxido de hidrogênio. Tanto o Stobadine quanto o pycnogenol® mostraram um aumento na viabilidade celular, ao passo que concentrações elevadas resultou em um declínio; o *Ginkgo biloba* apresentou uma resposta linear durante a variação da concentração usada, sendo o mais efetivo para a proteção de células PC12; já o Trolox teve um ótimo efeito preventivo na concentração de 10 μ M, não sendo efetivo em altas concentrações. Para avaliar o mecanismo de proteção dos antioxidantes, foi medida a oxidação protéica e a peroxidação lipídica por meio da proteína carbonil e pela formação do malondialdeído, respectivamente, nas células PC12, sendo que ambos aumentaram depois do tratamento com peróxido de hidrogênio. A seguir foi testada a influência dos antioxidantes sobre a formação da proteína carbonil e do malondialdeído. O tempo máximo de acúmulo de cada composto foi de 3 horas e 30 minutos, respectivamente. Nenhum dos antioxidantes utilizados apresentou efeito protetor, tanto para oxidação das proteínas quanto para a peroxidação lipídica, no entanto demonstraram efeito protetor mais pronunciado sobre a peroxidação lipídica que sobre a oxidação protéica.

SILLIMAN *et al.* (2003) realizaram um estudo, não randomizado, em 27 humanos, com o objetivo de determinar se o pycnogenol® interage com a vitamina

C para aumentar a concentração desta substância no plasma e aumentar a capacidade antioxidante total da urina e, do plasma em estado de jejum e/ou pós prandial. Os participantes consumiram um placebo duas vezes por dia durante duas semanas e pycnogenol®, 200mg por dia, nas duas semanas seguintes. Foi coletada toda urina produzida durante 24 horas nos dias 14-15 e 28-29. Para análise de fenólicos totais, potencial antioxidante de redução férrico e capacidade de absorção do radical oxigênio, foram coletadas amostras de sangue nos dias 15 e 29, com os participantes em jejum e uma hora após terem ingerido a dose diária do placebo ou do pycnogenol®. As amostras sanguíneas foram analisadas para a concentração de vitamina C e capacidade antioxidante total utilizando a análise da capacidade de absorção do radical oxigênio. Foi observado que não houve aumento aparente na concentração de vitamina C em jejum duas semanas após a suplementação com pycnogenol®; já os valores da capacidade de absorção do radical oxigênio em jejum diminuíram. A capacidade antioxidante do plasma aumentou cerca de 15 a 19%, uma hora após a ingestão da dose diária de placebo ou pycnogenol®, sendo que não houve diferença significativa entre o pycnogenol® e o placebo. Quando foi medido o potencial antioxidante da urina coletada durante 24 horas o Pycnogenol® não aumentou, significativamente, o nível de fenólicos totais excretados na urina, não havendo, portanto aumento mensurável como resultado da suplementação. Os autores concluíram que o pycnogenol®, em dose de 200mg/dia, não melhorou *in vivo* a concentração de vitamina C, não agindo como um potente antioxidante em adultos jovens saudáveis.

2.5.3 - Ação radioprotetora dos flavonóides e do pycnogenol®

SHIMOI *et al.* (1994), avaliaram o efeito anticlastogênico de doze flavonóides, diferentes estruturalmente, em ratos irradiados, corpo todo, com raios gama, sendo determinado também a atividade antioxidativa destes flavonóides

contra a peroxidação lipídica. Esses compostos foram administrados na concentração de 5mM/kg de peso corporal, por meio de intubação gástrica, 6 horas antes da irradiação com dosagem de 1,5Gy. Após 42 horas foi colhida amostra sanguínea de cada animal para que fosse avaliada a frequência de reticulócitos micronucleados. A luteolina apresentou maior efeito sobre a redução da frequência dos reticulócitos micronucleados e também da inibição da peroxidação lipídica, de forma dose-dependente. Entretanto, a quercetina tetrametileter e a floretina mostraram menor atividade anticlastogênica e antioxidativa. Uma significativa correlação foi observada entre a atividade anticlastogênica e a atividade antioxidativa dos doze flavonóides. Estes resultados sugerem que o efeito radioprotetor dos flavonóides em ratos pode ser atribuído ao potencial desoxidante do radical hidroxil de uma maneira direta ou mediada por enzimas endógenas.

SHIMOI *et al.* (1996), estudaram o efeito radioprotetor de chá rooibos (*Aspalathus Linearis*) e plantas flavonóides contra danos oxidativos causados pela radiação gama em ratos. Foi realizado o fracionamento do chá, obtendo-se frações de água, metanol, flavonóide luteolin e tanino. Foi administrado 1µg de cada fração do chá, por intubação gástrica, 6 horas antes da irradiação de corpo todo com 1,5Gy de Césio 137 e, 42 horas após a irradiação foi colhida amostra sanguínea de cada animal para que fosse avaliada a frequência de reticulócitos micronucleados. A fração flavonóide apresentou maior efeito anticlastogênico e antioxidativo. Os autores sugeriram que plantas flavonóides, as quais mostram potencial antioxidativo, *in vitro*, funcionam como antioxidantes *in vivo* e seu efeito radioprotetor pode ser atribuído ao seu potencial desoxidante para radicais livres tais como radical hidroxil.

Em 2001, SALIOU *et al.*, utilizaram o pycnogenol® para avaliar o efeito protetor na pele contra eritema induzido por radiação ultravioleta. O fator nuclear kappa B-dependente (NF- κB) foi selecionado como um marcador da resposta pró-

inflamatória induzida na linhagem de queratinócitos (HaCaT) após exposição aos raios ultravioletas. O estudo foi dividido em duas etapas: estudo em humanos e estudo *in vitro*. A amostra constituiu-se de 21 voluntários os quais receberam o pycnogenol® na concentração de 1,10mg/Kg de peso corpóreo, por via oral, durante quatro semanas, quando foram submetidos à diferentes doses de radiação ultravioleta por um minuto. A dose de pycnogenol® foi aumentada para 1,66mg/Kg por mais quatro semanas e novamente os participantes foram irradiados. A leitura da dose mínima de eritema foi realizada antes de iniciar o estudo e 24 horas após as irradiações. Foi observado que a suplementação com pycnogenol® exerceu efeito preventivo sobre a inflamação induzida pela radiação ultravioleta na pele de humanos. Os queratinócitos (HaCaT), *in vitro*, foram irradiados com doses de 0 (radiação simulada) ou 150 mJ/cm², sendo que para o grupo tratado foi adicionado pycnogenol® ao meio de cultura 24 horas antes da irradiação. Para avaliar o gene NF-κB foi utilizada a atividade de transativação, e após este procedimento as células foram pré-tratadas com pycnogenol® na concentração de 1, 5 e 25µg/ml e também irradiadas após 24 horas. As células HaCaT não apresentaram alteração na viabilidade celular tanto na ausência quanto na presença de pycnogenol®. Quanto à transcrição para transatividade do gene NF-κB-dependente, a radiação ultravioleta aumentou sua expressão, porém quando o pycnogenol® foi adicionado ao meio de cultura, a expressão deste gene foi inibido significativamente de maneira dose-dependente nas células HaCaT. A fração nuclear dos queratinócitos HaCaT pré-tratadas com pycnogenol® e irradiadas apresentaram aumento na atividade de aglutinação do DNA quando comparadas ao grupo controle, entretanto o pycnogenol® não foi capaz de eliminar a aglutinação do gene NF-κB à seqüência de DNA. Os autores concluíram que o uso de suplementação oral com pycnogenol® aumenta a dose mínima de eritema e que o efeito inibitório do pycnogenol® sobre o gene de expressão NF-κB dependente, possivelmente, contribuiu para este aumento.

SIME & REEVE (2004) estudaram o efeito da aplicação tópica de uma loção contendo pycnogenol[®] quanto à proteção à inflamação, à imunossupressão e à produção de câncer de pele em ratos sem pêlos submetidos à dose diária minimamente edematosa de radiação ultravioleta solar-estimulada. No grupo controle foi aplicada loção base contendo somente água em óleo cosmético e em outro grupo foi aplicado o pycnogenol[®] nas seguintes concentrações: 0,025; 0,05; 0,1 e 0,2%, sendo este diluído em sulfóxido dimetil. A loção contendo pycnogenol[®] foi aplicada sobre o dorso dos animais imediatamente após a irradiação, sendo que as concentrações de 0,05; 0,1 e 0,2% demonstraram redução, dose-dependente, da reação inflamatória decorrente da queimadura solar. Quando os animais foram expostos consecutivamente, a 3 doses diárias minimamente edematosas, a reação de hipersensibilidade de contato foi suprimida para 54% nos animais tratados com a loção base. Já a loção de pycnogenol[®] reduziu essa imunossupressão para 22% e 13% para as concentrações de 0,05% e 0,1% de pycnogenol[®], respectivamente. A exposição crônica à radiação ultravioleta induziu o carcinoma de pele na 11^ª semana, tanto no grupo controle, quanto no grupo que recebeu aplicação diária de loção de pycnogenol[®] 0,05%. Entretanto, o aparecimento de tumor foi significativamente atrasado no grupo tratado com pycnogenol[®] na concentração de 0,2%, aparecendo somente na 20^ª semana. Além disso, 100% dos ratos do grupo controle apresentavam pelo menos um tumor na 30^ª semana e 33^ª semana para os animais que receberam 0,05% de pycnogenol[®]. Para aqueles tratados com 0,2% de pycnogenol[®] a prevalência máxima de tumor foi significativamente reduzida a 85% sendo que alguns animais permaneceram livres de tumor. Portanto, o pycnogenol[®] tópico, quando aplicado na pele após irradiação diária, produziu significativa e dose-dependente proteção para radiação ultravioleta contra inflamação aguda, imunossupressão e carcinogênese.

RAMOS *et al.*, em 2006, avaliaram o efeito radioprotetor do pycnogenol[®] na mucosa intestinal de ratos irradiados com dose única de 15Gy de

radiação X em corpo todo. Foram utilizados 60 animais divididos em 6 grupos: controle, irradiado, pycnogenol® 200mg/kg e pycnogenol® 300mg/kg não irradiado, pycnogenol® 200mg/kg e pycnogenol® 300mg/kg irradiados. Para os grupos tratados e irradiados o pycnogenol® foi administrado oralmente 72, 48 e 6 horas antes da irradiação, sendo o mesmo ocorrido antes da irradiação simulada nos grupos tratados e não irradiados. Foi observado que não houve diferença na mucosa intestinal, entre o grupo controle e os grupos tratados não-irradiados. Nos animais irradiados não-tratados ocorreu extensa perda ou redução na altura das vilosidades intestinais, assim como a camada glandular apresentou-se amplamente desorganizada, com capilares congestionados e presença de células inflamatórias. Quando comparado com o grupo somente irradiado, os animais irradiados e tratados com pycnogenol® tanto com 200mg/kg quanto 300mg/kg apresentaram significativa preservação na altura e número de vilosidades assim como da camada glandular, apresentando diminuído número de vasos congestionados. Os autores concluíram que o pycnogenol® proporcionou significativa proteção ao dano causado pela radiação ionizante na mucosa intestinal.

3 Proposição

Devido a grande importância que a radioterapia desempenha no tratamento de lesões malignas na região de cabeça e pescoço, e da necessidade de extrações dentárias no decorrer do tratamento radioterápico, esta pesquisa foi idealizada com a finalidade de avaliar o efeito radioprotetor do extrato da casca da pinha marítima francesa (pycnogenol®) no processo de reparação alveolar em ratos irradiados após extração dentária.

4 Material e Métodos

4.1 - Seleção dos Animais

Após aprovação pelo Comitê de Ética na Experimentação Animal da Universidade Estadual de Campinas - protocolo N° 907-1 (anexo 1), foram selecionados cem (100) ratos (*Rattus norvegicus*, *Albinus*, Wistar), com idade aproximada de 60 dias e peso aproximado de 250g, procedentes do Biotério Central da UNICAMP.

Os animais foram mantidos durante todo o experimento, em grupos de cinco, em gaiolas de policarbonato que encontravam-se em local com temperatura e umidade controladas, com ciclo alternado de 12 horas claro-escuro, recebendo ração balanceada padrão e água *ad libitum*, diariamente.

4.2 – Procedimento Cirúrgico

Os animais, após serem pesados, receberam via intramuscular 1,0ml/kg de peso corpóreo de solução de Cloridrato de Ketamina (Dopalen[®], Agribands do Brasil Ltda., Paulínea, SP, Brasil) e, 0,15ml/kg de peso corpóreo de solução de Cloridrato de Xilasina (Rompun[®], Bayer S.A., São Paulo, SP, Brasil), sendo em seguida submetidos à cirurgia para extração do incisivo superior esquerdo (Figura 1 e Figura 2). Para a realização das exodontias foi utilizado para luxação instrumento aplicador de hidróxido de cálcio adaptado, conforme descrito por Okamoto & Russo (1973) e pinça hemostática para a remoção do dente. Logo após, executou-se leve compressão na mucosa gengival do rebordo alveolar com finalidade de auxiliar na manutenção do coágulo. Após a cirurgia os animais receberam ração triturada até o final do experimento.



Figura 1 - Procedimento cirúrgico para a extração do incisivo superior esquerdo.



Figura 2 – Maxila após remoção do incisivo superior esquerdo.

4.3 – Grupos Experimentais

A amostra foi dividida, de forma aleatória, em quatro grupos experimentais:

- ❖ Grupo Controle (n=5) - animais que sofreram o procedimento cirúrgico para extração dentária e receberam, por via intragástrica, a solução base de água destilada (99,8%) e carboximetilcelulose 0,2%, tendo como finalidade serem submetidos ao mesmo nível de estresse que os demais animais.

- ❖ Grupo Irradiado (n=5) – animais que sofreram os mesmos procedimentos do grupo controle e foram submetidos à irradiação.

- ❖ Grupo Pycnogenol (n=5) – animais que sofreram o procedimento cirúrgico para extração dentária e receberam 200mg/kg de peso corpóreo de pycnogenol®, diluído na solução base.
- ❖ Grupo Pycnogenol Irrradiado (n=5) – animais que sofreram os mesmos procedimentos do grupo pycnogenol® e foram submetidos à irradiação.

4.4 – Administração do Pycnogenol®

O pycnogenol® (extrato da casca da pinha marítima francesa), gentilmente doado pelo Horphag Research Ltd UK, foi diluído em uma solução base contendo água destilada (99,8%) e carboximetilcelulose 0,2% (Figura 3). A carboximetilcelulose é um agente de suspensão medicamentosa.

Com base nos estudos de Schafer *et al.* (2005), Grimm *et al.* (2006) e Ramos *et al.* (2006), os animais pertencentes ao grupo pycnogenol e ao grupo pycnogenol Irrradiado, receberam 200mg/kg de peso corpóreo de pycnogenol® que foi administrado intragastricamente com auxílio de uma sonda, de forma que o pycnogenol® fosse depositado diretamente no estômago dos animais (Figura 4). Nos animais dos grupos controle e irradiado foi administrado, da mesma forma, a solução base na quantidade equivalente ao pycnogenol®, com a finalidade de que todos os animais fossem submetidos ao mesmo procedimento e mesmas condições de estresse.

A administração do pycnogenol® para o grupo pycnogenol Irrradiado e de solução base para o grupo irradiado foi realizada 72, 48 e 6 horas anterior à irradiação, assim como o pycnogenol® para o grupo pycnogenol e a solução base para o grupo controle anterior à irradiação *sham* (Ramos *et al.* 2006).



Figura 3- Carboximetilcelulose e Pycnogenol®.



Figura 4 - Administração intragástrica do pycnogenol®.

4.5 – Irradiação

Três dias após a cirurgia para extração dentária, os animais pertencentes ao grupo irradiado e ao grupo Pycnogenol Irrradiado, foram novamente pesados e anestesiados, via intramuscular, a fim de serem posicionados para a irradiação. Foram posicionados 5 animais por vez (Figura 5), a uma distância focal de 100cm. Após o posicionamento os animais foram protegidos por uma lâmina de chumbo de 4mm de espessura, deixando livre apenas a região de cabeça e pescoço. Posteriormente, conforme descrito nos trabalhos de Horn *et al.*, 1979; Guglielmotti, *et al.*, 1986 e Ramos *et al.* 2006, os animais foram irradiados com 15Gy de radiação X, utilizando acelerador linear da marca Varian, modelo Clinic 6/100 (Figura 6). O aparelho foi colimado de forma que o campo irradiado fosse de 18 X 30cm, irradiando apenas a região de cabeça e pescoço dos animais.



Figura 5 - Posicionamento dos animais para irradiação somente na região de cabeça e pescoço.



Figura 6 – Aparelho para irradiação dos animais.

4.6 – Obtenção das Peças

Os animais foram sacrificados, por aprofundamento anestésico, em grupos de 5 animais, aos 4, 7, 14, 21 e 28 dias após a realização da exodontia, Para remoção da maxila foi realizado um corte nas comissuras labiais e a seguir um corte posterior aos terceiros molares superiores, desta forma foi obtida a peça contendo toda a maxila. Todo o excesso de tecido mole foi removido e as peças foram fixadas em formoldeído 10% por 72 horas.

4.7 – Métodos Histológicos

Transcorrido o tempo de 72 horas de fixação, as peças foram cortadas utilizando micrótopo para tecido duro (Low Speed Diamond Wheel Saw, Suth Bay Technology Inc., Califórnia, USA) a fim de obter apenas o terço médio do alvéolo, como descrito por Pinto *et al.* em 1989. Para tanto foi realizado um corte 7mm

anterior ao primeiro molar, e outro corte 4mm anterior ao primeiro, obtendo-se uma peça de 4mm de espessura (Figura 7).

A seguir os espécimes foram lavados em água, descalcificados em ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) 4,13% tamponado em hidróxido de sódio (NaOH), desidratados e incluídos em Paraplasty Plus, conforme a técnica de rotina do Laboratório de Histologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba – UNICAMP. As amostras foram cortadas em micrótomo (Leica Histology & E. M. Products, Modell RM2155, Alemanha), obtendo-se secções de 5µm de espessura, em cortes semi-seriados transversais ao longo eixo do alvéolo. Portanto obteve-se 20 cortes por fragmento de alvéolo sendo 5 cortes no início do terço médio e a seguir, a cada 1300µm mais 5 cortes. Os últimos 5 cortes foram coincidentes com o final do terço médio do alvéolo. Uma vez montadas as lâminas, os cortes foram corados por Hematoxilina-Eosina (HE) para análise morfológica do tecido ósseo neoformado.

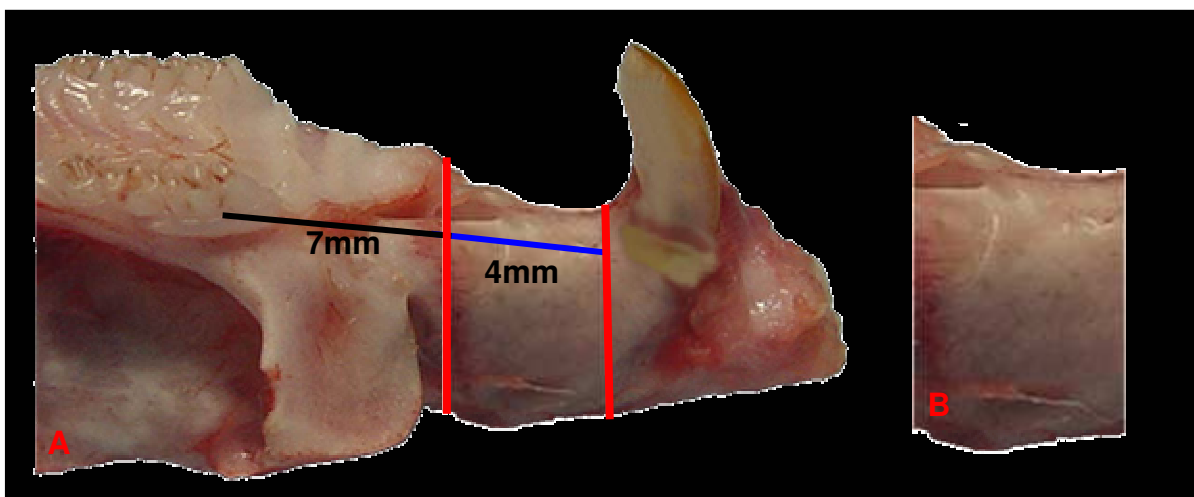


Figura 7 - A) Local de realização dos cortes na maxila. B) Fragmento do alvéolo correspondente ao terço médio do alvéolo.

4.7.1 – Avaliação Morfológica

Na avaliação morfológica foram observadas, qualitativamente, as características histológicas do processo de reparo alveolar nos diferentes tempos de estudo.

4.7.2 – Análise da Quantidade Óssea

Para análise da quantidade de osso neoformado na área de reparação alveolar nos diferentes grupos, foram selecionadas três áreas do alvéolo: porção vestibular, porção central e porção palatina, sendo que a quantidade de osso foi determinada por meio do método de impacto de pontos, observado ao microscópio de luz (Zeiss West, Alemanha) no aumento de 100X, onde o campo de observação foi superposto em uma grade reticulada com 100 pontos (Figura 8). Foi realizada a média da quantidade óssea presente em cada alvéolo e a seguir os resultados foram analisados estatisticamente pela análise de variância e teste de Tukey ($p < 0,05$).

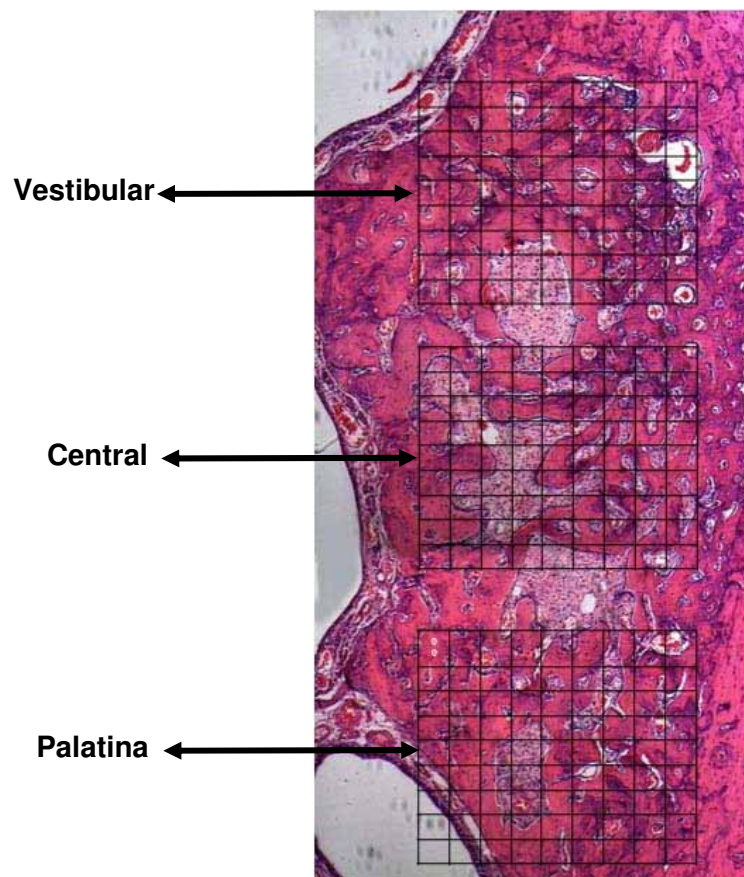


Figura 8 - Foto esquemática da grade reticulada sobreposta aos campos de análise do alvéolo.

5 Resultados

AVALIAÇÃO QUALITATIVA

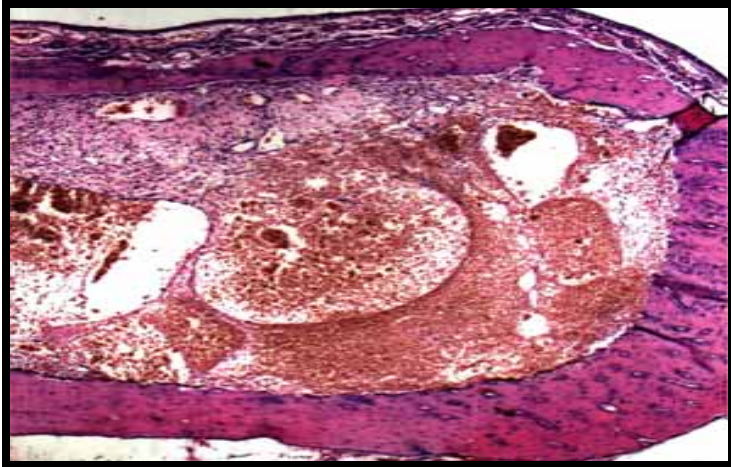
Descrição Morfológica: Coloração por Hematoxilina Eosina

4^o dia do Processo de Reparação Óssea Alveolar

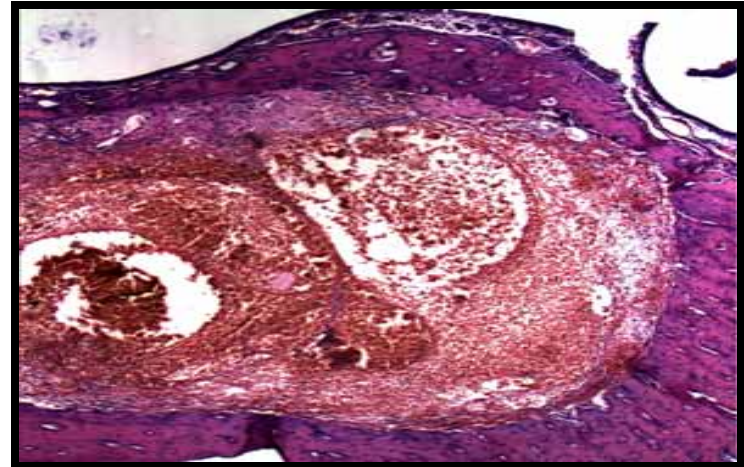
O grupo controle assim como o grupo pycnogenol apresenta o alvéolo preenchido por coágulo sanguíneo, com início de formação do tecido de granulação, sendo observado também vasos neoformados, início de formação da matriz óssea orgânica e remanescente do ligamento periodontal. No grupo irradiado observa-se a presença de coágulo sanguíneo, remanescente do ligamento periodontal e pequena quantidade de tecido de granulação, porém a não evidência da formação da matriz óssea orgânica indica um retardo no

processo de reparação. O grupo pycnogenol irradiado exibe um padrão de maturação mais adiantado em relação àquele do grupo irradiado, observando-se a presença de coágulo sanguíneo e tecido de granulação semelhante ao grupo controle, sendo observado também o início de formação da matriz óssea orgânica, entretanto este processo encontra-se mais atrasado que no controle.

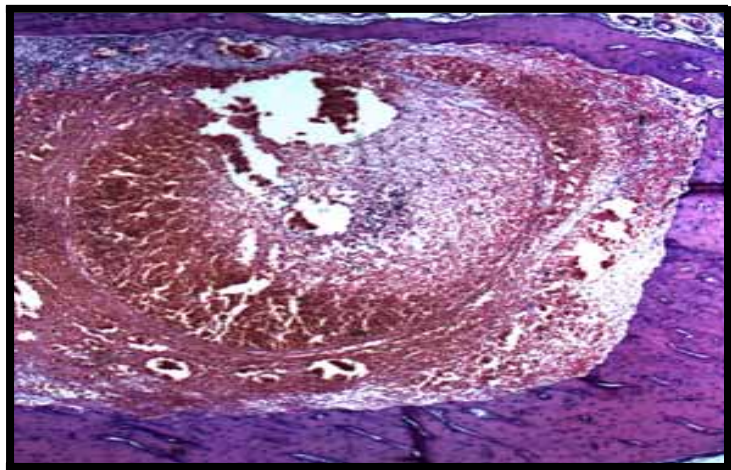
Aos 4 dias do processo de reparação óssea alveolar, a análise morfológica mostra que dos quatro grupos avaliados, os grupos controle e pycnogenol apresentam o processo de cicatrização alveolar mais evoluído em relação aos demais grupos, sendo que o grupo irradiado apresenta-se mais atrasado (Figura 9).



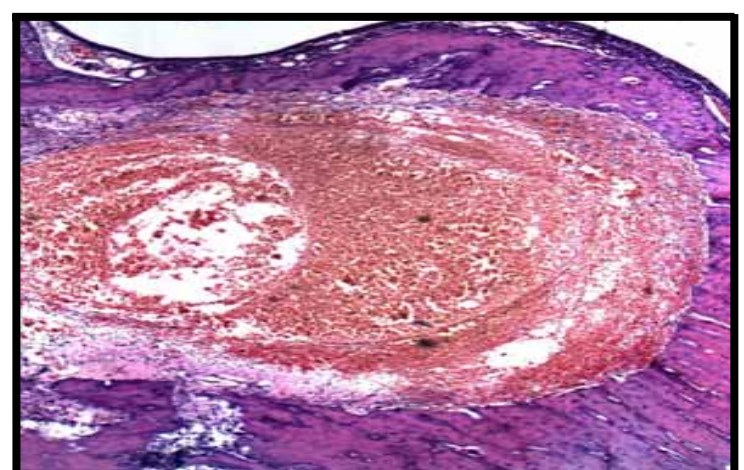
Grupo Controle



Grupo Irradiado



Grupo Pycnogenol



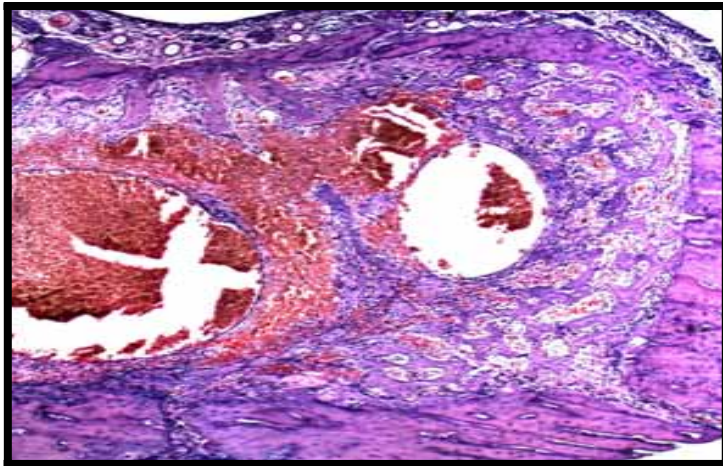
Grupo Pycnogenol Irradiado

Figura 9 – 4^o dia do Processo de Reparação Óssea Alveolar (Aumento de 50X).

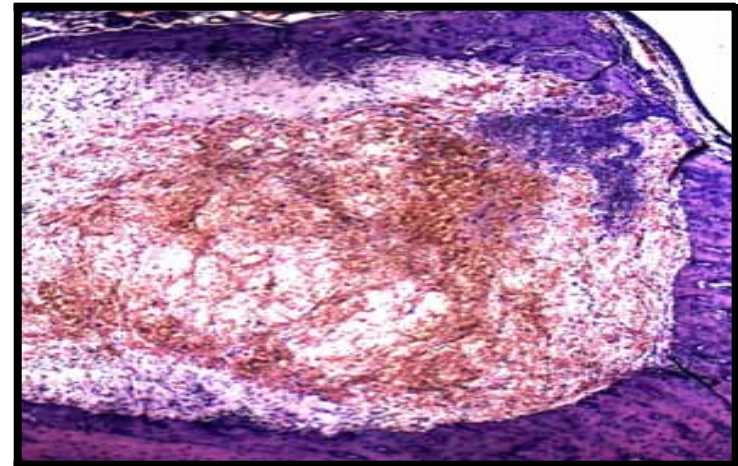
7º dia do Processo de Reparação Óssea Alveolar

Aos 7 dias o grupo controle já exibe reabsorção parcial do coágulo sanguíneo, observando-se ainda a presença do tecido de granulação e vasos neoformados. Entretanto, pode-se observar o início de formação de tecido ósseo. O grupo pycnogenol apresenta aspecto bastante semelhante àquele mostrado pelo grupo controle. No grupo irradiado, o processo de reparação óssea alveolar encontra-se bastante atrasado em relação ao grupo controle, observando-se ainda a presença de coágulo sanguíneo preenchendo quase todo o alvéolo, presença de tecido de granulação e vasos neoformados. Também observa-se neste grupo, a presença da matriz óssea orgânica, no entanto esta mostra-se escassa. O grupo pycnogenol irradiado apresenta os mesmos elementos que o grupo irradiado. Entretanto, nesse grupo já pode-se observar indícios de reabsorção do coágulo sanguíneo. Além disso, a formação da matriz óssea orgânica encontra-se mais evidente que no grupo irradiado. Apesar disso, a reparação óssea alveolar mostra-se mais atrasada que no grupo controle.

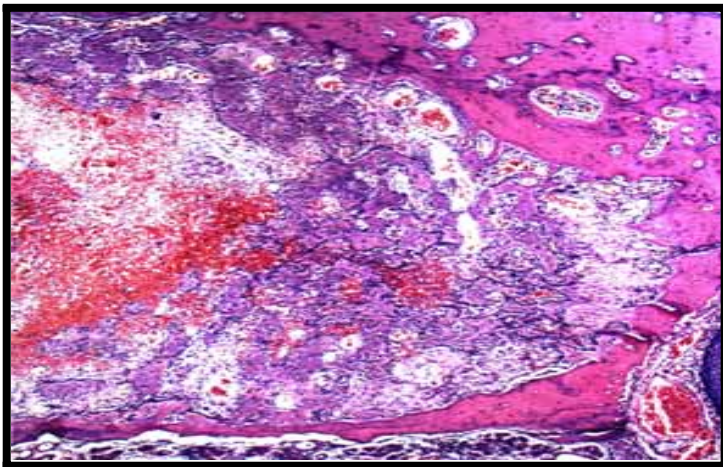
A análise morfológica aos 7 dias demonstra evolução no processo de reparação quando comparado ao tempo de 4 dias, em todos os grupos avaliados. Os grupos controle e pycnogenol apresentam padrão de reparação semelhante. O grupo pycnogenol irradiado, apesar de mais atrasado em relação ao controle, exibe um padrão de reparação óssea mais desenvolvido que o grupo irradiado (Figura 10).



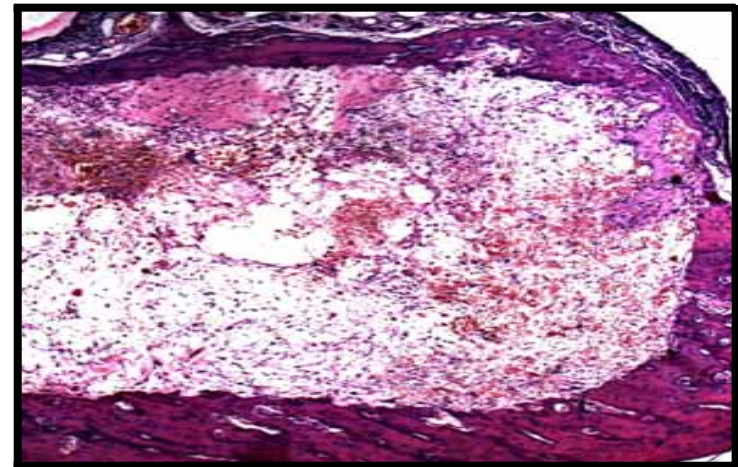
Grupo Controle



Grupo Irradiado



Grupo Pycnogenol



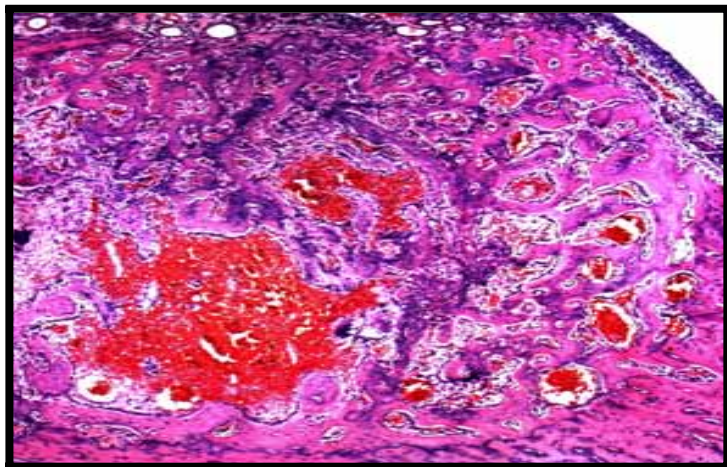
Grupo Pycnogenol Irradiado

Figura 10 – 7º dia do Processo de Reparação Óssea Alveolar (Aumento de 50X).

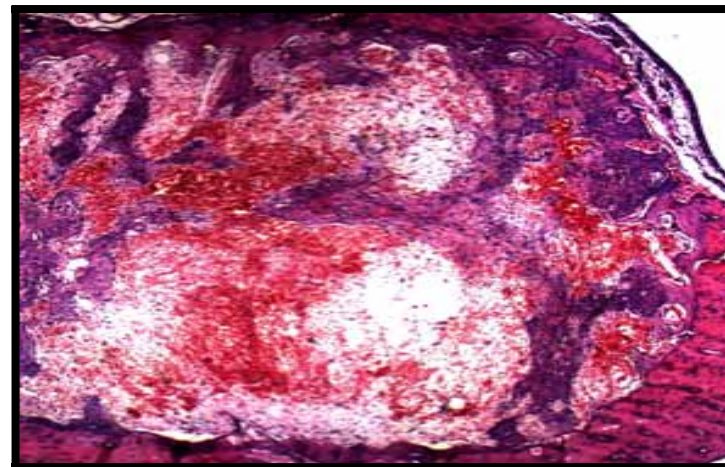
14^o dia do Processo de Reparação Óssea Alveolar

O processo de reparo ósseo alveolar mostra-se bem evoluído no grupo controle aos 14 dias, evidenciado pela neoformação óssea preenchendo toda a extensão do terço médio do alvéolo, embora ainda possa ser observado tecido de granulação entre as trabéculas. A maioria dos vasos sanguíneos já apresenta sinais de circulação ativa. O grupo pycnogenol apresenta padrão de reparação óssea alveolar semelhante ao observado no grupo controle. No grupo irradiado ainda observa-se quantidade significativa de coágulo sanguíneo, tecido de granulação pouco desenvolvido e escassa neoformação óssea. O grupo pycnogenol irradiado demonstra aspecto de reparação bastante semelhante ao irradiado, observando-se portanto poucas trabéculas ósseas neoformadas.

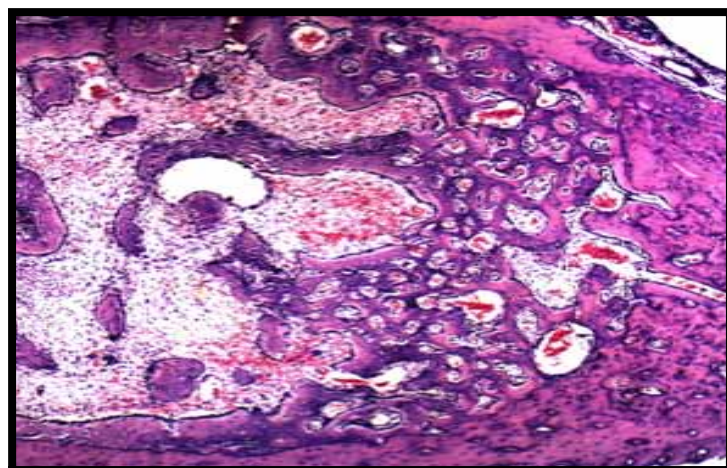
Aos 14 dias a análise morfológica mostra uma evolução no processo de reparação óssea alveolar. Os grupos irradiado e pycnogenol irradiado apresentam agora processo de reparo com padrão de evolução semelhante, porém com a reparação atrasada em relação aos grupos controle e pycnogenol (Figura 11).



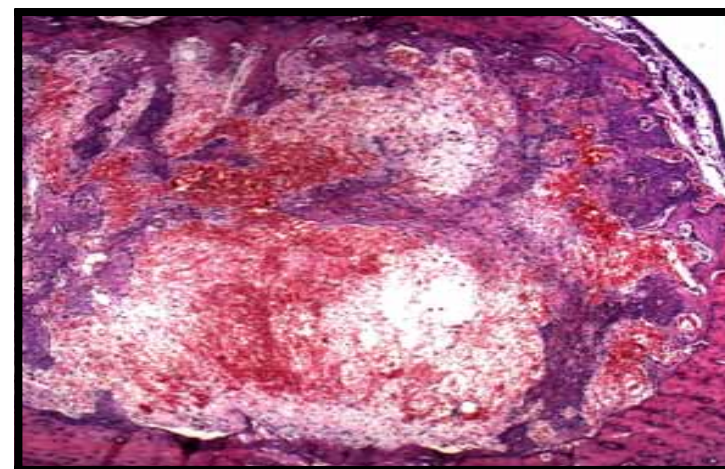
Grupo Controle



Grupo Irradiado



Grupo Pycnogenol



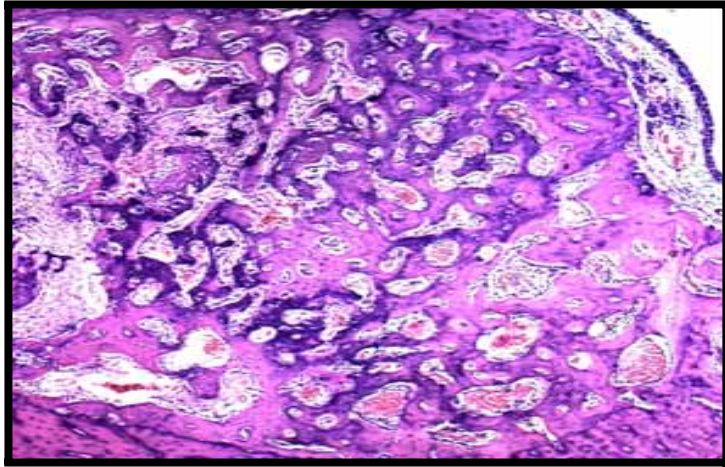
Grupo Pycnogenol Irrradiado

Figura 11 – 14º dia do Processo de Reparação Óssea Alveolar (Aumento de 50X).

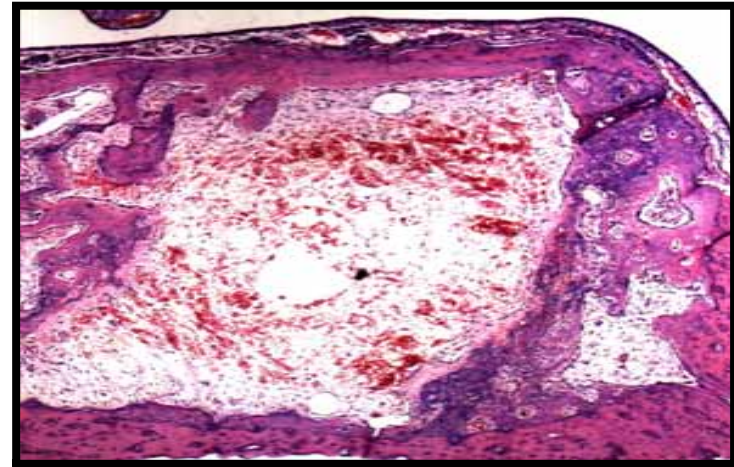
21^o dia do Processo de Reparação Óssea Alveolar

Aos 21 dias, no grupo controle, o processo de reparação óssea alveolar continuou seguindo o padrão de evolução normal, podendo-se observar o terço médio do alvéolo quase todo preenchido por osso neoformado. O grupo pycnogenol apresenta-se semelhante ao grupo controle. Em relação ao grupo controle, apesar da presença de tecido ósseo neoformado em toda a extensão do terço médio do alvéolo, o grupo irradiado mostra-se bastante atrasado, observando-se ainda a presença de tecido de granulação entre as trabéculas ósseas. O grupo pycnogenol irradiado também exhibe padrão de reparo alveolar atrasado em relação ao grupo controle, e semelhante ao grupo irradiado, porém com trabéculas mais definidas.

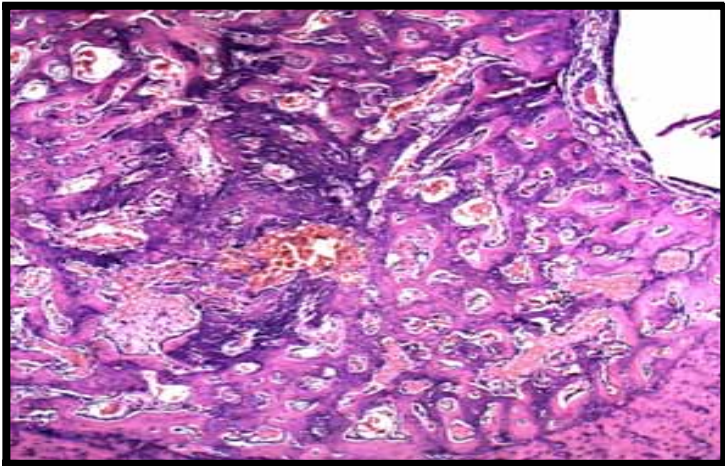
O processo de reparação óssea alveolar aos 21 dias demonstra que os grupos controle e pycnogenol apresentam-se com aspecto bastante semelhante e mais desenvolvido que os grupos irradiado e pycnogenol irradiado. O grupo pycnogenol irradiado embora muito menos evoluído que o controle demonstra um padrão de reparo superior ao irradiado, porém não expressivo (Figura 12).



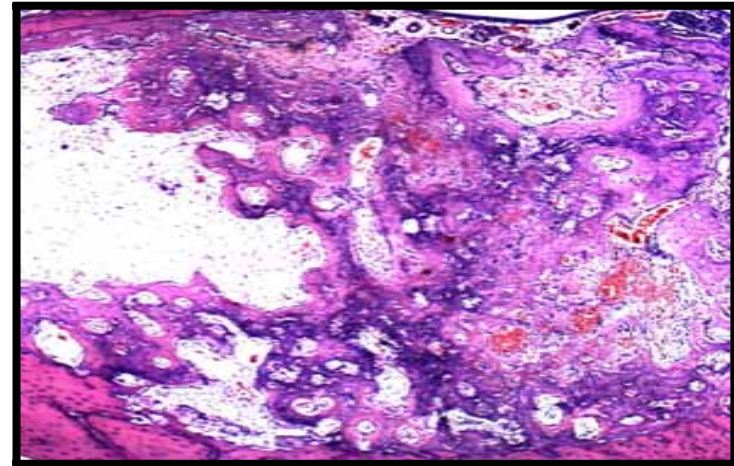
Grupo Controle



Grupo Irrradiado



Grupo Pycnogenol



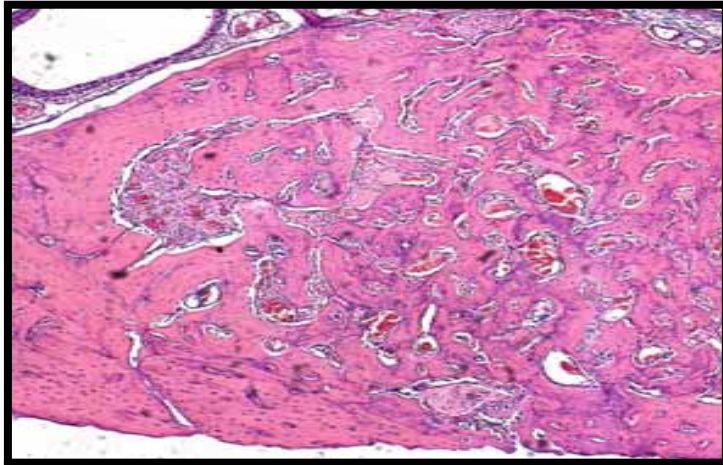
Grupo Pycnogenol Irrradiado

Figura 12 – 21^o dia do Processo de Reparação Óssea Alveolar (Aumento de 50X).

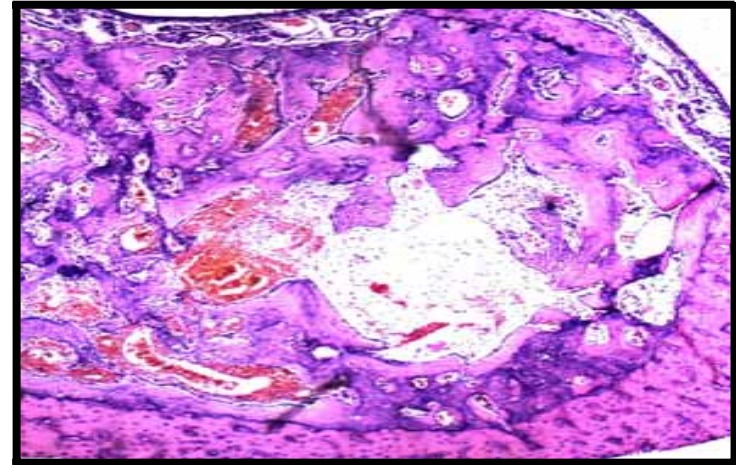
28º dia do Processo de Reparação Óssea Alveolar

O processo de reparação óssea alveolar aos 28 dias demonstra que no grupo controle o terço médio do alvéolo encontra-se preenchido por tecido ósseo maduro em toda sua extensão. Neste grupo já se pode observar a presença de medula óssea vermelha. O grupo pycnogenol apresenta aspecto de reparação bastante semelhante ao mostrado pelo grupo controle. O grupo irradiado mostra-se bastante atrasado em relação aos dois grupos anteriores, com trabéculas ósseas imaturas não preenchendo todo o terço médio do alvéolo. Ainda pode-se observar a presença de tecido de granulação. O grupo pycnogenol irradiado apresenta-se pouco mais evoluído que o grupo irradiado. Em relação ao grupo controle encontra-se bastante atrasado.

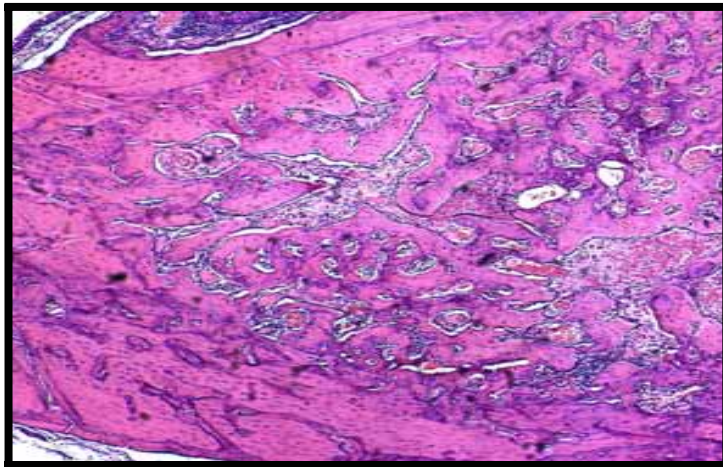
A análise morfológica aos 28 dias demonstra que os grupos controle e pycnogenol continuam com o processo de reparo superior aos demais grupos. Os grupos irradiado e pycnogenol irradiado apresentam um padrão de cicatrização semelhante, porém atrasados em relação aos demais (Figura 13).



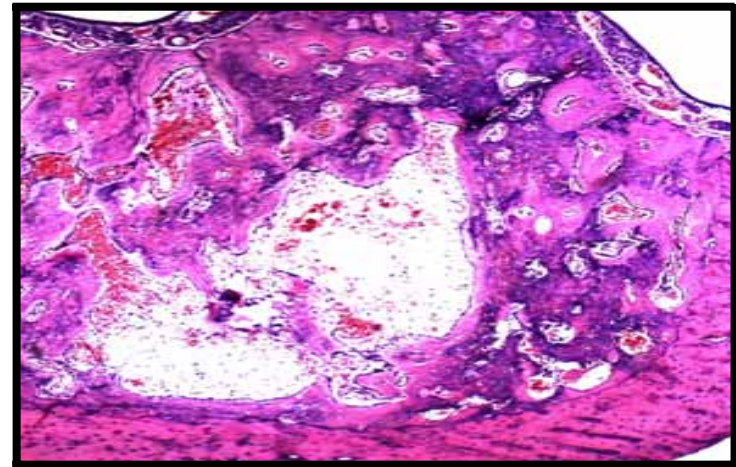
Grupo Controle



Grupo Irradiado



Grupo Pycnogenol



Grupo Pycnogenol Irradiado

Figura 13 – 28º dia do Processo de Reparação Óssea Alveolar (Aumento de 50X).

AVALIAÇÃO QUANTITATIVA

A fim de verificar a quantidade de osso neoformado, foram realizadas três medidas em áreas diferentes, na mesma lâmina, como explicado anteriormente no material e métodos, contando-se os pontos de intersecção entre o retículo e as trabéculas ósseas. A seguir foi calculada a média da quantidade de trabéculas ósseas no alvéolo.

Os dados obtidos foram submetidos a tratamento estatístico pela análise da variância (ANOVA) e teste de Tukey. Os resultados estão apresentados na tabela 1 e na Figura 14.

Tabela 1 - Médias e desvio padrão da quantidade de osso presente em cada grupo para cada tempo de estudo

PYC	IRR	Tempo				
		4	7	14	21	28
Sim	Sim	0.00 (0.00)Ca	9.63 (5.24)Cb	56.08 (9.27)Bb	97.61 (28.44)Ab	94.8 (33.60)Ab
	Não	0.00 (0.00)Ea	40.64 (3.88)Da	89.56 (14.33)Ca	143.39 (32.43)Ba	146.46 (17.20)Aa
Não	Sim	0.00 (0.00)Ca	12.35 (2.75)Cb	55.30 (12.26)Bb	84.17 (24.47)Ab	93.01 (29.94)Ab
	Não	0.00 (0.00)Ea	47.15 (9.00)Da	88.35 (12.86)Ca	146.92 (21.55)Ba	160.15 (15.52)Aa

Médias seguidas de letras distintas (maiúsculas na horizontal e minúsculas na vertical dentro de cada categoria de Pycnogenol) diferem entre si pela ANOVA e teste de Tukey ($p < 0,05$).

P(Pycnogenol)=0,8023

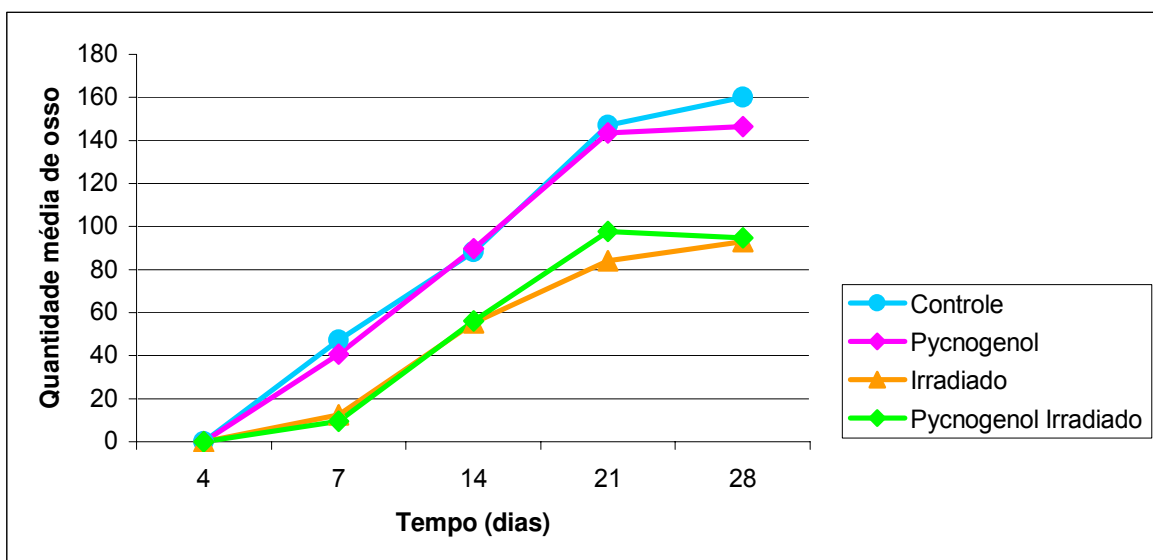


Figura 14: Quantidade média de osso em função do tempo para os diferentes grupos

Observa-se pela tabela 1 e pela Figura 14 que, quando comparados aos 4 dias todos os grupos não apresentam diferença estatisticamente significativa. Nos demais intervalos de tempo, ou seja, aos 7, 14, 21 e 28 dias não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos controle e pycnogenol, sendo o mesmo observado para os grupos irradiado e pycnogenol irradiado. Entretanto, observa-se diferença significativa entre os grupos não irradiados e aqueles irradiados, em que os grupos não irradiados apresentam maior quantidade de trabéculas ósseas.

Comparando-se agora cada grupo, nos diferentes tempos de estudo, observa-se que os grupos controle e pycnogenol apresentam diferença estatisticamente significativa entre todos os períodos de tempo, havendo uma relação diretamente proporcional entre a quantidade de osso e o tempo. Os grupos irradiado e pycnogenol irradiado também apresentam aspecto semelhante sendo observado que não houve diferença significativa entre os tempos de 4 e 7 dias, assim como entre os tempos de 21 e 28 dias, diferindo-os do grupo 14 dias.

6 Discussão

O osso é um tecido metabolicamente ativo sendo que para sua produção é necessária a secreção de moléculas de colágeno e substância fundamental. O tecido ósseo é um tipo especializado de tecido conjuntivo, sendo formado por células e matriz extracelular calcificada, que corresponde à matriz óssea. É composto por dois tipos de células: os osteócitos, que se encontram situados em cavidades no interior da matriz óssea; os osteoblastos, responsáveis pela produção da parte orgânica que comporá a matriz óssea; e além dos osteoclastos, células responsáveis pela reabsorção do tecido ósseo, apresentando participação ativa no processo de remodelamento. Portanto para que ocorra o remodelamento ósseo Bruder *et al.*, (1994), relatam que é necessária a interação de duas linhagens de células: a linhagem mesenquimal osteoblástica e a linhagem osteoclástica hematopoiética.

Diante de um fator que cause a alteração da integridade do tecido ósseo, como no caso de fraturas e cirurgias, o osso necessita de reparação, a fim

de voltar a exercer suas atividades funcionais normais (Junqueira & Carneiro, 1999; Guyton & Hall, 2002). No caso de fraturas ósseas há uma máxima ativação dos osteoblastos além da formação de novos osteoblastos a partir das denominadas células osteoprogenitoras, que são células tronco do osso localizadas na membrana óssea. Assim, após pouco tempo, surge entre as duas extremidades fraturadas do osso, grande proeminência de tecido osteoblástico e se desenvolve nova matriz óssea orgânica, seguida da deposição de sais de cálcio (Guyton & Hall, 2002). Esse evento ocorre também no osso alveolar após extração dentária devido a deposição óssea no alvéolo.

Segundo McInnis *et al.* (1980) o fluxo sanguíneo desempenha importante função no processo de cicatrização óssea sendo que há uma correlação significativa entre o fluxo sanguíneo e a nova formação óssea. O processo de cicatrização óssea sofre influência também de fatores intrínsecos como alteração na expressão de citocinas e de fatores extrínsecos como a radiação.

As altas doses de radiação podem exercer efeitos diferentes sobre a proliferação e diferenciação celular de osteoblastos *in vitro*, dependendo do tipo de célula afetada, conforme descrito por Dare *et al.*, (1997). O mesmo também foi observado por Dudziak *et al.*, (2000), os quais relatam que a radiação ionizante pode diminuir o processo de reparo ósseo pela alteração da expressão de citocinas, resultando em alterações na diferenciação osteoblástica, causando alteração na proliferação de osteoblastos e formação da matriz extracelular. A radiação também altera a integridade da mucosa alveolar (Altobelli *et al.*, 1987) e afeta o componente osteogênico do osso (Lorente *et al.*, 1992).

As proteínas ósseas morfogenéticas são fundamentais ao processo de reparação e regeneração esquelética, sendo que essas proteínas, em algum momento, desempenham papel fisiológico, enquanto que em outro desempenham

papel patológico. Essas proteínas são induzidas por estímulos como o impacto de fratura e estresse mecânico em regiões submetidas à formação de tecido ósseo (Nakase & Yoshikawa, 2006). O potencial das proteínas ósseas morfogenéticas em melhorar a reparação óssea prejudicada pela irradiação foi investigada por Würzler *et al.* em 1998, os quais concluíram que a radiação induziu prejuízo na reparação óssea, no entanto este dano foi minimizado em animais irradiados e tratados com a proteína óssea morfogenética.

Após um processo de reparo a disposição espacial imperfeita dos elementos microscópicos do tecido ósseo pode contribuir significativamente para uma nova fratura de um osso longo (Wang, 2000) assim como os efeitos deletérios dos raios X como, por exemplo, a osteorradionecrose também pode provocar fraturas agudas sem capacidade de reparação (Williams & Davies, 2006).

O dano da radiação em células semelhantes a osteoblastos (MC3T3-E1) foi demonstrado nas pesquisas realizadas por Dare *et al.*, 1997; Dudziak *et al.*, 2000 e Szymczyk *et al.*, 2004. Estes autores relataram que a radiação aumenta a atividade da fosfatase alcalina, inibe o conteúdo de DNA das células MC3T3-E1, diminui a proliferação celular e estimula a diferenciação celular, resultando na diminuição da massa óssea.

Segundo Würzler *et al.* em 1998, a radioterapia para tratamento de tumores de cabeça e pescoço, muito freqüentemente, resulta em dano na reparação de ossos crânio-maxilo-faciais assim como na vizinhança. A ocorrência da radionecrose nos ossos, que pode se dar após a radioterapia, é uma importante alteração clínica e ainda não está completamente entendida, embora tenha sido mostrado que a radiação altera o equilíbrio entre a atividade osteoblástica e osteoclástica, contribuindo com o processo destrutivo.

O alvéolo dental após a exodontia é considerado um excelente campo para a análise do comportamento do reparo ósseo, tanto em alvéolo sadio, quanto em alvéolo submetido a exposição à radiação. A reparação alveolar é considerada completa quando o alvéolo se encontra preenchido por tecido ósseo neoformado e a crista alveolar remodelada (Raveli *et al.*, 1990; Cordeiro *et al.*, 1992; Raveli *et al.*, 1996).

O processo de reparação óssea alveolar varia de espécie para espécie, embora a seqüência em que ocorra seja bastante semelhante. Assim, no homem o surgimento das primeiras fibras osteogênicas no alvéolo se dá 7 dias após a extração dentária e o início do desenvolvimento ósseo ocorre no 21^o dia pós cirúrgico, já observando-se neste período a mineralização óssea. A formação óssea completa ocorre aos 35 dias após a exodontia (Amler, 1969). No cão a formação óssea inicia-se no 7^o dias pós-extração (King *et al.*, 1968). No macaco a osteogênese inicia-se, aproximadamente, 12 a 16 dias após a extração (Vizioli *et al.*, 1974) e no rato a fase de formação óssea é considerada por Bodner *et al.* (1993) como o período entre o 5^o e o 20^o dia após a exodontia.

Segundo Pinto *et al.* (1989) em trabalho no qual o objetivo não é avaliar a cronologia, mas sim analisar a resposta do processo de reparo alveolar a fatores endógenos e exógenos como a radiação, o terço médio do alvéolo deve ser o de escolha visto que o terço cervical está sujeito a impactos alimentares e musculares. Já o terço apical tem como ponto desfavorável o fato de ser diminuto, o que pode fazer com que este seja confundido com a proximidade de suas paredes alveolares.

Nesta pesquisa avaliou-se o efeito de uma substância antioxidante, o pycnogenol[®], no processo de reparação alveolar em ratos irradiados tendo como finalidade observar se esta substância pode ser utilizada como radioprotetora para o tecido ósseo em formação. Aos 4 dias pode-se verificar que os grupos controle e

pycnogenol, seguiram o padrão normal de reparação alveolar descrito na literatura para este período de tempo, ou seja, presença de coágulo sanguíneo, remanescente do ligamento periodontal, tecido de granulação, neoformação capilar e início de formação da matriz óssea orgânica, seguindo o que foi evidenciado nos trabalhos de Frandsen, 1962; King *et al.*, 1968; Amler, 1969; Okamoto & Russo, 1973; Horn *et al.*, 1979; Pinto *et al.*, 1989; Raveli *et al.*, 1990; Cordeiro *et al.*, 1992; Raveli *et al.*, 1996; e Devlin *et al.*, 1997. Segundo Valdrighi *et al.* (1974) a membrana periodontal remanescente desempenha um importante papel na organização do coágulo sanguíneo. Entretanto, nos estudos de Frandsen, 1962; Johansen, 1970; Okamoto & Russo, 1973; Horn *et al.*, 1979 e Devlin *et al.*, 1997, a neoformação óssea já estava presente aos 4 dias, o que não foi encontrado neste estudo.

Em relação aos grupos irradiado e pycnogenol irradiado, os quais apresentaram-se semelhantes, foi observada a presença de coágulo sanguíneo, restos de ligamento periodontal e discreto tecido de granulação, não sendo observada a formação da matriz óssea orgânica, sendo que estes achados são consistentes com os descritos por Horn *et al.*, 1979; Pinto, Martinelli & Pinto, 1989; Raveli *et al.*, 1990; Cordeiro *et al.*, 1992 e Raveli *et al.*, 1996, para alvéolos irradiados. Pode-se, portanto observar o atraso no processo de reparo alveolar em ratos irradiados em relação a seus respectivos controles não irradiados, assim como não foi observada a ação radioprotetora do pycnogenol® no grupo pycnogenol irradiado. Estatisticamente, não houve diferença entre os grupos irradiados e não irradiados aos 4 dias.

Aos 7 dias nos grupos controle e pycnogenol pode-se observar a presença de tecido de granulação e início da formação óssea, portanto ainda estava presente pequena quantidade de coágulo, sendo este resultado compatível com o encontrado por Frandsen, 1962; Okamoto & Russo, 1973; De Carvalho *et al.*, 1980; Raveli *et al.*, 1990; Cordeiro *et al.*, 1992; Bodner *et al.* 1993; Raveli *et al.*,

1996; Carvalho *et al.*, 1997 e Devlin *et al.*, 1997, sendo o mesmo descrito por Pinto, Martinelli & Pinto (1989) no processo de reparo em ratos aos 6 dias e por King *et al.*, (1968) em cão aos 8 dias. Entretanto, diferentemente do encontrado neste estudo, Johansen (1970) demonstrou que aos 6 dias em ratos o alvéolo encontrava-se preenchido por novo osso e Horn *et al.*, (1979), relataram a completa reabsorção do coágulo sanguíneo e quantidade expressiva de osso neoformado. Já Amler (1969) em seu estudo realizado por meio de biópsia em humanos, demonstra que aos 7 dias ocorre a substituição do coágulo por tecido de granulação e surgimento das primeiras fibras osteogênicas.

A neoformação capilar e a matriz óssea orgânica observadas nos grupos controle e pycnogenol[®] aos 4 dias só estavam presentes nos grupos irradiado e pycnogenol irradiado a partir do 7^o dia de reparação alveolar, sendo notado ainda tecido de granulação e grande quantidade de coágulo sanguíneo preenchendo quase todo o terço médio do alvéolo, conforme também descrito por Horn *et al.*, 1979; Pinto *et al.*, 1989; Raveli *et al.*, 1990; e por Cordeiro *et al.*, 1992. Entretanto Frandsen, 1962; Pinto *et al.*, 1989; Raveli *et al.*, 1990; e Raveli *et al.*, 1996, apesar de também demonstrarem a presença do tecido de granulação estes autores relatam que, embora em pequena quantidade, já era observada a presença de osso neoformado aos 7 dias em ratos irradiados. Assim, o atraso expressivo no processo de reparo alveolar aos 7 dias, indica que a dose de radiação utilizada causou escassa formação da matriz óssea orgânica, o que pode ter causado a ausência total de neoformação óssea nos grupos irradiados.

Estatisticamente não houve diferença significativa entre os tempos de 4 e 7 dias para os grupos irradiado e pycnogenol irradiado, entretanto aos 7 dias houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos não irradiados e aqueles irradiados.

O processo de reparo ósseo alveolar mostrou-se bem evoluído nos grupos controle e pycnogenol aos 14 dias, evidenciado pela neoformação óssea preenchendo toda a extensão do terço médio do alvéolo, embora ainda fosse observado tecido de granulação entre as trabéculas, sendo estes achados também descritos por Frandsen, 1962; Okamoto & Russo, 1973; Guglielmotti *et al.*, 1986; Pinto *et al.*, 1989; Raveli *et al.*, 1990; Cordeiro *et al.*, 1992; Raveli *et al.*, 1996; Carvalho *et al.*, 1997 e Elsubeihi & Heersche, 2004. Entretanto Raveli *et al.*, 1990 e Raveli *et al.*, 1996, mencionam ainda a presença de coágulo sanguíneo em algumas áreas do alvéolo. Já nos grupos irradiado e pycnogenol irradiado, a aparência do tecido em formação estava de acordo com aquela observada por Pinto, Martinelli & Pinto (1989), os quais relataram haver pequena quantidade de tecido ósseo, presença de tecido de granulação e remanescente do coágulo sanguíneo aos 14 dias de cicatrização alveolar em ratos irradiados. Na pesquisa de Frandsen (1962) o alvéolo encontrava-se parcialmente preenchido por osso aos 12 dias em ratos irradiados, já Raveli *et al.* (1990), Cordeiro *et al.* (1992) e Raveli *et al.* (1996) demonstraram a presença de pequena quantidade de tecido de granulação e discreta presença de trabéculas ósseas neoformadas. Por outro lado Guglielmotti *et al.* (1986) relataram a presença de trabeculado ósseo apenas na porção apical e o restante do alvéolo preenchido por tecido de granulação. Uma vez que nesta pesquisa foi avaliado o terço médio do alvéolo, pode-se dizer que coincide com os achados desses últimos autores.

Assim, como demonstrado morfológicamente, estatisticamente foi observada diferença significativa apenas entre os grupos irradiados e não irradiados.

Nos resultados pode-se verificar que aos 21 dias, os grupos controle e pycnogenol foram reparados de acordo com os parâmetros encontrados na literatura e estabelecidos para este período de tempo, ou seja, progressiva formação óssea, onde quase todo o terço médio do alvéolo encontrava-se

preenchido por osso neoformado (Frandsen, 1962; King *et al.*, 1968; Johansen, 1970; Okamoto & Russo, 1973; De Carvalho *et al.*, 1980; Pinto *et al.*, 1989; Raveli *et al.*, 1996; Carvalho *et al.*, 1997).

Neste mesmo período de tempo nos grupos irradiado e pycnogenol irradiado, considerável quantidade de tecido de granulação ainda estava presente e, apesar da presença de tecido ósseo neoformado, este preenchia apenas parte do alvéolo, estando estes resultados consistentes com os de Pinto *et al.* (1989) e Raveli *et al.* (1996).

Os grupos controle e pycnogenol não diferiram estatisticamente aos 21 dias, sendo o mesmo observado para os grupos irradiado e pycnogenol irradiado. Diferença estatisticamente significativa ocorreu apenas entre os grupos irradiados e não irradiados.

O padrão normal de reparação alveolar em ratos após 28 dias da extração é caracterizado por trabéculas ósseas bem definidas preenchendo toda a extensão do alvéolo (Raveli *et al.*, 1990; Cordeiro *et al.*, 1992; Raveli *et al.*, 1996) sendo esse achado compatível com o demonstrado em nossos resultados. Elsubeihi & Heersche (2004) relataram que um aumento máximo da densidade em alvéolos de ratos após extração dentária ocorre entre 0 e 28 dias pós-cirúrgico, com subsequente diminuição após este período. Já Bodner *et al.* (1993) demonstraram que a diferença na densidade de alvéolos de ratos após exodontia foi estatisticamente significativa até o 28º dia na área apical e até o 45º dia na área de crista.

Nos grupos irradiado e pycnogenol irradiado, aos 28 dias o processo de reparo alveolar ainda não havia se completado, encontrando-se bastante atrasado em relação aos grupos controle e pycnogenol, sendo observadas trabéculas ósseas imaturas preenchendo parcialmente o alvéolo. Esta condição também foi

observada por Frandsen, 1962; Raveli *et al.*, 1990; Cordeiro *et al.*, 1992 e Raveli *et al.*, 1996.

Estatisticamente não houve diferença significativa entre os dias 21 e 28 dias para os grupos irradiado e pycnogenol irradiado. Em relação aos grupos controle e pycnogenol embora não tenha havido diferença estatisticamente significativa entre si, foi observada diferença estatisticamente significativa entre estes grupos e aqueles irradiados, novamente confirmando o atraso no processo de reparo alveolar nos grupos irradiados uma vez que estes apresentavam menor média da quantidade de osso no alvéolo.

Este estudo confirma que um marcante atraso no processo de reparação alveolar é provocado pela radiação X, assim como descrito por outros autores (Frandsen, 1962; Frandsen, 1963; Zach *et al.*, 1973; Raveli *et al.*, 1990; Cordeiro *et al.*, 1992; Raveli *et al.*, 1996); e diferentemente do demonstrado por Starcke & Shannon (1977) que após acompanharem 62 pacientes submetidos à radioterapia na região de cabeça e pescoço após extração dentária concluíram que o tempo de cicatrização entre as extrações e o início da radioterapia pode não ser crítico, uma vez que em seus estudos a exodontia pré-irradiação não foi associada com o aumento das sequelas pós-irradiação.

A diferença encontrada neste estudo entre os grupos não irradiados e os grupos irradiados pode também estar associada ao aumento da atividade osteoclástica em animais irradiados, conforme demonstrado por Frandsen, 1963; Raveli *et al.*, 1990 e Kurihashi *et al.*, 2002 ou ainda à diminuição da atividade da fosfatase alcalina nos grupos irradiados. Segundo Raveli *et al.* (1990) as vesículas extracelulares presentes na matriz óssea, desempenham papel fundamental no início da mineralização em condições normais ou patológicas, essas organelas apresentam alta atividade de fosfatase alcalina e hidrólise de inibidores da calcificação. Sela *et al.*, 1982 sugerem que altas doses de radiação promovem

diminuição da atividade da fosfatase alcalina nas três semanas que se seguem a irradiação, conforme também descrito por Guglielmotti *et al.* (1986) os quais relataram que a radiação X diminui a resposta vascular, reduzindo, portanto, a atividade da fosfatase alcalina, o que provocaria uma depressão fibroblástica, resultando na diminuição da diferenciação osteoblástica e conseqüentemente reduzindo a formação óssea. Contrariamente do encontrado por Dare *et al.*, 1997; Dudziak *et al.*, 2000 e Szymczyk *et al.* em 2004, os quais relataram que a radiação aumentou a atividade da fosfatase alcalina em células osteoblásticas clonais. Entretanto, essa relação da radiação com a fosfatase alcalina é bem aceita como uma das causas que explicariam o retardo do processo de reparação alveolar, uma vez que, como citado anteriormente, segundo Sela *et al.* (1982), a diminuição desta se dá nas três semanas após a irradiação.

Embora o objetivo desta pesquisa tenha sido avaliar uma possível ação radioprotetora do pycnogenol[®], esta não foi observada em alvéolos irradiados após a extração dentária em ratos. Entretanto, a literatura é escassa em trabalhos a respeito da ação de substâncias radioprotetoras em tecido ósseo irradiado, não sendo localizado nenhum estudo que avaliasse a ação destas substâncias em reparação óssea alveolar, portanto não foi possível comparação direta com nenhum outro material.

Rohdewald (2002) relatou a baixa toxicidade do pycnogenol[®] tanto em aplicações agudas quanto crônicas, entretanto não foi encontrado na literatura pesquisada os valores base de toxicidade desta substância. Ainda Rohdewald (2002) descreve que o pycnogenol[®] apresenta rápida absorção, sendo que Rice-Evans (2004) demonstrou que a absorção dos flavonóides é via intestinal, uma vez que essas substâncias são substratos para várias enzimas localizadas no intestino delgado e cólon, entretanto vários metabólitos dos flavonóides podem ser absorvidos pelo intestino grosso, ocorrendo posterior metabolismo hepático. Virgili *et al.* (2000) proporcionaram evidências de que o pycnogenol[®] é absorvido,

metabolizado e excretado por humanos, havendo uma relação dose-dependente entre ingestão e excreção, sendo que segundo esses autores e também Silliman *et al.* (2003) a principal via de excreção do pycnogenol® é a urinária.

Schafer *et al.* (2005) e Grimm *et al.* (2006) demonstraram, por meio de amostra sanguínea, a presença de pycnogenol® no plasma humano e relatam que após a absorção todos os princípios ativos biodisponíveis do pycnogenol® podem estar presentes no sangue.

A atividade do pycnogenol® no processo inflamatório tem sido demonstrada tanto *in vitro* quanto *in vivo* em modelos animais (Harborne & Williams, 2000; Cho *et al.*, 2001; Saliou *et al.*, 2001; Rohdewald, 2002; Schafer *et al.*, 2005; e Grimm *et al.*, 2006). Assim, pode-se supor que o pycnogenol® exerceu sua atividade no processo inflamatório somente nos grupos que não foram irradiados, controle e pycnogenol, não exercendo ação sobre o processo em condição patológica causada pela ação da radiação, e, portanto, contrariamente ao que é citado por Packer *et al.* (1999) que afirmam que o pycnogenol® proporciona regulação da resposta inflamatória em condições normais e patológicas. Isso é bem evidenciado quando se observa que o maior retardo no processo de reparação óssea se dá de forma mais acentuada nos períodos iniciais, em que estão ocorrendo os principais eventos inflamatórios.

O pycnogenol® tem sido estudado principalmente quanto a sua atividade antioxidante, sendo também considerado como potente desoxidante de radicais livres (Nelson *et al.*, 1998; Virgili *et al.*, 1998; Packer *et al.*, 1999; Harborne & Williams, 2000; Cho *et al.* 2001; Rohdewald, 2002; Devaraj *et al.*, 2002). Como se sabe, a interação da radiação com a matéria leva à produção de radicais livres, o que seria então responsável pelos danos causados ao tecido. A ação do pycnogenol® sobre esses radicais formados é uma representação de sua ação antioxidante. Por outro lado Horáková *et al.* (2003) e Silliman *et al.* (2003)

demonstraram em seus estudos que o pycnogenol® não exerceu atividade antioxidante *in vitro* e em humanos, respectivamente.

A ação benéfica do pycnogenol® também pode ser comprovada em estudos que avaliaram a sua capacidade de agir como fator protetor contra injúrias causadas por radiação ultravioleta (Saliou *et al.*, 2001 e Sime & Reeve, 2004). Nesses estudos foi demonstrado que o pycnogenol® inibiu a reação inflamatória da derme no local irradiado. Mais uma vez, observa-se que a substância em estudo apresentou atividade antiinflamatória em tecido irradiado, porém não traumatizado cirurgicamente.

Já Shimoï *et al.* (1994) e Shimoï *et al.* (1996) avaliaram o efeito radioprotetor de flavonóides quanto a frequência de reticulócitos micronucleados no sangue de ratos irradiados com radiação gama. Esses autores acreditam que plantas flavonóides que mostram potencial antioxidativo, *in vitro*, funcionam como antioxidantes *in vivo* e seu efeito radioprotetor pode ser atribuído ao seu potencial desoxidante para radicais livres tais como o radical hidroxil. Também Ramos *et al.* (2006) demonstraram a ação radioprotetora do pycnogenol® em mucosa intestinal de ratos irradiados com radiação X, sendo que o pycnogenol® significativamente preservou a camada glandular assim como a altura e número de vilosidades da mucosa intestinal. Estes autores concluíram que o pycnogenol® proporciona significativa proteção ao dano causado pela radiação ionizante na mucosa intestinal.

Diferentemente do demonstrado nos estudos de Shimoï *et al.* (1994), Shimoï *et al.* (1996), Saliou *et al.* (2001), Sime & Reeve (2004) e Ramos *et al.* (2006), os quais demonstraram a ação protetora de flavonóides e pycnogenol® contra diversos tipos de radiações, no presente estudo o pycnogenol®, em 3 doses de 200mg/kg, não apresentou atividade radioprotetora em alvéolos irradiados após a extração dentária para nenhum dos tempos avaliados, ou seja, 4, 7, 14, 21 e 28

dias após a extração dentária. Uma das possíveis justificativas é a diferença na sensibilidade dos tecidos avaliados, uma vez que o tecido ósseo apresenta maior radiorresistência que a pele, a mucosa intestinal e as células sanguíneas, respectivamente, assim como é menor a velocidade da diferenciação celular no tecido ósseo fazendo com que este apresente maior tempo de cicatrização. No entanto, para que se tenha possibilidade de uma avaliação mais concreta da ação do pycnogenol®, principalmente levando-se em consideração que não foram encontradas na literatura pesquisas que avaliassem o efeito desta substância no processo de reparação óssea em tecidos danificados pela ação de altas doses de radiação ionizante, o que torna esta pesquisa pioneira, é fundamental deixar evidente que novas pesquisas, variando-se fatores como dose e tempo de administração da droga deverão ser realizadas.

7 Conclusão

Diante dos resultados obtidos nesta pesquisa e, das condições experimentais utilizadas, pode-se concluir que:

Morfológicamente, pelas análises qualitativa e quantitativa, não se observou a ação radioprotetora do pycnogenol® no processo de reparação alveolar em ratos irradiados.

Referências*

Altobelli DE, Lorente CA, Handren JH Jr, Young J, Donoff RB, May JW Jr. Free and microvascular bone grafting in the irradiated dog mandible. *J Oral Maxillofac Surg.* 1987; 45(1): 27-33.

Amler MH. The time sequence of tissue regeneration in human extraction wounds. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1969; 27(3): 309-18.

Bodner L, Kaffe I, Littner MM, Cohen J. Extraction site healing in rats. A radiologic densitometric study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1993; 75(3): 367-72.

Bruder SP, Fink DJ, Caplan AI. Mesenchymal stem cells in bone development, bone repair, and skeletal regeneration therapy. *J Cell Biochem.* 1994; 56(3): 283-94.

* De acordo com a norma da UNICAMP/FOP, baseadas na norma do International Committee of Medical Journal Editors – Grupo de Vancouver. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o Medline.

Carvalho TL, Bombonato KF, Brentegani LG. Histometric analysis of rat alveolar wound healing. *Braz Dent J*. 1997; 8(1): 9-12.

Cho KJ, Yun CH, Packer L, Chung AS. Inhibition mechanisms of bioflavonoids extracted from the bark of *Pinus maritima* on the expression of proinflammatory cytokines. *Ann N Y Acad Sci*. 2001; 928: 141-56.

Coelho RM, Manzi FR. Estudo do efeito radioprotetor da vitamina E na redução de radiomucosite em pacientes submetidos à radioterapia na região de cabeça e pescoço. *In: Lobato W, Sabino CVS, Abreu JF, organizadores. Destaques Iniciação Científica 2004. Belo Horizonte: Editora PUCMINAS; 2005. p. 65-85.*

Cordeiro RL, Ferreira BA, Raveli DB, Okamoto T. Estudo histomorfológico da cronologia do processo de reparo em feridas de extração dental de ratos expostos à radiação X no corpo todo. *Rev Odontol Univ São Paulo*. 1992; 6(1/2): 13-8.

Dare A, Hachisu R, Yamaguchi A, Yokose S, Yoshiki S, Okano T. Effects of ionizing radiation on proliferation and differentiation of osteoblast-like cells. *J Dent Res*. 1997; 76(2): 658-64.

De Carvalho A, De Castro AL, Dos Santos Pinto MC. Mineralization in the repair process of tooth extraction lesions in rats. Contribution to densitometric study. *Ars Curandi Odontol*. 1980; 7(7): 304-5, 308-12.

Devaraj S, Vega-Lopez S, Kaul N, Schonlau F, Rohdewald P, Jialal I. Supplementation with a pine bark extract rich in polyphenols increases plasma antioxidant capacity and alters the plasma lipoprotein profile. *Lipids*. 2002; 37(10): 931-4.

Devlin H, Hoyland J, Newall JF, Ayad S. Trabecular bone formation in the healing of the rodent molar tooth extraction socket. *J Bone Miner Res*. 1997; 12(12): 2061-7.

Dudziak ME, Saadeh PB, Mehrara BJ, Steinbrech DS, Greenwald JA, Gittes GK *et al*. The effects of ionizing radiation on osteoblast-like cells in vitro. *Plast Reconstr Surg*. 2000; 106(5): 1049-61.

Elsubeihi ES, Heersche JN. Quantitative assessment of post-extraction healing and alveolar ridge remodelling of the mandible in female rats. *Arch Oral Biol*. 2004; 49(5): 401-12.

Frandsen AM. Effects of roentgen irradiation of the jaws on socket healing in young rats. *Acta Odontol Scand*. 1962; 20: 307-33.

Frandsen AM. Experimental investigations of socket healing and periodontal disease in rats. Effects of local roentgen irradiation. Effects of vitamin A deficiency. *Acta Odontol Scand.* 1963; 21 Suppl 37: 7-113.

Grimm T, Chovanova Z, Muchova J, Sumegova K, Liptakova A, Durackova Z *et al.* Inhibition of NF-kappaB activation and MMP-9 secretion by plasma of human volunteers after ingestion of maritime pine bark extract (Pycnogenol). *J Inflamm (Lond).* 2006; 3(1): 1-15.

Guglielmotti MB, Ubios AM, Cabrini RL. Alveolar wound healing after x-irradiation: a histologic, radiographic, and histometric study. *J Oral Maxillofac Surg.* 1986; 44(12): 972-6.

Guyton AC, Hall JE. Hormônio paratireóideo, calcitonina, metabolismo do cálcio e do fósforo, vitamina D, ossos e dentes. *In: Guyton AC & Hall JE. Tratado de Fisiologia Médica.* 10. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2002. p. 841-56.

Harborne JB, Williams CA. Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry.* 2000; 55(6): 481-504.

Horakova L, Licht A, Sandig G, Jakstadt M, Durackova Z, Grune T. Standardized extracts of flavonoids increase the viability of PC12 cells treated with hydrogen peroxide: effects on oxidative injury. *Arch Toxicol.* 2003; 77(1): 22-9. Epub 2002 Oct 16.

Horn Y, Sela MN, Shlomi B, Ulmansky M, Sela J. Effect of irradiation-timing on the initial socket healing in rats. *Int J Oral Surg.* 1979; 8(6): 457-61.

Johansen JR. Repair of the post-extraction alveolus in the Wistar rat. A histologic and autoradiographic study. *Acta Odontol Scand.* 1970; 28(4): 441-61.

Junqueira LC, Carneiro J. Tecido Ósseo. *In: Junqueira LC, Carneiro J. Histologia Básica.* 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1999. p. 111-28.

King DR, Hathaways JW, Reynolds DC. The effect of pulsed, short waves on alveolar healing. *J Dist Columbia Dent Soc.* 1968; 43(1): 15-9.

Kurihashi T, Iwata H, Nasu M, Yosue T. Experimental study on wound healing of alveolar bone sockets in the rat maxilla after X-ray irradiation. *Odontology.* 2002; 90(1): 35-42.

Lorente CA, Song BZ, Donoff RB. Healing of bony defects in the irradiated

- and unirradiated rat mandible. *J Oral Maxillofac Surg.* 1992; 50(12): 1305-9.
- McInnis JC, Robb RA, Kelly PJ. The relationship of bone blood flow, bone tracer deposition, and endosteal new bone formation. *J Lab Clin Med.* 1980; 96(3): 511-22
- Nakase T, Yoshikawa H. Potential roles of bone morphogenetic proteins (BMPs) in skeletal repair and regeneration. *J Bone Miner Metab.* 2006; 24(6): 425-33.
- Nelson AB, Lau BH, Ide N, Rong Y. Pycnogenol inhibits macrophage oxidative burst, lipoprotein oxidation, and hydroxyl radical-induced DNA damage. *Drug Dev Ind Pharm.* 1998; 24(2): 139-44.
- Okamoto T, de Russo MC. Wound healing following tooth extraction. Histochemical study in rats. *Rev Fac Odontol Aracatuba.* 1973; 2(2): 153-69.
- Packer L, Rimbach G, Virgili F. Antioxidant activity and biologic properties of a procyanidin-rich extract from pine (*Pinus maritima*) bark, pycnogenol. *Free Radic Biol Med.* 1999; 27(5-6): 704-24.
- Pinto MCS, Martinelli C, Pinto RS. Ação da radiação X sobre glândulas submandibulares e sublinguais e seus reflexos sobre o processo de reparo em ferida de extração dental: estudo histológico em ratos. *Rev Odontol UNESP.* 1989; 18(1/2): 143-55.
- Ramos FMM, Schonlau F, Novaes PD, Manzi FR, Boscolo FN, de Almeida SM. Pycnogenol((R)) protects against Ionizing radiation as shown in the intestinal mucosa of rats exposed to X-rays. *Phytother Res.* 2006 Jun 2; [Epub ahead of print]
- Raveli DB, Ferreira BA, Cordeiro RCL, Okamoto T, Gabrielli MFR. Influência da radiação X na cronologia do processo de reparo em feridas de extração dental: estudo histomorfológico em ratos. *Rev Odontol Univ São Paulo.* 1990; 4(2): 119-25.
- Raveli DB, Martins JCR, Okamoto T, Chiavini PCR, Carvalho DA. Estudo histomorfológico da cronologia do processo de reparo em feridas de extração dental de ratos expostos à radiação x 24 horas antes do ato cirúrgico. *J Bras Ortodontia Ortop Maxilar.* 1996; 1(5): 35-45.
- Rice-Evans C. Flavonoids and isoflavones: absorption, metabolism, and bioactivity. *Free Radic Biol Med.* 2004; 36(7): 827-8.
- Rohdewald P. A review of the French maritime pine bark extract (Pycnogenol),

a herbal medication with a diverse clinical pharmacology. *Int J Clin Pharmacol Ther.* 2002; 40(4): 158-68.

Saliou C, Rimbach G, Moini H, McLaughlin L, Hosseini S, Lee J *et al.* Solar ultraviolet-induced erythema in human skin and nuclear factor-kappa-B-dependent gene expression in keratinocytes are modulated by a French maritime pine bark extract. *Free Radic Biol Med.* 2001; 30(2): 154-60.

Schafer A, Chovanova Z, Muchova J, Sumegova K, Liptakova A, Durackova Z *et al.* Inhibition of COX-1 and COX-2 activity by plasma of human volunteers after ingestion of French maritime pine bark extract (Pycnogenol). *Biomed Pharmacother.* 2006 Jan;60(1):5-9. Epub 2005 Oct 26.

Sela J, Deutsch D, Bodner L, Bab I, Waschler Z, Muhlrad A. Effect of X-ray irradiation on primary mineralization in rat alveolar bone. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol.* 1982;398(1):11-8.

Shimoi K, Masuda S, Furugori M, Esaki S, Kinae N. Radioprotective effect of antioxidative flavonoids in gamma-ray irradiated mice. *Carcinogenesis.* 1994; 15(11): 2669-72.

Shimoi K, Masuda S, Shen B, Furugori M, Kinae N. Radioprotective effects of antioxidative plant flavonoids in mice. *Mutat Res.* 1996; 350(1): 153-61.

Silliman K, Parry J, Kirk LL, Prior RL. Pycnogenol does not impact the antioxidant or vitamin C status of healthy young adults. *J Am Diet Assoc.* 2003; 103(1): 67-72.

Sime S, Reeve VE. Protection from inflammation, immunosuppression and carcinogenesis induced by UV radiation in mice by topical Pycnogenol. *Photochem Photobiol.* 2004; 79(2): 193-8.

Starcke EN, Shannon IL. How critical is the interval between extractions and irradiation in patients with head and neck malignancy? *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1977; 43(3): 333-7.

Szymczyk KH, Shapiro IM, Adams CS. Ionizing radiation sensitizes bone cells to apoptosis. *Bone.* 2004; 34(1): 148-56.

Valdrighi L, Bozzo L, Vizioli MR. Repair of the post-extraction sockets in marmosets (*Callithrix jacchus*): A histological study. *Acta Anat.* 1974; 90(4): 523-38.

Virgili F, Kim D, Packer L. Procyanidins extracted from pine bark protect alpha-tocopherol in ECV 304 endothelial cells challenged by activated RAW

264.7 macrophages: role of nitric oxide and peroxynitrite. FEBS Lett. 1998; 431(3): 315-8.

Virgili F, Pagana G, Bourne L, Rimbach G, Natella F, Rice-Evans C *et al.* Ferulic acid excretion as a marker of consumption of a French maritime pine (*Pinus maritima*) bark extract. Free Radic Biol Med. 2000; 28(8): 1249-56.

Vizioli MR, Valdrighi L, Bozzo L. The appearing and evolution of reticulin: observations on the repair of post-extraction marmoset sockets. Ann Histochem. 1974; 19(1): 65-72.

Wang J. Spatial orientation of the microscopic elements of cortical repair bone. Clin Orthop Relat Res. 2000; (374): 265-77.

Williams HJ, Davies AM. The effect of X-rays on bone: a pictorial review. Eur Radiol. 2006; 16(3): 619-33. Epub 2005 Oct 20.

Wurzler KK, DeWeese TL, Sebald W, Reddi AH. Radiation-induced impairment of bone healing can be overcome by recombinant human bone morphogenetic protein-2. J Craniofac Surg. 1998; 9(2): 131-7.

Zach L, Cohen G, Scopp I, Kaplan G. Experimental radio-osteonecrosis in Rhesus macaque jaws; therapeutic irradiation dose effect on dental extraction wound healing. Am J Phys Anthropol. 1973; 38(2): 325-30.



Universidade Estadual de Campinas
Instituto de Biologia



CEEA-IB-UNICAMP

Comissão de Ética na Experimentação Animal
CEEA-IB-UNICAMP

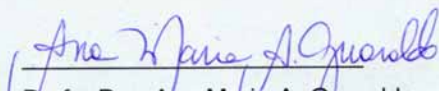
CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 907-1, sobre "EFEITO RADIOPROTETOR DO EXTRATO DA CASCA DA PINHA MARÍTIMA FRANCESA (PYCNOGENOL®) NA REPARAÇÃO ALVEOLAR EM RATOS IRRADIADOS" sob a responsabilidade de Profa. Dra. Solange Maria de Almeida / Roselaine Moreira Coelho está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA)-IB-UNICAMP em reunião de 04 de outubro de 2005.

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº 907-1, entitled "RADIOPROTECTOR EFFECT OF FRENCH MARITIME PINE BARK EXTRACT (PYCNOGENOL®) IN REPARATION OF SOCKET IN IRRADIATED RATS", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - UNICAMP) on October 4, 2005.

Campinas, 04 de outubro de 2005.


Profa. Dra. Ana Maria A. Guaraldo
Presidente - CEEA/IB/UNICAMP


Fátima Alonso
Secretária - CEEA/IB/UNICAMP