



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA**



LETÍCIA RODRIGUES NERY

**EFEITO DA HOMEOPATIA, FITOTERAPIA E VITAMINA E
SOBRE GLÂNDULA PARÓTIDA DE RATOS IRRADIADOS.**

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

Orientador: Prof^o Dr^o Francisco Carlos Groppo

PIRACICABA-SP

2011

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA**
Bibliotecária: Elis Regina Alves dos Santos – CRB-8ª / 8099

N359e Nery, Letícia Rodrigues.
Efeito da homeopatia, fitoterapia e vitamina E sobre glândula parótida de ratos irradiados / Letícia Rodrigues Nery. -- Piracicaba, SP: [s.n.], 2011.

Orientador: Francisco Carlos Groppo.
Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Radiação ionizante. 2. Glândulas salivares. 3. Óleo de copaíba. I. Groppo, Francisco Carlos. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.
(eras/fop)

Título em Inglês: Effect of phytotherapy, homeopathy and vitamin E on the parotid gland in irradiated rats

Palavras-chave em Inglês (Keywords): 1. Radiation, Ionizing. 2. Salivary glands. 3. Copaíba oil

Área de Concentração: Radiologia Odontológica

Titulação: Doutor em Radiologia Odontológica

Banca Examinadora: Francisco Carlos Groppo, Solange Maria de Almeida, Juliana Cama Ramacciato, Rui Barbosa de Brito Júnior, Mário Roberto Vizioli.

Data da Defesa: 25-02-2011

Programa de Pós-Graduação em Radiologia Odontológica



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Odontologia de Piracicaba



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Tese de Doutorado, em sessão pública realizada em 25 de Fevereiro de 2011, considerou a candidata LETICIA RODRIGUES NERY aprovada.

Prof. Dr. FRANCISCO CARLOS GROPPPO

Profa. Dra. SOLANGE MARIA DE ALMEIDA

Profa. Dra. JULIANA CAMA RAMACCIATO

Prof. Dr. RUI BARBOSA DE BRITO JÚNIOR

Prof. Dr. MÁRIO ROBERTO VIZIOLI

*D*EDICATÓRIA

Ao meu marido *Leandro*, que entendeu os momentos de ausência,
pela compreensão, apoio, amor e incentivo durante toda esta trajetória,
por sempre saber usar as melhores palavras nas horas certas, não me
deixando nunca desanimar, e principalmente, por ser a pessoa
maravilhosa que amo, admiro e tenho a sorte de ter ao meu lado.

Te amo mais que tudo!!

*Com muito amor e carinho,
Dedico este trabalho.*

*A*GRADecIMENTOS

Á Deus por conduzir os meus caminhos, pela vida maravilhosa que tenho, pela oportunidade de viver para aprimorar o meu espírito e por todas as bênçãos que me tem concedido.

Aos Professores

Ao meu Orientador Prof. Dr. Francisco Carlos Groppo, exemplo a ser seguido como pessoa e profissional, pela orientação, atenção, dedicação, incentivo, competência e acima de tudo amizade, sem os quais não seria possível a realização deste trabalho. Meu eterno carinho, respeito, admiração e gratidão.

À Profa Dra Solange Maria de Almeida, foi um grande prazer ser sua orientada até quase o fim. Além de ser competente, sempre se mostrou amiga. Agradeço ainda pela sua confiança durante todo o curso para a realização de qualquer trabalho.

Ao Prof. Dr. Francisco Haiter Neto, pelo apoio, atenção e que, apesar do seu cotidiano cheio de afazeres, sempre mostrou disposição em tirar as nossas dúvidas e orientar novos trabalhos.

Ao Prof. Dr. Frab Norberto Bóscolo, pelo carinho dispensado aos seus alunos, pelos conselhos, pela preocupação com o nosso bem estar e por sempre nos ter disponibilizado tudo para a realização de uma nova pesquisa.

Ao Prof. Dr. Mário Roberto Vizioli, pela atenção, preocupação e carinho durante a minha estada em Piracicaba. Um grande professor e orientador que sempre esteve disposto a esclarecer minhas dúvidas.

Aos Professores Pedro Duarte Novaes e Sérgio Roberto Peres Line, que sempre manteve as portas da disciplina de Histologia abertas para a realização de nossos trabalhos na linha de radiobiologia. Apesar de bastante atarefados, sempre se mostraram solícitos e disponibilizavam um tempinho para o nosso trabalho.

À Faculdade de Odontologia de Piracicaba, por ter me acolhido e oferecido a oportunidade de conhecer e conviver com profissionais renomados nas suas áreas.

Aos meus colegas de curso da Radiologia, **Ellen, Maria, Daniela Brait, Daniele Frota, Luciana, Carol, Matheus, Daniela Pita, Aline, Ésio, Luiz, Anne, Saulo, Manu, Fred, Amanda, Débora, Carla, Monikelly, Maria Beatriz,**

Isabela, Laura, Luana e Gabriella, obrigada pela companhia, carinho apoio e bem-querer incondicionais.

Aos Funcionários da Radiologia **Waldeck, Fernando e Giselda**, por nos atenderem em tudo durante o curso com muita competência. À **Roberta e a Luciane**, pela ajuda e apoio em todos os momentos.

Aos Funcionários da Farmacologia **Eliana, Elisa e José Carlos**, pela dedicação no trabalho, paciência e compreensão.

Aos funcionários do Biotério, **Sr. Fábio e Sr. Vanderley** no auxílio da limpeza e contenção dos animais, sendo de fundamental importância para a realização desta pesquisa.

A todos da Histologia, meu muito obrigada, por um favor qualquer que fez diferença e em especial à **Cidinha, Eliene e Ivani**, pessoas de fundamental importância para o andamento desta pesquisa.

Aos meus alunos da graduação e companheiros de tese **Camila, Karine e Hugo**, pela amizade e tranquilidade durante todas as fases do experimento.

A todos os amigos, pela amizade, pelos momentos de descontração e por tudo que me proporcionam, apesar da distância e da correria do dia a dia, se fazem sempre presentes...

Aos meus familiares

Aos meus pais **Antonio e Cecília**, pelo exemplo de vida e pelo apoio incondicional a mim dedicado. Por estarem sempre presentes, mesmo que só em mente e coração.

Á **Daniele**, mais que uma amiga, pelo apoio e amizade, compartilhando todos os momentos da minha vida e torcendo para que tudo dê certo.

Aos meus irmãos **Bruno, Caio e Beatriz**, que aprenderam a me acompanhar sempre de longe, torcendo para que eu alcançasse sempre meus objetivos.

Aos meus avós **Dr. Moreno, D. Rosa e D. Lazineira** por sempre estarem de braços abertos esperando a minha visita. Aos meus **Tios e Primos**, pela força e pela torcida na realização de todos os meus sonhos. Aos meus sogros, **Oswaldo e Zulmira**, meus cunhados, **Daniela, Jossimara, Leonardo e Marcelo** por

ficarem tão próximos, e a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização desse trabalho.

Muito Obrigada a todos por participarem desta etapa tão importante da minha vida!

*Tudo o que um sonho precisa para ser
realizado é alguém que acredite que
ele possa ser realizado.*

Roberto Shinyashiki

O objetivo desta pesquisa foi verificar o efeito radioprotetor de uma formulação homeopática feita à base de radiação X e outra fitoterápica, à base de óleo de copaíba, comparando-as com a vitamina E. Foram observados os efeitos destas substâncias sobre a função salivar e a morfologia da glândula parótida, em ratos irradiados com radiação X. Para tanto, foram utilizados 200 ratos divididos nos seguintes grupos (n=5): G1 que recebeu NaCl 0,9% (controle - *sham*) e não foi irradiado; G2 – recebeu NaCl 0,9% + irradiação; G3 – recebeu suspensão de acetato de dl-alfa-tocoferol (vitamina E) 40mg/kg/vo/dia; G4 – recebeu vitamina E na mesma dosagem do G3 + irradiação; G5 – recebeu a homeopatia de radiação X dinamizada a 15 CH 1mL/kg/vo/dia; G6 – recebeu a mesma homeopatia + irradiação; G7 – recebeu óleo de copaíba 2g/kg/vo/dia e G8 – recebeu óleo de copaíba na mesma dosagem + irradiação. Todos os tratamentos foram mantidos por sete dias. Ao final deste período, os animais foram anestesiados, posicionados no acelerador linear e, com exceção dos grupos 1, 3, 5 e 7, receberam 15Gy de radiação X. Os tratamentos foram mantidos por mais sete dias após a irradiação. Após 12 horas, 3, 10, 17 e 24 dias da irradiação, os animais foram submetidos à anestesia, a secreção salivar foi estimulada com pilocarpina e a saliva coletada por 30 minutos. Imediatamente após a coleta da saliva, os animais foram sacrificados por aprofundamento da anestesia e as glândulas salivares, cuidadosamente dissecadas. As glândulas salivares foram submetidas à inclusão em parafina. Após processamento, foram feitos cortes (6 μ m) e submetidos à coloração HE. Foram obtidas fotomicrografias para avaliação das glândulas parótidas. A análise histomorfológica das glândulas mostrou um aumento da desorganização estrutural com o passar dos tempos nos animais irradiados, independente do tratamento utilizado, enquanto que as glândulas dos animais não irradiados mantiveram-se

íntegras. Foi possível observar que, de uma maneira geral, os tratamentos não afetaram a produção salivar tanto nos animais irradiados quanto nos não irradiados. Além disso, foi possível observar que após 10 dias da irradiação houve recuperação significativa da produção salivar, independentemente dos tratamentos utilizados e a lag phase não foi afetada pelos tratamentos, nem pela irradiação. Pode-se concluir que quantitativamente a formulação homeopática feita à base de radiação X, a formulação fitoterápica feita à base de óleo de copaíba e a vitamina E não se comportaram como um radioprotetor nas glândulas parótidas e na sua função.

Palavras-chave: radiação ionizante, glândula salivar, óleo de copaíba, formulação homeopática e vitamina E.

The aim of the present study was to observe the radioprotective effect of a homeopathic formulation (X rays) and a phytotherapeutic formulation based on copaiba oil, comparing both with E vitamin. The effect of these formulations over the salivary function and the morphology of parotid gland were observed in rats irradiated with X radiation. One hundred-sixty rats were divided into the following groups (n=5): G1 – received 0.9% NaCl (Control – sham) and it was not irradiated; G2 – received 0.9% NaCl and it was irradiated; G3 – received 40mg/kg/vo/dia dl-alpha-tocopherol (E vitamin) suspension; G4 – received the same E vitamin dose and it was irradiated; G5 – received a 15 CH dynamized homeopathic formulation of X rays 1mL/kg/vo/dia; G6 – received the same formulation and it was irradiated; G7 – received a formulation of 2g/kg/vo/dia copaiba oil and G8 – received the same formulation and it was irradiated. All treatments were kept during seven days. After this period, all animals were anesthetized, positioned in a linear accelerator and, except for groups 1, 3, 5 and 7, groups received 15 Gy of X radiation. The treatments were kept more seven days after irradiation. After 12 hours, 3, 10, 17 and 24 days from irradiation, all animals were submitted to general anesthesia; the salivary secretion was stimulated with pilocarpine and then collected during 30 minutes. Right after the saliva collection, the animals were killed by the same anesthesia and the salivary glands were carefully dissected and submitted to routine histological techniques. Six micrometers slices were stained with HE technique and photomicrographies were obtained from parotid glands. The histomorphological analysis showed an increased structural disorganization along time in the irradiated animals, independently of the treatments, while the glands of the non-irradiated animals remained sound. It was possible to observe, generally, that the treatments did not

affect the saliva production in both irradiated and non-irradiated animals. Besides, after 10 days from the irradiation, a significant recovering on saliva production was verified independently of the treatments. The lag phase was not affect by the treatments or by the irradiation. We concluded that the treatments did not act as radioprotective agents in the parotid gland.

Key words: Ionizing radiation, salivary glands, copaiba oil, homeopathic formulation and vitamin E.

1.	INTRODUÇÃO	1
2.	REVISÃO DE LITERATURA	5
2.1-	Efeito da radiação ionizante sobre as glândulas salivares	5
2.2-	Radioproteção das glândulas salivares	19
2.3-	O óleo de copaíba	30
2.4-	O medicamento homeopático	33
3.	PROPOSIÇÃO	36
4.	MATERIAIS E MÉTODOS	37
4.1-	Animais	37
4.2-	Fármacos	38
4.3-	Grupos experimentais	38
4.4-	Irradiação	39
4.5-	Sialometria	40
4.6-	Sacrifício dos animais	40
4.7-	Procedimentos histológicos	41
4.7.1-	Processamento do material para microscopia de luz	41
4.8-	Forma de análise dos resultados	42
4.8.1-	Análise quantitativa da glândula parótida – Escore	42
4.8.2-	Análise quantitativa da glândula parótida – Intensidade de pixel	45
5.	RESULTADOS	46
5.1-	Análise da função salivar (Sialometria)	46

5.2-Análise qualitativa/quantitativa das glândulas parótidas	49
5.2.1-Análise histomorfológica das glândulas	49
5.2.2-Análise quantitativa das glândulas – Escore	54
5.2.3- Análise quantitativa das glândulas – Intensidade de pixel	57
 6. DISCUSSÃO	 61
 7. CONCLUSÃO	 69
 REFERÊNCIAS	 70
 ANEXOS	 79

1-Introdução

O tratamento de tumores da região de cabeça e pescoço por meio da radioterapia causa uma série de efeitos adversos, em decorrência da irradiação de estruturas adjacentes a esta região, tais como as glândulas salivares. Complicações como a xerostomia, mucosites, osteorradionecrose, perda do paladar, disfagia e cáries dentais, são alguns dos efeitos colaterais decorrentes das alterações na estrutura e função das glândulas salivares, os quais são causados, na maioria das vezes, pela diminuição do fluxo salivar (Coppes *et al.*, 2002).

Os efeitos agudos decorrentes da irradiação consistem em alterações histológicas como desorganização das células serosas, necroses, perda focal das células acinares e inflamações agudas que são observadas durante as primeiras 24 horas em humanos. Além disto, as alterações funcionais também tem sido alvo de

diversos estudos, como o de Nagler *et al.* em 1993, que avaliaram funcionalmente as glândulas parótida e submandibulares durante as primeiras 24 horas após a irradiação com dose única de 15 Gy de radiação X na região de cabeça e pescoço de ratos.

A patogênese do dano às glândulas salivares maiores após os efeitos cumulativos da radioterapia, segundo Nagler (2002), envolve desde uma injúria celular até um dano subletal ao DNA, que se manifesta e se torna letal em uma fase tardia. Dessa maneira, no momento em que as células acinares progenitoras seguem para fase reprodutiva e para o restabelecimento do parênquima, elas degeneram. Os agentes envolvidos neste processo de morte celular tardia são os radicais livres na presença de íons celulares como o ferro e o cobre.

O desenvolvimento de radioprotetores efetivos e fármacos utilizados para recuperação após irradiação têm grande importância, devido sua potencial aplicação em exposição à irradiação planejada, como a radioterapia, por exemplo, ou naquela não planejada como na indústria nuclear (Arora *et al.*, 2005).

Numerosos fármacos sintéticos e de origem natural, tais como antioxidantes (Kumar *et al.*, 2002), imunomoduladores (Furuse *et al.*, 1997; Guenechea *et al.*, 1997; Landauer *et al.*, 1997), compostos sulfidrílicos (Ramnath *et al.*, 1997; Weiss, 1997), lipopolissacarídeos e prostaglandinas (Van Buul *et al.*, 1999; Riehl *et al.*, 2000), vitaminas A, C e E (Haranpanhalli *et al.*, 1994) entre outros, têm sido testados em modelos *in vitro*, *in vivo* e em ensaios com humanos para minimizar injúrias causadas pela exposição à radiação ionizante em doses subletais e sobreletais (Arora *et al.*, 2005).

Entre os radioprotetores moleculares, o WR-2721 [S-2-(3-aminopropil-

amino) ácido etil-fosforotioico], também conhecido como amifostina, ethiophos (EUA) ou gammaphos (antiga URSS), é a droga radioprotetora mais profundamente estudada, sendo inicialmente desenvolvida no Instituto de Pesquisas Walter Reed Army, nos EUA, sob os auspícios do programa de desenvolvimento de drogas antirradiação do exército americano. Entretanto, os efeitos radioprotetores dos compostos fosforotioatos, incluindo a amifostina, são de curta ação e associados com efeitos adversos graves, tais como náusea, vômitos, diarreia, hipotensão, hipocalemia, nefro e neuro-toxicidade, em doses clinicamente efetivas. Estas limitações têm restringido grandemente o uso clínico destes fármacos. Apesar destes problemas, a amifostina (Ethyol®) é o único radioprotetor aprovado pela FDA (Arora *et al.*, 2005).

A eficácia do tratamento homeopático (beladona CH7 e RX CH15) nas reações da pele durante a radioterapia de câncer de mama (radiodermatite aguda) foi estudada por Balzarini *et al.* (2000). Este estudo duplo cego ao acaso, envolvendo 66 pacientes que foram operadas de câncer de mama e submetidas à radioterapia, mostrou que houve uma tendência de melhora com a homeopatia, embora não estatisticamente significativa, em relação ao placebo.

O óleo-resina de copaíba já demonstrou várias ações farmacológicas, tais como atividade antinoceptiva (Gomes *et al.*, 2007), protetor e regulador do trato gastrointestinal e anti-ulcerogênico (Paiva *et al.*, 2004), anti-inflamatório (Lima *et al.*, 2003), estimulador da cicatrização (Paiva, *et al.* 2002) e antioxidante (Paiva *et al.*, 2004), razão pelo qual foi escolhido para ser avaliado.

Até o presente momento, não foi relatado um único agente que preencha todos os requisitos para um radioprotetor ideal, isto é, que produza toxicidade não cumulativa ou reversível, ofereça proteção por longo período, tenha um prazo de validade de 2 a 5 anos e possa ser facilmente administrado (Coleman

et al., 2003). Em vista disso, continua a procura por agentes radioprotetores novos, menos tóxicos e mais eficazes.

Sendo assim o presente estudo teve como finalidade, testar e comparar com a Vitamina E (considerada como substância radioprotetora), um medicamento homeopático, feito a partir da própria radiação ionizante, e um extrato à base do óleo de copaíba.

2-Revisão de Literatura

2.1-Efeito da Radiação Ionizante sobre as Glândulas Salivares

Existem numerosas glândulas no rato albino (*Rattus norvegicus albinus*) da linhagem Wistar – frequentemente usado como modelo experimental – que excretam saliva para a cavidade oral (Thompson, 1933). Estudos comparativos entre as glândulas salivares do homem e deste tipo de animal indicaram semelhanças sob o ponto de vista histológico, fisiológico e sobre o tipo de ação e secreção enzimática (Cheyne, 1939).

A glândula parótida no rato é uma glândula de secreção exócrina composta por células serosas (Wescott & Shannon, 1974), à semelhança do que acontece no humano.

A terapêutica por irradiação para os tumores de cabeça e pescoço comumente resulta em diminuição do fluxo salivar e desconforto para os pacientes devido aos danos às glândulas salivares (Franzen *et al.*, 1992). De acordo com Nagler, Baum & Fox (1993b) o dano radio-induzido às glândulas salivares tem sido reconhecido há mais de 80 anos. No entanto, o mecanismo responsável pela destruição do parênquima glandular ainda está desconhecido.

A secreção salivar é essencial para manutenção da saúde bucal, uma vez que a xerostomia acarreta uma série de efeitos colaterais secundários, levando a uma diminuição na proteção dos tecidos bucais contra injúrias, alterando a microbiota oral, aumentando o índice de cáries e a incidência de candidíase, além de dificultar a fala, mastigação e deglutição, diminuindo a qualidade de vida dos pacientes (Nagler, 2002; Takagi *et al.*, 2003).

De acordo com O`Connell (1999), a xerostomia se desenvolve na primeira semana da radioterapia, é progressiva e seus efeitos são devastadores. O mecanismo exato de injúria aos tecidos ainda é incerto, mas estudos experimentais em animais vêm sendo realizados para prevenir ou aliviar a hipofunção salivar decorrente da irradiação.

A função salivar pode ser preservada pela redução da dose de radiação às glândulas, pelo uso de agentes radioprotetores ou através da Terapia com Intensidade Modulada de Radiação (IMRT). A IMRT é uma nova modalidade de tratamento radioterápico que permite apenas a irradiação das células tumorais, protegendo as células e tecidos circunjacentes através do mecanismo de deslizamento de lâminas de chumbo (Amosson *et al.*, 2002; Chao, 2002).

Os efeitos agudos provocados pela radiação consistem em alterações histológicas como desorganização das células serosas, necroses, perda focal das células acinares e inflamações agudas que são observadas durante as primeiras 24 horas em humanos. Além disto, as alterações funcionais também tem sido alvo de estudos, como o de Nagler *et al.* (1993a), que avaliaram funcionalmente as glândulas parótida e submandibulares durante as primeiras 24 horas após a radiação única de 15 Gy de radiação X na região de cabeça e pescoço de ratos. O fluxo salivar das glândulas parótida e submandibular foi medido nos tempos de 0.5, 1, 4 e 24 horas após a irradiação, sendo observado que não houve alterações significantes no fluxo salivar em nenhum dos tempos na glândula submandibular, enquanto que na glândula parótida nos tempos de 0,5 a 4 horas, foi verificada a redução de aproximadamente 42% até às 4 horas. Em relação ao peso glandular, os autores observaram que após 1 hora já havia diferença entre o grupo irradiado e o controle, sendo que, após 24 horas, a diferença de peso foi aproximadamente 23% menor para o grupo irradiado. Não houve diferença na concentração de proteínas na composição da saliva, porém o nível de sódio no grupo irradiado foi significativamente menor que o controle até às 24 horas.

A radiação ionizante determina alterações estruturais significativas nas células acinares, refletindo conseqüentemente em alterações na fisiologia normal destas glândulas. Anderson *et al.* (1981) avaliaram a patofisiologia da glândula parótida de pacientes com câncer que foram submetidos a tratamento por radioterapia. Foram avaliados cinco pacientes com câncer na região de cabeça e pescoço, submetidos à radiação mista de raios gama e nêutrons, sendo colhidas amostras de saliva da glândula parótida antes do tratamento até a sua completa ausência. Verificaram que a radiação reduziu consideravelmente o fluxo salivar, como conseqüência da destruição das células acinares. As proteínas estudadas não apresentaram alteração, não sendo verificada, também, alteração na concentração

da amilase. Entretanto, as concentrações de sódio e cloreto apresentaram um aumento significativo na fase inicial do tratamento, porém com a progressão do tratamento a concentração destas substâncias foi reduzida.

Ainda em 1981, Mossman *et al.*, estudaram o efeito da radioterapia no fluxo salivar, na concentração de proteínas e na atividade da amilase salivar na glândula parótida de humanos submetidos à radioterapia com radiação gama por Co⁶⁰. A avaliação foi realizada antes da radioterapia e em intervalos semanais. Os pacientes foram divididos em três grupos: irradiado, incluindo no campo de tratamento as glândulas parótidas (A); irradiado sem englobar a região da parótida (B) e o grupo controle não irradiado (C). Foi possível observar que antes do tratamento todos os parâmetros avaliados encontravam-se similares aos do grupo controle normais. No grupo A, houve diminuição significativa no fluxo salivar e na taxa de proteína total na 1ª semana de tratamento. Para o grupo B a taxa de fluxo salivar, proteína total e atividade de amilase foram similares aos do grupo C antes e após 3 semanas de tratamento. Os autores sugeriram que as proteínas salivares da parótida não são igualmente afetadas pelo tratamento radioterápico.

A composição e taxa de secreção de amostras de saliva produzidas por glândulas parótidas, submandibulares e sublinguais de ratos irradiados foram objetos de estudo de Vissink *et al.*, em 1990. Os animais foram expostos a doses únicas de raios X, variando de 5 a 20 Gy, e sua salivação foi estimulada pela administração de pilocarpina antes e de 1 a 30 dias após a irradiação. As concentrações de sódio, potássio, fosfato e amilase foram medidas, assim como o fluxo salivar e a fase lag (período entre a injeção de pilocarpina e o começo da produção de secreção). Doses maiores provocaram redução do fluxo salivar e da concentração de íons sódio, ao passo que as concentrações de íons potássio e cálcio não mostraram relação direta com a dose absorvida. As alterações na fase

lag e quantidade de amilase foram máximas no 3º e 10º dias, respectivamente, após a irradiação. Mudanças irreversíveis em relação ao fluxo salivar, à fase lag e às concentrações de potássio e sódio foram causadas por doses iguais ou superiores a 10 Gy, sendo que a expressão máxima destas alterações ocorreu a partir de 15 Gy. Os autores concluíram que as três glândulas salivares maiores demonstraram grande sensibilidade aos efeitos deletérios da radiação, não diferindo significativamente em relação às alterações funcionais.

A função da glândula parótida de pacientes que se submeteram à radioterapia na região de cabeça e pescoço foram avaliadas por Franzen *et al.* (1992). Os grupos foram divididos de acordo com a dose recebida, sendo que o primeiro recebeu menos que 46 Gy, o segundo entre 47-52 Gy e o terceiro com dose total de 65 Gy ou mais. As amostras de saliva foram colhidas antes e semanalmente durante o tratamento radioterápico. Inicialmente, já na primeira semana de tratamento, uma diminuição evidente na taxa de secreção salivar foi observada nos três grupos. As alterações encontradas ao final da radioterapia no 1º grupo foram continuamente melhoradas durante o acompanhamento de 18 meses. No 2º grupo a taxa de secreção salivar média foi de 21% e 25% em relação ao valor inicial, respectivamente aos 6 e 12 meses após o final do tratamento. Doses a partir de 65 Gy causaram depressão irreversível na função de uma vasta maioria de glândulas irradiadas.

Nagler *et al.* (1993b) avaliaram os efeitos de diferentes doses de radiação nas glândulas salivares maiores de ratos. Foram medidos os pesos glandulares, peso corpóreo e saída de fluxo salivar no 3º e 40º dia após a irradiação com exposição aguda única de 2.5, 5, 7.5, 10 e 15 Gy de radiação. Houve uma redução tanto no peso das glândulas parótida e submandibular, quanto no peso corporal dos animais nos dois tempos avaliados, que se

comportaram de maneira dose dependente. Foi observada também uma redução dose dependente na função da parótida 3 dias após a irradiação, sendo esta significativa somente com a dose de 15 Gy, em que o fluxo salivar foi reduzido em 69%. Na glândula submandibular, entretanto, não foi observada redução. No 40º dia, a redução no fluxo salivar estava presente em ambas às glândulas. Com uma dose de 15 Gy, o fluxo salivar da parótida foi reduzido em 56% quando comparado com o grupo controle. A redução máxima na função da submandibular foi encontrada com uma dose de 10 Gy, havendo diminuição de 56% quando comparada com o grupo controle.

Ainda em 1993, Valdez *et al.* avaliaram os efeitos da radiação e a composição química da saliva nas glândulas salivares maiores em 50 pacientes com xerostomia radioinduzida após dose média de 60Gy, comparando com pacientes sem sintomas do grupo controle. A análise química incluiu proteína total, lisozima, lactoferrina, sódio, cloro e potássio. A medida do fluxo salivar foi significativamente reduzida nos pacientes quando comparados com o controle. A concentração de proteína total não diferiu significativamente entre os grupos, irradiado e controle; a concentração de sódio estava aumentada, porém não significativamente; o conteúdo de cloro estava significativamente elevado na parótida e na submandibular/sublingual; na concentração de potássio não houve diferença entre os grupos.

Leslie e Dische (1994) observaram, em um estudo realizado com 47 pacientes, que estavam sendo tratados com radioterapia radical, onde as glândulas parótidas apresentam maior sensibilidade à radioterapia quando comparada com outras glândulas salivares e que a redução no fluxo salivar é dependente tanto da dose quanto da proporção da glândula incluída na direção do campo de radiação.

Nagler *et al.*, em 1996, compararam os efeitos da restrição da ingestão de água e ração na função salivar das glândulas parótida e submandibular/sublingual de ratos com os efeitos da exposição a uma dose única de 15 Gy de radiação X. O peso corpóreo e o fluxo salivar estimulado foram medidos 4, 8, 11 e 14 dias após a irradiação. Os animais foram divididos em três grupos: controle, irradiado e não irradiado, cuja alimentação era semelhante àquela dos animais do grupo irradiado. Foi observado que o peso dos animais irradiados, bem como dos animais não irradiados, cuja alimentação era restrita, foi significativamente menor que o peso dos animais do grupo controle. O grupo controle apresentou ganho contínuo de peso nos dias do experimento. Os ratos irradiados e não irradiados com alimentação restrita mostraram uma redução significativa do fluxo estimulado da parótida quando comparado com o grupo controle no 4º, 8º e 11º dia. No 14º dia foi observado um aumento na função salivar e este não diferiu significativamente do grupo controle. Em geral, a função salivar da glândula submandibular/sublingual não foi significativamente afetada nos grupos avaliados, apenas o fluxo total do grupo irradiado no 11º dia foi significativamente menor do que no grupo controle. Os resultados desse trabalho sugerem que os efeitos precoces nas glândulas salivares são em parte resultantes da capacidade limitada de ingestão após a irradiação.

O mecanismo que ocasiona a hipofunção das glândulas salivares em decorrência da irradiação ainda não é bem esclarecido (Nagler *et al.*, 1997a). Em decorrência disto, estes autores avaliaram os danos ocasionados pela radiação com o mecanismo de oxi-redução do cobre e do ferro, avaliando também a função radioprotetora de estimulantes salivar. Foram utilizados ratos irradiados (15 Gy) na região de cabeça e pescoço, nos quais foram administrados 90 minutos antes, solução salina contendo pilocarpina e/ou ciclocitidina. Após dois meses a função das glândulas submandibular e parótida foram avaliadas, sendo também realizada

uma avaliação ultraestrutural do tecido glandular, além de uma avaliação da quantidade de ferro e cobre através da espectrofotometria por absorção atômica. Como resultados, observou-se que a radiação ionizante provocou uma marcante perda de função das glândulas salivares, sendo que o tratamento com a ciclocitidina apresentou um efeito radioprotetor somente na glândula parótida, enquanto que a pilocarpina não apresentou efeitos protetores significante em nenhuma das glândulas. Na composição da saliva, verificou-se que na glândula parótida observou-se uma grande quantidade de ferro e cobre, enquanto que na saliva da glândula submandibular não foi detectado nenhum metal. Observou-se também que a saliva da glândula parótida após estimulação com pilocarpina apresenta um alto nível de metal com oxi-redução, ao contrário da saliva da glândula submandibular, levando a concluir que a radioproteção exercida na glândula parótida da oxi-redução pelo cobre e pelo ferro, parece ser em decorrência da secreção destes metais para fora da célula na saliva da glândula parótida, provocando uma degranulação.

Coopes *et al.* (1997) revisaram o conceito da degranulação dos ácinos avaliando a função das glândulas salivares após 1, 3, 6, 10 e 30 dias pós-irradiação. Os animais foram tratados previamente com fármacos sialogogos isolados ou em associação antes da irradiação local com dose única de 15 Gy de radiação X. A irradiação resultou num maior atraso para o início da salivação e diminuição do fluxo salivar tanto na parótida quanto na submandibular e sublingual. Os grupos irradiados e tratados previamente com isoproterenol e metacolina associada à fenilefrina e apenas com fenilefrina apresentaram uma menor redução do fluxo salivar na glândula parótida, respectivamente em tempos precoces e tardios, quando comparado com o grupo apenas irradiado. Os autores puderam concluir que o tratamento com fenilefrina e em maior extensão metacolina mais fenilefrina, previamente à irradiação, protegeu ambas as

glândulas parótida e submandibular do dano tardio radio-induzido, porém tal efeito não estava atribuído à prévia degranulação das células secretoras, e sim devido à ativação de mensageiros relacionados aos receptores destas drogas.

Nagler *et al.* (1998a) avaliaram a taxa de fluxo salivar individual da parótida e submandibular aos 3, 6, 9 e 12 meses após doses únicas de radiação 2.5, 5, 7.5, 10 e 15 Gy de radiação X. Aos três meses houve uma redução significativa no fluxo salivar da parótida para doses iguais ou acima de 5 Gy. No período compreendido entre 6 e 9 meses também houve alteração, porém aos 12 meses todos os grupos mostraram reduções significativas na salivagem da glândula parótida, incluindo uma redução média aproximada de 40% com uma dose única de 2.5 Gy, enquanto que para o grupo de 10 Gy esta média de redução foi de 80%. Para a submandibular o padrão dos efeitos da radiação foi similar, sendo que aos 12 meses a redução em média da taxa de fluxo variou de aproximadamente 40% para as doses de 2.5 Gy a 75% para as doses de 10Gy. Foi demonstrado claramente que quando avaliadas tardiamente (3-12 meses) ambas as glândulas salivares maiores apresentaram dano funcional e estrutural dose-dependente similar.

Em 2001, Nagler, estudou os efeitos prolongados da irradiação de cabeça e pescoço em ratos, durante um ano. Para isto os animais foram irradiados com uma dose única de 2.5, 5, 7.5, 10 e 15 Gy de radiação X, sendo realizada avaliação histopatológica e investigação dos órgãos aos 2, 6 e 9 meses pós-irradiação. Os resultados nos três primeiros meses demonstraram uma redução dose-dependente no ganho de peso corporal nos animais, acompanhada por mucosite oral, dermatites na pele, úlceras na língua, definhamento e morte de 40% dos animais irradiados com 15 Gy. Após esta fase inicial houve recuperação dos animais. A atrofia tanto na glândula parótida quanto na submandibular foi

encontrada seis meses após a irradiação. O autor concluiu que o efeito da radiação é dose-dependente e é manifestado por uma deterioração crônica e prolongada, eventualmente resultando na morte do animal.

Em 1970, Phillips submeteu 31 ratos a uma dose única de 21 Gy de radiação X e os sacrificou após 5 minutos e 1, 2, 4, 8, 16 e 42 dias depois de sua irradiação, para avaliar as mudanças funcionais e estruturais nas glândulas parótidas. Uma redução no tamanho das células acinares (atrofia), sua necrose e a presença de alterações nucleares foram observadas já no 1º dia após os animais terem sido irradiados, tendo atingido sua expressão máxima no 4º dia após a irradiação. No 8º e 16º dias, muitas células acinares readquiriram seu tamanho normal e outras se tornaram hipertrofiadas, embora as degenerações nucleares continuassem presentes. Após o 42º dia, no entanto, as células acinares tornaram-se novamente atroficas e seus contornos ficaram tão mal delimitados que causavam a impressão de que somente os núcleos, os quais continuavam apresentando alterações degenerativas, haviam permanecido. O autor concluiu que as alterações morfológicas sofridas por glândulas salivares irradiadas poderiam ser divididas em três fases: uma fase aguda de atrofia e necrose (1º ao 7º dia), seguida por uma fase de reparação (8º ao 16º dia) e finalizada por uma nova fase de atrofia (após o 16º dia), contudo com danos menos severos que os encontrados na primeira fase.

Para explicar a maior radiosensibilidade da glândula parótida, Abok *et al.* (1984) estudou o dano radioinduzido às células secretoras das glândulas submandibulares de ratos submetidos a uma dose de 50 Gy de irradiação X na região de cabeça e pescoço e concluiu que metais pesados como o zinco, manganês e ferro são encontrados dentro dos componentes granulares de secreção das células serosas, estes promovem a indução da peroxidação lipídica

sendo liberados no interior do citoplasma, potencializando o dano e a consequente autólise e morte celular.

Stephens *et al.*, em 1986, afirmaram que ao contrário das alterações crônicas, a histomorfologia das alterações agudas apresentadas por glândulas salivares irradiadas não era bem conhecida. Por conseguinte, decidiram avaliar biópsias de glândulas parótidas de 18 macacos *rhesus* adultos, submetidos a doses únicas de radiação gama que variaram de 2,5 a 15 Gy, visando determinar suas alterações iniciais. Nas primeiras 6 horas após os animais terem sido expostos, os autores verificaram perda de contato entre os ácinos, presença de intenso exsudado inflamatório neutrofílico e o deslocamento dos núcleos da região apical para o centro das células. A presença de necrose nuclear (picnose, cariólise e cariorrexe) e de vacúolos nas células serosas foi observada nos tempos 12 e 24 horas, ao passo que a necrose do epitélio dos ductos pôde ser constatada 24 e 48 horas após os animais terem sido irradiados com doses de 10, 12.5 e 15 Gy. A expressão máxima das alterações radioinduzidas ocorreu no tempo 24 horas. Os autores concluíram que apesar de as células acinares e ductais das glândulas parótidas serem bem diferenciadas, podem expressar danos letais poucas horas após sua irradiação.

Os mesmos autores, em 1989, realizaram uma revisão da literatura a respeito da patogênese das injúrias causadas pela radiação às glândulas salivares. Relataram que as células serosas apresentam grande radiosensibilidade e que a morte destas células é decorrente da peroxidação lipídica de suas membranas. Mencionaram também, que as figuras de necrose nuclear presentes em células irradiadas, como picnose, cariólise e cariorrexe, são características de morte celular por apoptose.

Ainda no ano de 1989, Roslindo *et al.*, realizaram um estudo histomorfológico da glândula parótida de ratos submetidos à radiação ionizante. Para isto foram utilizados ratos, com 25 dias de idade, que foram submetidos à cirurgia prévia para a exposição das glândulas salivares, onde receberam 300 R (3Gy), em um intervalo de tempo de 48 horas, totalizando uma exposição de 1200 R (12Gy). Decorridos o período de 3, 8, 13, 18 e 28 dias, os animais foram pesados e sacrificados para a remoção das glândulas parótidas onde se realizou as lâminas para a microscopia de luz. Como resultado verificou-se que os animais irradiados perderam peso corpóreo desde o primeiro grupo de sacrifício, vindo a ganhar peso corporal a partir do 13 dias de sacrifício, não sendo equivalente aos grupos controles. Na análise histomorfológica, verificaram que a fase crítica de desorganização celular correspondeu ao período de 08 dias, decrescendo progressivamente nos seguintes, sendo os ácinos serosos e os ductos estriados as estruturas com maior radiosensibilidade.

Peter *et al.* (1994) realizaram um estudo morfológico das células acinares das glândulas salivares dos ratos em relação à radiosensibilidade. Foi utilizado uma dose única com intensidade de 15 Gy de radiação X com a finalidade de provocar mudanças morfológicas nas glândulas parótidas e submandibulares. Essas alterações foram observadas desde o primeiro dia, com a presença de degranulação das células serosas e a indução de aberrações nucleares nas células mucosas e serosas, sendo que a reconstituição da integridade do tecido foi observada somente após o 6º dia.

A avaliação da proliferação celular em glândulas parótidas e submandibulares após a exposição à radiação foi verificada por Peter *et al.* (1994b). Para isto foram utilizados ratos que foram expostos a uma dose única de 15 Gy de radiação X, somente na região das glândulas salivares, as quais foram

removidas e demarcadas com um identificador de síntese de DNA (BrdU) e divididos em nove grupos experimentais: imediatamente após, 10 horas, 1, 3, 6, 10, 15, 20 e 30 dias após a irradiação. Como resultados, os autores verificaram que um decréscimo na atividade celular é verificado quase que imediatamente após a irradiação nos ácinos, túbulos convolutos granulares e nos ductos intercalares, decorrente do efeito da radiação, com danos no ciclo normal da célula e consequente morte celular. Posteriormente, um aumento na proliferação celular foi verificado primeiramente nos ductos intercalares atingindo níveis semelhantes ao controle no décimo dia após a irradiação. Estes autores ainda concluíram que a atividade proliferativa da glândula parótida é maior em relação à glândula submandibular, em decorrência de sua maior radiosensibilidade, o que permite uma maior destruição celular e consequente repopulação tecidual.

Um estudo visando correlacionar a apoptose provocada pela radiação em glândulas salivares e suas alterações funcionais foi realizado por Paardekooper *et al.*, em 1998. Glândulas parótidas e submandibulares de ratos foram irradiadas com doses de até 25 Gy de radiação X e as alterações morfológicas foram verificadas até o 6º dia após os animais terem sido irradiados. Nas primeiras 5 a 7 horas após a irradiação, foi observada a presença de células apoptóticas, ou seja, células atroficas e apresentando condensação de cromatina. Em um segundo momento, de 12 a 18 horas após a irradiação, houve um decréscimo no número de células com apoptose, sendo que sua quantidade voltou a aumentar no tempo 24 horas. O declínio do segundo pico de células apoptóticas se deu no tempo 36 horas e no 6º dia elas já estavam praticamente ausentes. Durante os 6 dias de realização do experimento, não foi verificada a presença de infiltrado inflamatório neutrofílico. Os autores concluíram que a apoptose provocada pela radiação não pode ser considerada a causa das alterações funcionais apresentadas por glândulas salivares irradiadas.

Coppes *et al.* (2002) compararam a radiosensibilidade das glândulas parótidas e submandibulares. Grupos de ratos Wistar foram submetidos à dose única de 15 Gy ou dose fracionada equivalente a esta, totalizando uma dose de 32 Gy em 16 frações de 2 Gy ao dia, 5 vezes por semana ou fracionamento acelerado de 32 Gy, realizado em 16 frações de 2 Gy, com 2 irradiações ao dia. Foi realizada avaliação histomorfológica e análise de fluxo salivar, do tempo do início da salivação e da quantidade de amilase salivar previamente, 1, 3, 6, 10, 22, 30, 38, 60, 120, 180 e 240 dias. Antes do período de 120 dias após a irradiação, não foram observadas diferenças entre as glândulas e as diferentes aplicações da radiação. Após 120 dias, as diferenças observadas na função corresponderam aos achados histomorfológicos entre as glândulas salivares. A glândula parótida apresentava mais células das porções secretoras terminais e maior peso, com menores alterações na função e composição quando houve fracionamento da dose de radiação. Os danos nas glândulas submandibulares não diferiram quanto ao tipo de administração da radiação e mostraram-se maiores que os encontrados na glândula parótida. Diante dos resultados, os autores concluíram que a glândula submandibular é mais radiosensível que a glândula parótida nos casos de efeitos tardios após irradiação fracionada e sugeriram que possa ser devido à reduzida capacidade dos seus ductos intercalados de gerar células das porções secretoras terminais ao alcançar sua completa formação.

Em 2006, Li et al. avaliaram os efeitos de um protocolo de uma única megadose de radiação ionizante (IR) sobre a estrutura e função da glândula parótida de mini porcos. Quatorze animais foram submetidos a 15 ou 20 Gy de irradiação, com um acelerador linear, enquanto outros quatro animais serviram como controles não-IR. As taxas de fluxo salivar e bioquímica salivar foram medidos antes, 4 e 16 semanas após a irradiação. As taxas de fluxo salivar diminuíram cerca de 50% com 20 Gy em quatro semanas, ou 15 Gy em 16

semanas após a irradiação. No grupo de 20 Gy, as taxas de fluxo salivar foram reduzidas em cerca de 80% em 16 semanas após a irradiação. A diminuição significativa no cálcio e amilase salivar e o aumento dos níveis de potássio salivares foram encontrados em ambos os grupos irradiados. Houve também alterações transitórias na química sérica e parâmetros hematológicos após a irradiação. Os pesos das glândulas parótidas foram significativamente menores (-50%) nos grupos 15 e 20 Gy, em 4 e 16 semanas após a irradiação. Além disso, as células acinares de ambos os grupos irradiados foi significativamente reduzida quando comparadas com o controle. Os autores concluíram que as alterações estruturais no parênquima da glândula salivar ocorreram relativamente cedo após a irradiação, enquanto que as alterações na produção de saliva foram relativamente demorados. Além disso, a redução do fluxo salivar não foi proporcional à perda de área da célula acinar. Juntos, estes resultados sugerem que os danos celulares causados pela irradiação, provavelmente contribui para a hipofunção salivar.

A patogênese do dano às glândulas salivares maiores após os efeitos cumulativos da radioterapia, segundo Nagler (2002), envolve desde uma injúria celular até um dano subletal ao DNA, que se manifesta e se tornaria letal em uma fase tardia. Dessa maneira, no momento em que as células acinares progenitoras seguem para fase reprodutiva, para o restabelecimento do parênquima, elas degeneram. Os agentes envolvidos neste processo de morte celular tardia são os radicais livres na presença de íons celulares como o ferro e o cobre.

2.2-Radioproteção das Glândulas Salivares

Furuno *et al.* (1974) estudaram os efeitos da administração do isoproterenol, um β -adrenérgico, na proliferação celular e síntese de DNA de glândulas salivares de ratos Wistar machos, diante da exposição a doses de 0.5 a

4000 R (40Gy) de radiação X. Os animais foram divididos em grupos controle, irradiado, tratado com isoproterenol e irradiado e tratado com isoproterenol. O isoproterenol foi administrado por 3 injeções de 1 mmol/g de peso corpóreo, sendo a primeira administrada 30 minutos depois da irradiação e as restantes 48 horas após cada dose. Observou-se aumento da proliferação celular no grupo apenas tratado por isoproterenol, sendo maior, após 24 horas da administração. No grupo apenas irradiado, ocorreu significativo decréscimo dose-dependente de células e da síntese de DNA, enquanto que no grupo irradiado e tratado com isoproterenol houve aumento da síntese e proliferação celular, com exceção para os animais irradiados com doses a partir de 2000 R (20Gy).

Em 1976, Sasaki estudou a estimulação das glândulas salivares de ratos com isoproterenol, administrado 10 dias, 1 e 3 meses após a exposição dos animais a uma dose única de 1000 rad (10Gy) de radiação gama. O grupo controle não foi irradiado, recebendo somente isoproterenol. Todos os animais foram submetidos a três injeções de timidina tritiada, com intervalos de 4 horas entre elas e início 22 horas após a administração do isoproterenol, e foram sacrificados em tempos diferentes após a terceira injeção. As glândulas salivares do lado direito foram utilizadas para a determinação da atividade específica do DNA, enquanto as do lado esquerdo foram submetidas à autorradiografia. Para o grupo que recebeu isoproterenol 10 dias após a irradiação, os resultados indicaram que a atividade específica do DNA das glândulas parótidas era idêntica à do grupo controle 30 minutos após a última injeção de timidina tritiada, mas decresceu cerca de 75% em 5 dias e após este período, permaneceu tão estável quanto a do controle. A redução da atividade do DNA em glândulas submandibulares apresentou-se semelhante à observada nas glândulas parótidas. O autor afirmou que esta redução decorreu da degradação do novo DNA sintetizado. A radioautografia revelou que somente 50% das células inicialmente marcadas

permaneceram por vários dias nas glândulas parótidas irradiadas. Quando o isoproterenol foi administrado de 1 a 3 meses após a irradiação, não foi observado um decréscimo de atividade do DNA que diferisse estatisticamente do grupo controle, apesar da visível degeneração apresentada pelas células acinares. A partir dos resultados desse trabalho, foi possível concluir que 1000 rad (10Gy) de radiação gama são capazes de produzir um dano latente letal em metade das células acinares, sendo que este dano só se manifesta quando estas células são estimuladas a sintetizar DNA ou realizar mitose.

Sodicoff *et al.* (1978) avaliaram o efeito radioprotetor do WR-2721 na região de glândula parótida direita de ratos fêmeas albinos Wistar irradiados. A substância WR-2721 foi administrada 15 a 20 minutos antes da exposição das glândulas parótidas dos animais às doses de 1000 (10Gy), 1600 (16Gy), 2000 (20Gy), 2400 (24Gy), 3000 (30Gy), 3400 (34Gy), 4000 (40Gy), 4800 (48Gy), 5000 (50Gy) e 6000 R (60Gy) de radiação X. Foram realizadas análises da concentração de amilase salivar das glândulas dos lados irradiado e não irradiado após 30, 60 e 90 dias da exposição. Os resultados demonstraram a atividade radioprotetora contra os efeitos crônicos da radiação, levando os autores a sugerirem a utilização do WR-2721 na redução da xerostomia e nas suas complicações de pacientes submetidos à radioterapia como tratamento de neoplasias que envolvem a região bucal.

A estimulação dos β -receptores resulta no aumento da quantidade e ação do AMP cíclico, o qual possui ação radioprotetora. Com a finalidade de verificar a ação radioprotetora por meio da estimulação dos β -receptores pelas substâncias WR-2721 e isoproterenol, Sodicoff & Conger (1983a) utilizaram o propranolol, um antagonista dos β -receptores, associado a essas drogas. As drogas foram administradas 20 minutos antes da irradiação das glândulas

parótidas do lado direito. Todos os grupos foram subdivididos de acordo com a dose de radiação empregada: 1000 (10Gy), 1600 (16Gy), 2000 (20Gy), 2400 (24Gy), 3000 (30Gy), 3400 (34Gy), 4000 (40Gy), 4800 (48Gy), 5000 (50Gy) e 6000 R (60Gy) de radiação X. Foram analisados os pesos das glândulas nos 10 primeiros dias após a irradiação. Verificou-se maior perda de peso nos animais irradiados com doses maiores. Todos os grupos apresentaram maior peso glandular que o grupo apenas irradiado, sendo o peso maior no grupo WR-2721, associado com isoproterenol. Em relação ao grupo tratado com isoproterenol associado ao propranolol, o peso glandular foi similar ao grupo tratado apenas com propranolol. Diante dos resultados, os autores concluíram que o isoproterenol, ao contrário do WR-2721, age como radioprotetor pela via β -receptor.

Empregando as mesmas doses de radiação do estudo anterior, Sodicoff & Conger (1983b) avaliaram o efeito radioprotetor do AMP cíclico em glândulas parótidas de ratas. Os animais foram submetidos ao tratamento com 30 mg/kg de peso de AMP cíclico aos 20, 60, 90, e 120 minutos anteriores e aos 30 minutos posteriores da irradiação. Foi analisado o peso glandular nos sete primeiros dias após a irradiação, o qual diminuiu com o aumento da dose de radiação, sendo essa diminuição menor para o grupo previamente tratado com AMP cíclico. A radioproteção dada pela administração prévia do AMP cíclico à irradiação não diferiu nos tempos estudados, mas em relação ao grupo tratado após a irradiação este não apresentou sinais de radioproteção. Esta última observação levou os autores a concluírem que o AMP cíclico deve estar presente antes da irradiação, por ser um radioprotetor e não um simples facilitador de reparo do dano da radiação ionizante.

Em virtude da hipótese da radiosensibilidade das glândulas parótidas estar relacionada à presença dos grânulos de secreção, Peter *et al.*, em 1995, se

propuseram a elucidar essa questão, avaliando simultaneamente o efeito da degranulação induzida pelo isoproterenol nas células acinares das glândulas salivares de ratos, usando os parâmetros de aberrações nucleares e lise celular. Foram estudados quatro grupos: controle, controle tratado com isoproterenol, irradiado e irradiado 90 minutos após o pré-tratamento com isoproterenol. Os grupos irradiados receberam dose única localizada nas glândulas de 15 Gy de radiação X. Após a irradiação a mesma sequência de alterações morfológicas foram observadas em ambas as glândulas: degranulação de células serosas, indução de aberrações nucleares, lise das células secretórias e recuperação. A degranulação das células acinares pelo isoproterenol pode não ter protegido o tecido contra o dano precoce morfológico radioinduzido, mas a recuperação da integridade tecidual pareceu acelerada na glândula parótida. A degranulação acinar induzida pelo isoproterenol não reduziu a morte precoce das células acinares, indicando que a radiosensibilidade do compartimento epitelial não está diretamente relacionado à presença dos grânulos de secreção.

Funegard *et al.* (1995) investigaram se a suplementação oral com vitaminas antioxidantes como o alfa-tocoferol e β -caroteno podia reduzir os efeitos da irradiação local de 5 Gy de radiação X por 7 dias consecutivos nas glândulas salivares de ratos. Os animais foram divididos em 04 grupos: grupo submetido a uma dieta básica (1,5 mg de retinol e 0,6 mg de alfa-tocoferol) + radiação; grupo que recebeu dieta suplementada (3,4 mg de alfa-tocoferol misturado em óleo de milho e 6 mg de β caroteno) + radiação; e o grupo que recebeu dieta básica e suplementada e não foi irradiado. A saliva foi coletada 2, 4 e 26 semanas depois de completada a irradiação e foram determinados o fluxo salivar, as concentrações de cálcio, sódio, potássio, cloro, proteína total e a atividade de amilase salivar. Através da análise do soro dos animais 5 dias antes da irradiação foi possível constatar que os ratos com dieta suplementada tinham níveis significativamente

altos de β caroteno e alfa-tocoferol circulantes. Houve redução na taxa de secreção salivar para ambos os grupos, porém os animais com dieta suplementada apresentaram fluxo significativamente maior do que os que receberam dieta básica em todos os tempos estudados. A albumina foi medida como um indicativo de inflamação nas glândulas, e duas semanas após a irradiação houve um aumento substancial na saliva dos ratos irradiados, sendo menos significante nos animais com dieta suplementada. As concentrações de cálcio, sódio, potássio, proteína total e a atividade de amilase estavam significativamente acentuadas nos ratos irradiados e alimentados com dieta básica, sendo este aumento menos pronunciado nos ratos com dieta suplementada. Os dados sugerem que a suplementação com alfa-tocoferol e β caroteno protege parcialmente as glândulas salivares de ratos dos efeitos adversos da radiação. O fluxo foi parcialmente preservado e os sinais de reações inflamatórias, avaliados pela secreção de albumina, estavam menos pronunciados nos animais alimentados com dieta suplementada.

Nagler *et al.* (1997b) estudaram o papel dos íons metálicos ferro e cobre no dano radioinduzido e avaliaram a possibilidade de alguma proteção às glândulas salivares parótida e submandibular de ratos. Foram utilizados 4 grupos: controle, grupo que recebeu injeção de salina, grupo que recebeu injeção de salina+pilocarpina e grupo que recebeu injeção de pilocarpina+ciclotidina administradas, intraperitonealmente, 90 minutos antes da irradiação de 15 Gy de radiação X na região de cabeça e pescoço. Foi possível notar uma acentuada perda da função em ambas as glândulas salivares. A ciclotidina é um potente agente degranulador e conferiu 90% de proteção, enquanto que a pilocarpina resultou em apenas 13% de proteção às glândulas parótidas irradiadas. Na submandibular não houve proteção contra a perda de função salivar. A composição da saliva da parótida no grupo pilocarpina+ciclotidina estava acentuadamente rica em ferro,

cobre, manganês e proteína, mas na submandibular nenhuma diferença foi encontrada. Os autores concluíram que a ciclotidina induz degranulação na parótida, mas não na submandibular, sendo bem provável que estes íons metálicos presentes na saliva estejam associados com a mobilização de grânulos de secreção das células serosas, promovendo reações de radicais livres que estão envolvidos no processo do dano tecidual.

Baseado no mecanismo de indução do dano por meio dos metais de transição e a relativa proteção das glândulas pela liberação destes íons antes da irradiação, Nagler *et al.* (1998b) avaliaram a capacidade protetora do Zn-DFO administrado previamente à irradiação com dose de 15 Gy de radiação X na região de cabeça e pescoço. Foram avaliados os pesos corporais e glandulares, assim como o fluxo salivar das glândulas parótida e submandibular e a análise química da saliva apenas da glândula parótida dois meses após a irradiação. Foram observadas proteções parciais no peso glandular, no fluxo salivar e na composição química da saliva da parótida. Não houve alteração no conteúdo de proteína total, enquanto que em relação ao potássio foi observado um aumento na sua concentração para o grupo irradiado e irradiado tratado com Zn-DFO. Não foi observada proteção para a glândula submandibular. Os autores sugerem a existência de outro mecanismo de dano às glândulas submandibulares, não estando relacionado a presença dos íons metálicos nos grânulos de secreção.

Roesink *et al.* (1999) avaliaram o efeito protetor da administração de pilocarpina anteriormente à irradiação das glândulas parótidas de ratos. Os ratos foram submetidos à dose intraperitoneal de 4 mg/kg de pilocarpina uma hora antes da irradiação. Sob anestesia, os animais tiveram apenas as glândulas parótidas do lado direito submetidas às doses únicas de 10, 15, 20 e 30 Gy de radiação X. Foi coletada a saliva quatro dias antes e aos terceiro, sétimo e trigésimo dias da

irradiação. Após a administração intraperitoneal de pilocarpina, foram coletadas amostras de saliva de ambas as glândulas parótidas. A irradiação causou um decréscimo rápido, dose-dependente na função das glândulas, permanecendo no último dia avaliado. Não foram observados efeitos significantes na função das glândulas não irradiadas. Observou-se que a partir do sétimo dia, o pré-tratamento com pilocarpina resultou em menor dano da função das glândulas, mas não protegeu as glândulas irradiadas com uma dose de 30 Gy.

Asari *et al.*, em 2001, investigaram a ação profilática do cloridrato de pilocarpina em um modelo animal de xerostomia induzida por uma dose única de 15 Gy (Grupo 1) ou dose fracionada de 8.6 Gy por 3 dias (Grupo 2). Foi administrado 0.1, 0.2, 0.4 mg/kg de pilocarpina i.p. 90 minutos antes da irradiação do grupo 1 e as mesmas doses mais 0.8 mg/kg no grupo 2. A saliva foi coletada a cada 30 minutos, até completar 120 minutos, sem estimulação e com o uso de 0.2 mg/kg de pilocarpina. Em seguida, sete dias depois, a atividade da amilase salivar, o volume e a concentração de proteínas na saliva secretada pela glândula parótida direita foram medidos antes e após a administração de pilocarpina. Nos ratos irradiados, que não receberam pré-tratamento, a irradiação induziu a uma redução significativa do volume salivar estimulado ou não, independente do protocolo utilizado para a exposição de raios-x. Nos animais que receberam a pilocarpina como pré-tratamento, a secreção salivar foi maior após a estimulação por pilocarpina, em grau dependente da dose de pilocarpina no pré-tratamento, em ambos os modelos de xerostomia. Não houve diferença nas concentrações de amilase ou de proteína entre ratos irradiados pré-tratados com pilocarpina ou não. A diminuição no peso da glândula parótida foi observada em ratos expostos a uma dose única ou fracionada de irradiação. Alterações na glândula submandibular foram menos acentuadas do que na glândula parótida. A capacidade de resposta da glândula parótida para posterior estimulação com pilocarpina foi aparentemente

preservada em ambos os modelos de pré-tratamento com xerostomia pilocarpina, que se aumentou a secreção salivar. Isto sugere que o cloridrato de pilocarpina pode exercer efeitos protetores na xerostomia funcional que ocorre após radioterapia através de uma estimulação de secreção salivar.

Ainda em 2001, Coppes *et al.* avaliaram o efeito radioprotetor da felinefrina, isoproterenol, pilocarpina e metacolina nas glândulas parótidas de ratos Wistar machos, submetidos a dose de 15 Gy de radiação X. Os animais foram divididos nos seguintes grupos: controle, irradiado, tratado com isoproterenol, tratado com felinefrina, tratado com pilocarpina, tratado com metacolina e tratados com as associações de duas das quatro substâncias estudadas, todos 60 minutos antes da irradiação. A função e a análise histomorfológica das glândulas salivares foram realizadas nos dias 1, 3, 7, 10, 30, 60, 120, 180 e 240 seguidos à irradiação. A irradiação na fase aguda (10 primeiros dias) causou um rápido declínio no fluxo salivar, sem mudanças na secreção de amilase salivar e número de células acinares. Na fase inicial (10-60 dias) ocorreu decréscimo de secreção de amilase salivar e das células acinares, continuando similar na fase intermediária (60-120 dias). Na fase tardia (120-240 dias) a função tornou-se bastante comprometida, com maior desorganização tecidual, apesar de um aumento nas quantidades de células acinares. Todos os fármacos estudados promoveram efeito radioprotetor nas fases aguda e inicial, mas com perda de efeito protetor na fase tardia, com exceção para a associação da metacolina e felinefrina. Os resultados levaram os autores a sugerirem a aplicação clínica da associação da metacolina e felinefrina como método radioprotetor na radioterapia de cabeça e pescoço.

Tuji (2004) avaliou o efeito radioprotetor do selenito de sódio em glândulas parótidas de ratos, por meio da análise ultra-estrutural das células acinares. Foram utilizados ratos subdivididos em quatro grupos experimentais:

controle, irradiado, selênio e selênio/irradiado. Os animais pertencentes aos grupos irradiado e selênio/irradiado foram submetidos a 15 Gy de radiação g na região de cabeça e pescoço. Nos animais correspondentes aos grupos selênio e selênio/irradiado foi administrado 0,5 mg/kg de peso de selenito de sódio por via intraperitoneal 24 horas antes da irradiação. As glândulas parótidas foram removidas após 4, 8, 12, 24, 48 e 72 horas da irradiação. A radiação causou alterações celulares a partir de 4 horas. Foram observados vacúolos, alterações nucleares, destruição dos grânulos de secreção e de organelas. O grupo selênio apresentou alterações celulares a partir da oitava hora, porém com menor dano em relação àquele causado pela radiação. O grupo selênio/irradiado apresentou menor intensidade nas alterações com início do processo de reparo nas 12 horas após a irradiação e melhor organização com 48 e 72 horas, sem reparação completa neste último tempo avaliado. Apesar das alterações vistas no grupo apenas tratado com selenito de sódio, sua utilização como radioprotetor de glândulas parótidas é válida, por apresentar relação risco/benefício favorável.

Ramos *et al.*, em 2005, realizou um estudo com o objetivo de avaliar o efeito radioprotetor da vitamina E na função das glândulas salivares. Foram utilizados 90 ratos machos, os quais foram divididos aleatoriamente em cinco grupos experimentais: controle, que correspondeu ao grupo em que os animais receberam óleo de oliva; óleo/irradiado, grupo no qual os animais receberam óleo de oliva e foram irradiados com dose única de 15 Gy de radiação gama na região de cabeça e pescoço; irradiado, grupo em que os animais foram apenas irradiados com dose única de 15 Gy de radiação gama; vitamina E, grupo composto por animais que receberam solução de acetato de alfa-tocoferol (vitamina E), mas não foram irradiados e vitamina E/irradiado, no qual os animais receberam solução de acetato de alfa-tocoferol (vitamina E) antes de serem irradiados com dose única de 15 Gy. Os animais foram sacrificados nos tempos 4 horas, 8 horas e 30 dias após a

irradiação. Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos nos tempos quatro e 8 horas. Aos 30 dias, o volume salivar dos animais do grupo óleo irradiado estava significativamente diminuído em relação ao grupo controle. Os animais do grupo irradiado apresentaram uma redução significativa do volume de saliva quando comparados aos animais dos grupos controle, vitamina E e vitamina E/irradiado, os quais apresentaram volumes de saliva similares. Em relação à composição da saliva, não houve diferenças significativas no conteúdo de proteínas total entre os grupos estudados. A autora concluiu que a irradiação não exerceu nenhum efeito no conteúdo de proteína total da saliva dos ratos irradiados e que a vitamina E protegeu a função salivar 30 dias após a irradiação.

No mesmo ano, Hakim et al. avaliaram o efeito radioprotetor da amifostina sinérgica, lidocaína e pilocarpina sobre a glândula parótida. Quarenta e nove coelhos foram aleatoriamente divididos em sete grupos, com sete animais cada: controle, irradiado-sham tratado, irradiados-lidocaína pré-tratamento, irradiado-amifostina pré-tratamento, irradiado-pilocarpina pré-tratamento, irradiado-pilocarpina e lidocaína pré-tratamento, e irradiado-amifostina e pilocarpina pré-tratamento. Uma semana antes irradiação (15 Gy) e 72 horas, bem como um mês depois, a glândula parótida foi investigada morfológicamente, sialocintilograficamente, e imunohistoquímica com o uso de tenascina-C e actina A de músculo liso. Comparado com os animais do grupo controle, houve uma redução significativa da secreção salivar no grupo irradiado não tratada 72 horas depois da irradiação. Apenas os animais pré-tratados com lidocaína ou amifostina (sozinho ou combinado com pilocarpina) mostraram uma ligeira redução não significativa da secreção salivar. Imunohistoquimicamente, observamos uma perda significativa da actina de músculo liso e um aumento da regulação da tenascina-C expressão nas glândulas no grupo irradiado não tratado. Estas mudanças foram menos evidentes nos animais pré-tratados com lidocaína ou

lidocaína e pilocarpina. Amifostina e pilocarpina não mostraram qualquer influência sobre a expressão de tenascina-C ou A actina de músculo liso. Danos ultraestruturais foram observados nos animais irradiados e não tratados e nos tratados com pilocarpina. Em contraste, a lidocaína e a amifostina preservaram a maior parte da glândula. Um mês após a irradiação, todas as modificações regrediram independentemente do protocolo de tratamento. Achados imunohistoquímicos juntamente com achados ultraestruturais puderam comprovar o potencial radioprotetor da lidocaína sobre a morfologia e a função da glândula parótida.

Em 2009, Burlage et al. estudaram a ação radioprotetora da pilocarpina através da avaliação da proliferação de células progenitoras e células secretoras de tecido da glândula parótida irradiado e não irradiado. Para tanto foram utilizados ratos que receberam uma dose única de 15 Gy de irradiação na glândula parótida unilateralmente, 60 minutos após a administração de pilocarpina (4,0 mg/kg). Os animais foram sacrificados antes, 10 horas, 1, 3, 7, 10, 20 e 30 dias após a irradiação e a proliferação celular foi analisada através da imunohistoquímica, utilizando um teste para PCNA. Como resultados eles tiveram um aumento do PCNA, ou seja, da proliferação das células acinares e dos ductos intercalares nas glândulas tratadas com pilocarpina, tanto nas irradiadas como nas blindadas. Puderam concluir que a pilocarpina tem uma ação compensatória, estimulando a proliferação das células intactas, ou seja, não afetadas pela irradiação.

2.3-O óleo de copaíba

A copaíba - *Copaifera langsdorffii* Desf. (Leguminosae-Caesalpinoideae)
- tem vários nomes populares (copaíba-vermelha, bálsamo, oleiro, copaúba, copaíba-da-várzea, entre outros). Sua árvore atinge a altura de dez a quinze metros e sua copa é globosa e densa. Tem grade ocorrência em vários estados brasileiros (Norte, Minas Gerais, Goiás, Mato Grosso do Sul, São Paulo e Paraná).

Na realidade, várias plantas são chamadas de Copaíba dependendo da região, sendo todas muito parecidas, com as mesmas aplicações e os mesmos nomes. A Região Norte é a maior produtora do óleo-resina de copaíba. O óleo é, na realidade, um composto óleo-resina obtido do gênero *Copaifera* L. (Leguminosae). As principais espécies fornecedoras do óleo-resina são *C. reticulata* Ducke, *C. guianensis* Desf, *C. multijuga* Hayne e *C. officinalis* L., as quais são responsáveis por 70%, 10%, 5% e 5%, respectivamente, da produção brasileira (Veiga Junior & Pinto, 2002).

O óleo-resina já demonstrou várias ações farmacológicas, tais como atividade antinociceptiva (Gomes *et al.*, 2007), protetor e regulador do trato gastrointestinal e anti-ulcerogênico (Paiva *et al.*, 2004a), anti-inflamatório (Lima *et al.*, 2003) e estimulador da cicatrização (Paiva, *et al.* 2002).

O óleo resina de copaíba (CLOR) é um medicamento de plantas medicinais, utilizado para combater desordens funcionais gastrointestinais. Em 1998, Paiva *et al.* avaliaram a ação do óleo-resina de copaíba sobre danos induzidos na mucosa gástrica em ratos. Os animais receberam 100, 200 e 400 mg/kg de CLOR 1 hora antes da indução do dano na mucosa gástrica no grupo 1, enquanto no grupo 2 os animais receberam 400mg/kg de CLOR ou 100 mg/kg de cimetidina após a ligadura do piloro. Concluíram que CLOR previne úlceras gástricas e promove a cura da ferida, portanto é um potencial gastroprotetor, mas com a necessidade de novos estudos.

Paiva *et al.* (2004a) também avaliaram a ação do óleo-resina de copaíba em colite ácido induzida em ratos. Os ratos receberam oralmente, um pré-tratamento com 200 ou 400 mg/kg de óleo-resina de copaíba, 15 e 2 horas e também receberam os tratamentos via retal, 2 horas antes da indução da colite com ácido acético a 4%. Os animais foram sacrificados 24 horas depois e a lesão

da mucosa do cólon analisada macroscopicamente para verificar a gravidade da lesão, a mieloperoxidase (MPO), a atividade e os níveis de malondialdeído. Uma redução significativa no valor dos danos e na relação peso úmido / comprimento de tecido do cólon foram evidentes nos animais que receberam o pré-tratamento. Este efeito foi confirmado bioquimicamente por uma redução na atividade da mieloperoxidase no cólon, o marcador de neutrófilos, e por uma acentuada diminuição do nível de malondialdeído, um indicador de lipoperoxidação. Além disso, o exame microscópico revelou a diminuição da infiltração de células inflamatórias e o edema na submucosa nos segmentos de cólon de ratos tratados com copaíba óleo-resina. Os dados indicam o efeito protetor do óleo-resina de copaíba em modelo animal de colite aguda, possivelmente através de um mecanismo antioxidante e/ou anti-lipoperoxidativo.

Paiva *et al.* (2004b) avaliaram o efeito do óleo de Copaíba na atenuação da isquemia/reperfusão intestinal em ratos. Foram utilizados ratos, divididos em quatro grupos de seis animais, sendo o grupo 1: *sham* operados, grupo 2: isquemia de 45 minutos seguidos de 60 minutos de reperfusão (I/R), os Grupos 3 e 4: I/R CLOR (200 e 400mg/kg, respectivamente). Todos os tratamentos foram realizados 24h, 12h e 2h antes de I/R. Os animais foram sacrificados no final do período de reperfusão e amostras de tecido do íleo foram obtidas para análises bioquímicas. Mieloperoxidase (MPO), um índice de leucócitos polimorfonucleares; malondialdeído (MDA), um produto final da lipoperoxidação; catalase (CAT), uma enzima antioxidante; glutathione reduzida (GSH), um importante antioxidante e nitrito, um marcador de produção de óxido nítrico (NO) foi determinada em homogeneizados de íleo. Foi observada uma redução geral dos danos causados pelo ácido nos animais tratados com o óleo de Copaíba. A análise microscópica revelou uma diminuição do infiltrado inflamatório celular e do edema submucoso. Os autores concluíram que o efeito protetor do óleo de Copaíba em colite aguda de

ratos, possivelmente está relacionado com sua capacidade antioxidante ou anti-lipoperoxidativa.

Não há relatos de toxicidade do óleo de copaíba (Gomes *et al.*, 2007), sendo que este é capaz de diminuir os níveis séricos de uréia e de creatinina em roedores submetidos a isquemia renal (Brito *et al.*, 2005). Também não altera os níveis das enzimas hepáticas AST e ALT (de Araújo Júnior *et al.*, 2005). Um dos achados mais importantes é que a administração oral do óleo de copaíba (2 g/kg) mostrou significativa atividade tumoricida (*in vitro* e *in vivo*) em melanomas induzidos em animais (Lima *et al.*, 2003).

2.4-O medicamento homeopático

Samuel Hahnemann (1755 - 1843 d.C.), médico alemão, desenvolveu a terapêutica baseada na lei dos semelhantes, a qual serviu como base para criar a Homeopatia. Esta consiste num sistema terapêutico que visa tratar as doenças por meio de substâncias ministradas em doses diluídas a ponto de se tornarem infinitesimais, capazes de produzir, em indivíduos sãos, quadros clínicos semelhantes aos que apresentam os doentes a serem tratados.

A escala centesimal criada por Hahnemann consiste da diluição seriada da substância em teste em 99 partes de um veículo alcoólico e de sucussão (agitação do frasco, cem vezes a cada diluição). Os símbolos empregados para indicar a escala centesimal são C30, 30C, CH30, 30CH ou apenas 30, sendo que todas estas conotações têm o mesmo significado.

Abaixo se encontra uma relação de exemplo das conotações e suas respectivas diluições:

1CH = 1/100 ou 1.10^2 ou 1% ou 1000mg/100mL;

2CH = 1/10.000 ou 1.10^4 ou 0,01% ou 10mg/100mL;

3CH = $1/1.000.000$ ou 1.10^6 ou 0,0001% ou 100µg/100mL; e assim por diante.

Montfort (2000) associou a homeopatia aos tratamentos convencionais em três tipos de cânceres, um homem com um câncer indiferenciado de pulmão, uma criança com astrocitoma, um tumor cerebral e uma mulher com leiomiosarcoma. Foram utilizadas substâncias carcinogênicas para formulação da homeopatia em pequenas concentrações e estas, foram administradas concomitantemente ao tratamento convencional. Com isso obtiveram completa remissão da doença ou extensão da vida de todos os pacientes relatados. O autor pode concluir que ao lado de algumas referências pobremente documentadas, o tratamento homeopático, utilizando o princípio da similaridade é promissor.

Em 2004, Rajendran também tratou 3 pacientes com câncer, um homem com adenocarcinoma de reto, uma mulher com carcinoma de células escamosas de pele, em fase terminal e uma mulher com carcinoma de laringe. Sendo no primeiro caso proposto tratamento cirúrgico, mas o paciente refugou ao tratamento, se propondo a usar apenas a homeopatia, ele sobreviveu 3 anos sem complicações, dores ou internações, no segundo caso, foi feita radioterapia e a paciente apresentava muita dor e utilizou a homeopatia como tratamento paliativo, tendo ótimos resultados e finalmente o terceiro caso foi tratado apenas com a homeopatia e o paciente ficou assintomático por três anos. O autor pode concluir que a medicina homeopática, parece ser útil no tratamento de doenças malignas, para ajudar nas condições gerais do paciente, como tratamento paliativo dos sintomas e no cuidado terminal.

Schlappack em 2004, utilizou a homeopatia como tratamento das irritações de pele radioinduzidas em pacientes que receberam radioterapia local após a cirurgia de carcinoma de mama. Os pacientes foram avaliados através de

escala analógica visual, três dias após o início do tratamento com uma dose, tiveram 56% de remissão, e depois novamente avaliados com uma segunda dose tendo 84% de cura. Podendo concluir que o tratamento de irritações de pele radioinduzidas com a homeopatia pareceu completamente bem sucedido, sendo indicado para utilização com maior frequência.

A eficácia do tratamento homeopático (beladona CH7 e RX CH15) nas reações da pele durante a radioterapia de câncer de mama (radiodermatite aguda) foi estudada por Balzarini *et al.* (2000). Utilizando estudo duplo cego ao acaso, envolvendo 66 pacientes que foram operados de câncer de mama e submetidos à radioterapia, mostraram que houve uma tendência de melhora com a homeopatia, embora não estatisticamente significativa, em relação ao placebo.

3-Proposição

O objetivo do presente estudo foi comparar os efeitos radioprotetores da vitamina E com uma preparação homeopática feita a partir da dinamização de RX em 15CH e com um extrato à base do óleo de copaíba, sobre a função salivar e a morfologia das glândulas parótidas de ratos submetidos a 15 Gray de radiação X.

4-Material e Métodos

4.1-Animais

Este estudo foi encaminhado ao Comitê de Ética de Experimentação Animal (CEEAA) do Instituto de Biologia/UNICAMP e foi aprovado em 8 de fevereiro de 2008, sob número 1434-1 (Anexo 1).

Foram utilizados 200 ratos machos, adultos (*Rattus norvegicus albinus*, Wistar) com 6 a 10 semanas de vida, com peso entre 200 a 250g, sendo os mesmos procedentes do Biotério Central da UNICAMP. Os animais foram mantidos em gaiolas plásticas e passaram uma semana de adaptação ambiental após o transporte, antes do início do experimento. Foram mantidos em regime de água e alimentação *ad libitum*, à temperatura média de 23°C e iluminação artificial com lâmpadas fluorescentes, sendo fotoperíodo de 12 horas claro e 12 horas escuro, considerando o período de luz das 7 às 19 horas.

4.2-Fármacos

Foram utilizadas: solução hidroalcoólica irradiada com 15 Gy dinamizada em 15CH (Gerson E. Cecon - Farmácia de Manipulação, Limeira, SP), suspensão de acetato de dl-alfa-tocoferol (vitamina E, Gerson E. Cecon - Farmácia de Manipulação, Limeira, SP) a 80mg/mL em veículo oleoso (Gerson E. Cecon - Farmácia de Manipulação, Limeira, SP), óleo de copaíba 2,5% (Gerson E. Cecon - Farmácia de Manipulação, Limeira, SP), solução salina (cloreto de sódio – NaCl a 0,9%) estéril, anestésico quetamina (100mg/mL), relaxante muscular xilasina (100mg/mL), solução de pentobarbital sódico (30mg/kg) e cloreto de pilocarpina (Sigma Chemical Co., St Louis, MO).

4.3-Grupos experimentais

Os animais foram divididos aleatoriamente em grupos de vinte animais:

- Grupo 1 (grupo controle ou *sham*): os animais receberam solução salina (via oral), foram anestesiados e levados ao acelerador linear, mas não foram irradiados
- Grupo 2 (controle irradiado): recebeu solução salina e irradiação como descrito no item "Irradiação"
- Grupo 3 (vitamina E): os animais receberam vitamina E (acetato de dl-alfa-tocoferol a 80mg/mL) na dose de 40mg/kg/dia/vo (Uçuncu *et al.*, 2006)
- Grupo 4 (vitamina E irradiado): os animais também receberam vitamina E na mesma dose do grupo 3 e irradiação
- Grupo 5 (homeopatia): recebeu 0,25 mL (aproximadamente 1mL/kg) da solução hidro alcóolica de raios X dinamizada em 15 CH por via oral
- Grupo 6 (homeopatia irradiado): recebeu a mesma substância, na mesma dose que o grupo 5 e irradiação
- Grupo 7 (copaíba): recebeu 0,25 mL do óleo-resina de copaíba a 2,5% na dose 2g/kg/vo

- Grupo 8 (copaíba irradiado): recebeu a mesma substância, na mesma dose do grupo 7 e irradiação.

Todos os tratamentos foram iniciados sete dias antes do procedimento de radiação e continuaram por mais sete dias após este procedimento.

4.4-Irradiação

Sete dias após o início dos tratamentos, todos os animais foram anestesiados, via intramuscular com 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), posicionados no acelerador linear (Clinic 6/100[®], Varian, Hospital dos Fornecedores de Cana de Piracicaba), sendo que o equipamento foi regulado de forma a irradiar uma região colimada de 18 x 30 cm, na qual estavam a cabeça e o pescoço dos animais (Figura 1 A), assim, pela colimação, todo o restante do corpo ficou protegido. Os animais foram posicionados a uma distância focal de 100 cm. Os animais do grupo 1 (sham), 3, 5 e 7 foram retirados e os demais receberam uma dose de 15 Gray de radiação X (Ramos *et al.*, 2006).



Figura 1: Posição dos animais no acelerador linear (A) e posição da placa de chumbo (B).

Fonte: Moraes-Ramos (2005).

4.5-Sialometria

Os animais retornaram às suas gaiolas e, decorridos 12 horas, 3, 10, 17 e 24 dias da irradiação, todos os animais foram novamente anestesiados com uma solução de pentobarbital sódico 30mg/kg, por via intraperitoneal. A salivação foi estimulada com pilocarpina (Sigma Chemical Co., St Louis, MO - 4 mg/kg) e, após a lag phase (tempo necessário para o início da salivação após a administração da pilocarpina), foi realizada a sialometria para avaliar a função salivar (Figura 2). O volume da saliva secretada foi estimado pelo peso, supondo que a gravidade específica da saliva é 1.0 g/cm³. A saliva foi colhida durante 30 minutos, segundo a técnica descrita por Moraes-Ramos (2006).



Figura 2: Posição dos animais para colheita de saliva (sialometria). Fonte: Moraes-Ramos (2005).

4.6-Sacrifício dos animais

Os animais de cada grupo, divididos em cinco subgrupos de cinco animais cada, foram sacrificados por aprofundamento da anestesia, após 12 horas, 3, 10, 17 e 24 dias pós-irradiação. As glândulas parótidas foram cuidadosamente removidas (Figura 3) e imediatamente colocadas na solução fixadora. Previamente ao sacrifício, os animais foram submetidos à coleta de saliva da mesma forma previamente descrita.

A fixação foi feita por solução de formol a 10% tamponado (pH 7,2) em tampão fosfato de sódio a 0,1M, durante pelo menos 72 horas. Quando ocorria óbito antes do período previsto, os animais eram descartados.

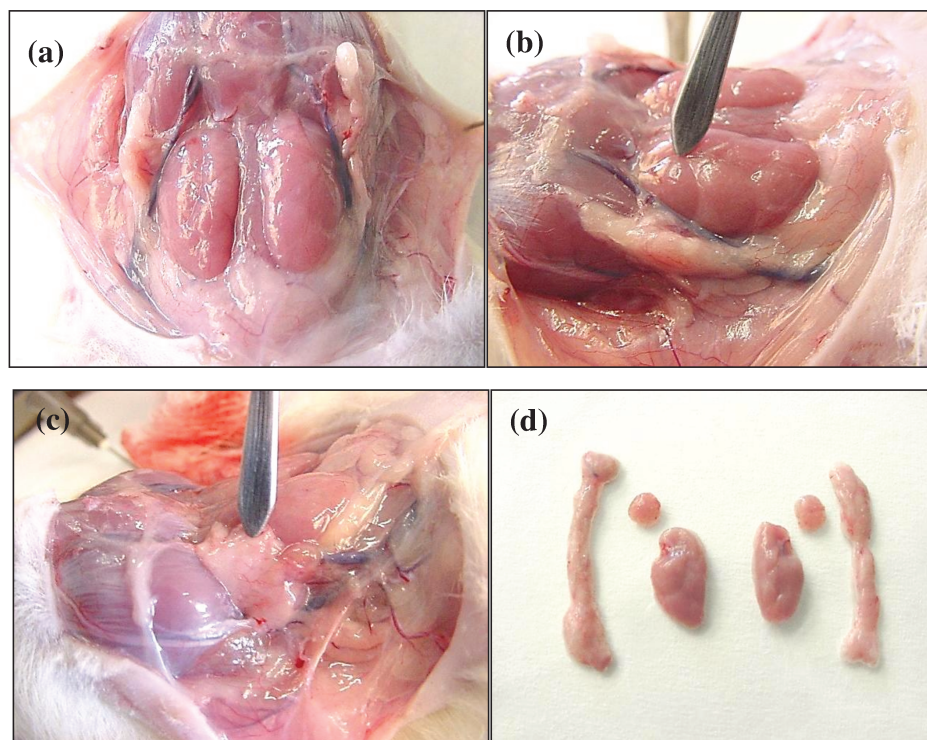


Figura 3: Sequência da dissecação das glândulas salivares. a) rebatimento da pele na região ventral do pescoço; b) localização das glândulas sublingual e submandibular; c) localização da glândula parótida; d) glândulas sublinguais (1), submandibulares (2) e parótidas (3)

4.7-Procedimentos histológicos

4.7.1 Processamento do material para microscopia de luz

As peças removidas foram lavadas em água destilada, desidratada em etanol a 70%, 95% e 100%, diafanizada em xilol, embebida e incluída em parafina a 65°C, em sentido longitudinal. Três cortes seriados de 6 μ m foram feitos em micrótomo manual (Leica, RM 2145) e colhidos em 5 lâminas histológicas, que foram desparafinizados, hidratados e corados por Hematoxilina-Eosina para análise da estrutura geral (Michalani, 1980).

Foram realizadas fotomicrografias dos cortes histológicos seriados e corados, por meio de fotomicroscópio, empregando-se objetiva de 20 e 50 vezes com iluminação convencional. Foram observadas as alterações morfológicas apresentadas pelas glândulas parótidas.

4.8-Forma de análise dos resultados:

4.8.1-Análise quantitativa da glândula salivar – Escore

Para a análise das glândulas foi necessária a adoção de um escore de classificação devido à grande variedade de alterações encontradas nos animais irradiados, essa classificação foi baseada nas alterações encontradas nos ácinos, estrutura mais radio sensível da glândula parótida. O escore de classificação adotado foi o seguinte:

Escore 0: glândula salivar sem alteração morfológica, apresentando ácinos bem estruturados, mostrando células volumosas, com citoplasma abundante, núcleo esférico ocupando a região periférica do ácino. (Figura 4)

Escore 1: glândula salivar apresentando alterações morfológicas na organização dos ácinos e nos núcleos das células acinares. (Figura 5)

Escore 2: glândula apresentando além de alterações nucleares, mostrando uma perda de nitidez no interior dos ácinos. (Figura 6)

Escore 3: estágio avançado de destruição, ocorrendo rompimento total dos limites dos ácinos, com todo conteúdo citoplasmático e os núcleos picnóticos dispersos em uma massa amorfa. (Figura 7)

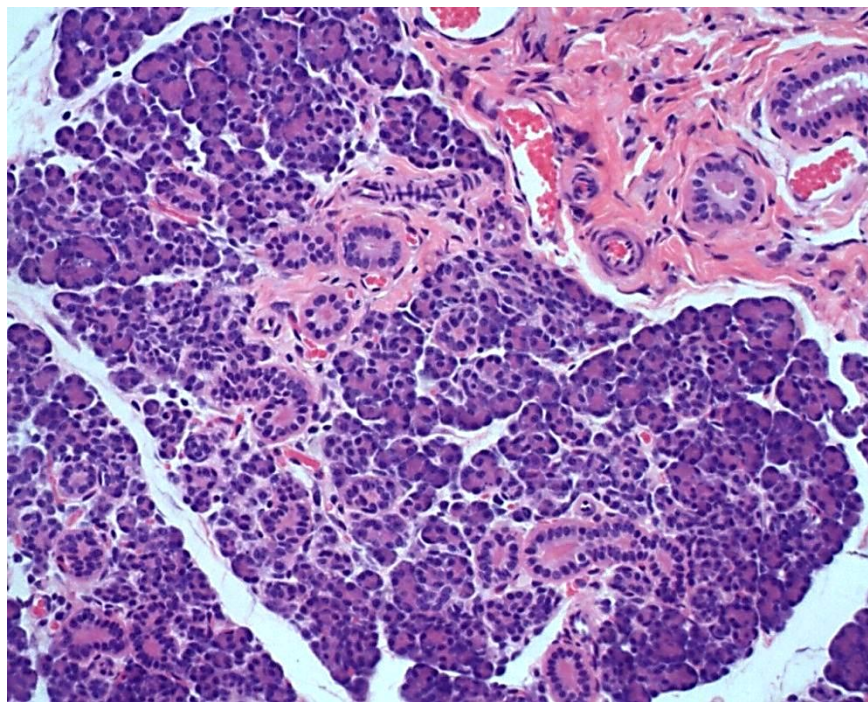


Figura 4: glândula parótida apresentando ácinos bem estruturados, mostrando células volumosas, com citoplasma abundante, núcleo esférico ocupando a região periférica do ácino. (Escore 0 - HE objetiva 20x)

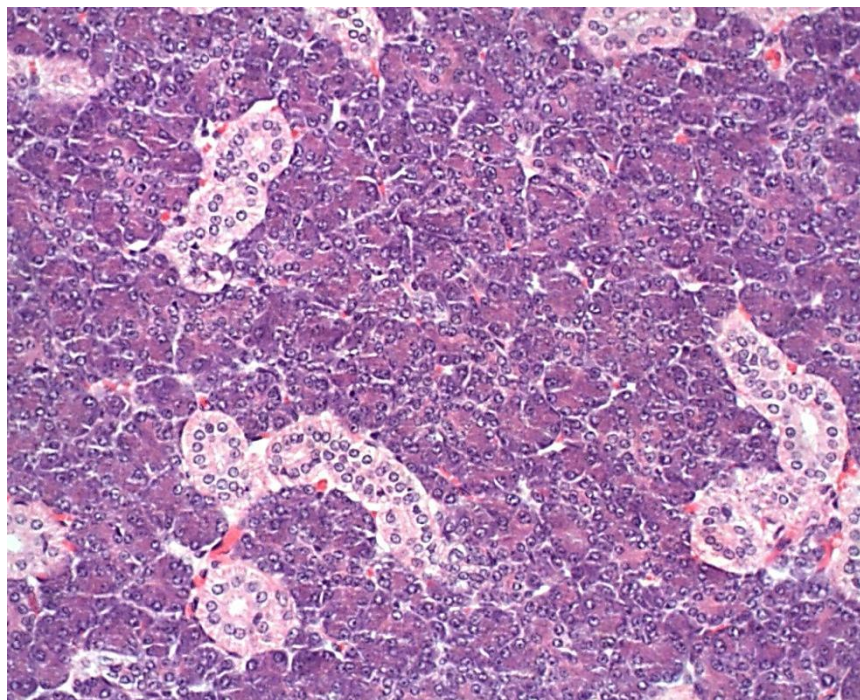


Figura 5: glândula parótida apresentando alterações morfológicas na organização dos ácinos e na glândula em geral. (Escore 1 - HE x20)

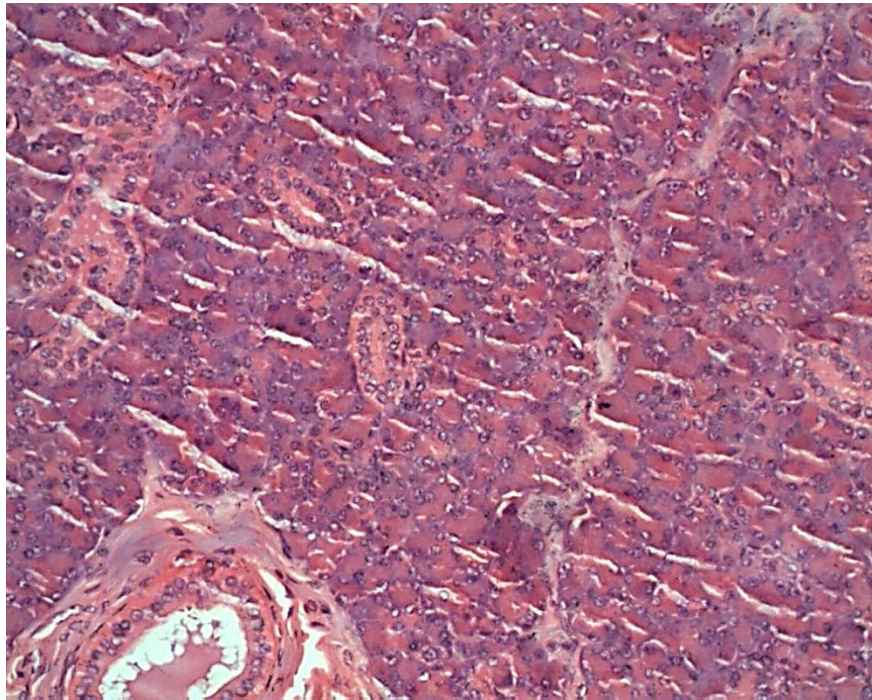


Figura 6: glândula parótida com desorganização estrutural mais acentuada, com perda de nitidez no interior dos ácinos. (Escore 2 - HE objetiva 20x)

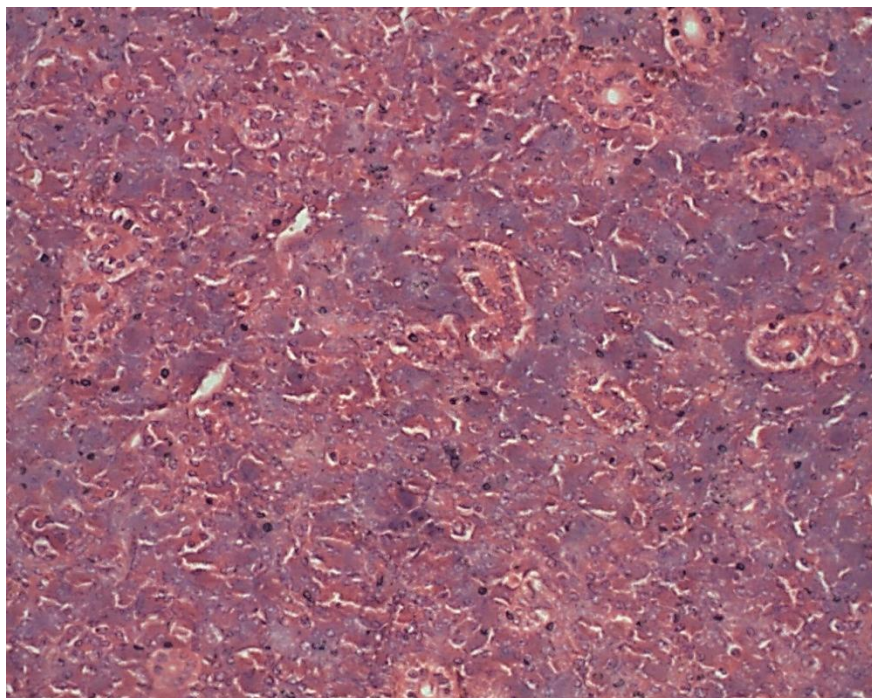


Figura 7: Glândula parótida em estágio avançado de destruição, ocorrendo rompimento total dos limites dos ácinos, com todo conteúdo citoplasmático e os núcleos picnóticos dispersos em uma massa amorfa. (Escore 3 - HE x20)

4.8.2-Análise quantitativa da glândula salivar – Intensidade de pixel

Para quantificação da intensidade de pixel, as fotomicrografias dos cortes histológicos seriados e corados, escolhidos aleatoriamente, foram primeiramente transformadas em escala de cinza e depois, através da ferramenta de histograma, foi avaliado a intensidade média de pixel. Para tanto foi utilizado um programa de domínio público, o ImageJ, desenvolvido pelo National Institutes of Health.

A comparação qualitativa entre os grupos foi subjetiva, isto é, por descrição histológica do tecido em cada grupo. A comparação quantitativa foi feita através do teste de Kruskal-Wallis, considerando um nível de significância de 5%, utilizando o software BioEstat versão 4.0.

5- Resultados

5.1-Análise da função salivar (Sialometria)

A Figura 8 mostra a sialometria (em gramas) em função dos grupos, períodos e irradiação.

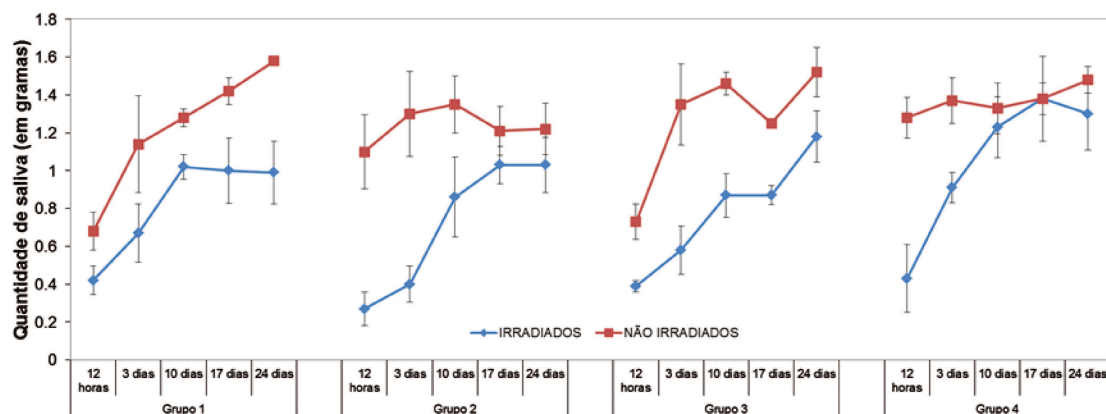


Figura 8: Média ($\pm$ EP) da sialometria em função dos parâmetros em estudo.

A análise dos dados (ANOVA e teste de Tukey) mostrou que, considerando o grupo controle, não houve diferenças estatisticamente significantes ($p > 0,05$) entre os animais irradiados e não irradiados, nos tempos 12 horas e 3 dias, mas nos demais tempos houve maior secreção salivar nos animais não irradiados. Foram observadas diferenças estatisticamente significantes ($p < 0,05$) entre o período de 12 horas e os demais períodos tanto para os animais irradiados quanto para os não irradiados. Não foram observadas diferenças para os demais tempos.

Foi possível observar para o grupo Copaíba que houve menor ($p < 0,05$) quantidade de saliva nos animais irradiados nos tempos 12 horas e 3 dias do que naqueles não irradiados, sendo que nos demais tempos não foram observadas diferenças estatisticamente significantes ($p > 0,05$) entre animais irradiados e não irradiados. Os animais irradiados produziram menos saliva ($p < 0,05$) nos tempos 12 horas e 3 dias do que nos demais períodos, sendo que os demais períodos não mostraram diferenças estatisticamente significantes entre si. Não houve diferenças significativas ($p = 0,5136$) entre os períodos estudados na produção salivar dos animais não irradiados.

No grupo tratado com a homeopatia foram observadas diferenças estatisticamente significantes ($p < 0,05$) entre os animais irradiados e não irradiados nos períodos 3 dias, 10 dias e 17 dias. Houve menor produção de saliva nos períodos 12 horas e 3 dias do que nos demais períodos considerando somente os animais irradiados. Para os animais não irradiados, apenas o período 12 horas mostrou menor produção de saliva do que nos demais períodos.

O grupo Vitamina E mostrou maior produção de saliva para os animais não irradiados nos períodos 12 horas e 3 dias quando comparados aos demais períodos. Não houve diferenças significativas na produção de saliva dos animais não irradiados entre nenhum dos períodos ($p = 0,4293$) submetidos à vitamina E.

Entretanto, nos animais irradiados, houve menor produção de saliva nos dois primeiros períodos do que nos demais.

A comparação entre os tratamentos, considerando somente os animais não irradiados e cada tempo separadamente, mostrou que a vitamina E provocou maior salivação que o tratamento com a homeopatia e controle no período de 12 horas. Não houve diferenças estatisticamente significantes entre os tratamentos nos demais períodos para os animais não irradiados.

Considerando os animais irradiados, foi possível observar que não houve diferenças estatisticamente significantes entre os tratamentos nos períodos de 12 horas, 17 dias e 24 dias, sendo que aos 3 e 10 dias, a vitamina E aumentou a produção salivar em comparação aos demais tratamentos.

Assim, foi possível observar que, de uma maneira geral, os tratamentos não afetaram a produção salivar tanto nos animais irradiados quanto nos não irradiados. Além disso, foi possível observar que após 10 dias da irradiação houve recuperação significativa da produção salivar, independentemente dos tratamentos utilizados.

A Figura 9 mostra a Lag phase observada nos animais irradiados e não irradiados de acordo com o grupo e o período em estudo.

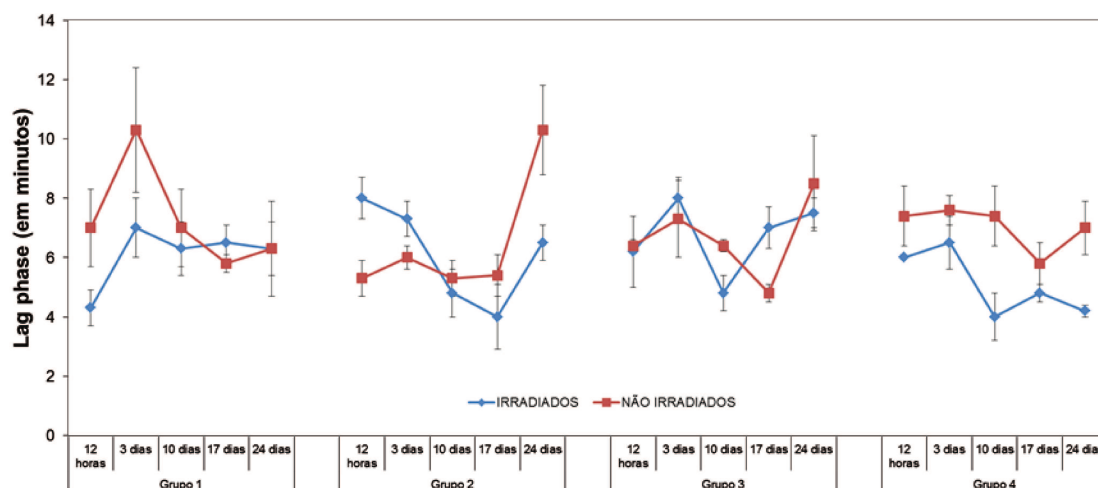


Figura 9: Média ($\pm$ EP) da Lag phase em função dos parâmetros em estudo.

A análise dos dados mostrou que não houve diferenças estatisticamente significantes ($p>0,05$) entre as *Lag phase* dos animais irradiados e não irradiados em nenhum dos períodos de estudo dos grupos controle e homeopatia. Apenas no período de 24 dias, os animais não irradiados do grupo Copaíba mostraram diferenças estatisticamente significantes em relação aos demais períodos, sendo que não houve diferenças entre os períodos para os animais irradiados e nem entre os irradiados e não irradiados em nenhum período.

Os animais do grupo da vitamina E irradiados tiveram um decréscimo pontual da lag phase aos 10 dias de tratamento, o qual foi significativamente menor do que os valores obtidos no mesmo período para os animais não irradiados e menor também que os resultados obtidos para os animais irradiados nos tempos 12 horas e 3 dias.

A análise comparativa entre os tratamentos mostrou que não houve diferenças estatisticamente significantes entre estes, tanto nos animais irradiados quanto nos não irradiados, considerando todos os períodos estudados. Assim, da mesma forma que na produção salivar, a lag phase não foi afetada pelos tratamentos, nem pela irradiação.

5.2-Análise qualitativa/quantitativa das glândulas parótidas

5.2.1-Análise histomorfológica das glândulas

As glândulas parótidas dos animais dos grupos não irradiados (Figura 10), em todos os períodos de tempo estudados, mostraram-se íntegras com ácinos serosos e ductos intralobulares e interlobulares entremeados por tecido conjuntivo, contendo no seu interior vasos sanguíneos, linfáticos e nervos. Os ácinos apresentaram células serosas em forma piramidal, com o ápice voltado para o lúmen da unidade secretora, exibindo o núcleo em posição basal e o citoplasma, corado intensamente pela eosina.

Os animais sacrificados 12 horas após a irradiação (Figura 11), independente do radioprotetor utilizado, apresentaram sinais iniciais de

desorganização dos ácinos com algumas células serosas apresentando granulações, espaços irregulares no citoplasma, perda da sua integridade, facilmente observada pela descontinuidade do seu limite externo e alterações morfológicas nos núcleos como cariorrexe, ou seja, núcleo com distribuição irregular da cromatina, formando grumos na sua periferia, picnose e hipercromatia (Figura 12). Os ductos estriados e excretorios também exibiram sinais iniciais de desorganização, como espaços irregulares no citoplasma, perda da sua integridade e cariorrexe.

As glândulas dos animais com 3 dias após a irradiação (Figura 13) quase a totalidade dos ácinos apresentou estágios intermediários de desorganização, mostrando início de perda dos limites externos. As células serosas exibiram perda parcial ou completa do seu limite externo, desorganização do citoplasma, com alterações morfológicas nos núcleos. Também exibiram perda de nitidez dos ácinos, decorrentes da diminuição da proteína no seu interior, e dessa maneira, uma alteração na coloração. Os ductos e o estroma apresentaram características similares ao período de 3 dias após a irradiação.

Nas glândulas parótidas de 10 dias após a irradiação (Figura 14), os ácinos exibiram estágio avançado de desorganização com áreas onde os limites dos ácinos foram mantidos e outras onde ocorreu o seu rompimento completo com todo o conteúdo citoplasmático e os núcleos picnóticos dispersos, formando uma massa amorfa de células serosas destruídas. Devido ao elevado grau de destruição das estruturas glandulares, era difícil distinguir o parênquima do estroma. No período de 17 dias após a irradiação, aparentemente as glândulas começaram a se regenerar e apresentaram-se com poucas alterações, como observada nos grupos dos animais 3 dias irradiados (Figura 13). Já no período de 24 dias após a irradiação, as glândulas voltaram a ter a estrutura inicial, com poucas alterações, como visto nos grupos dos animais de 12 horas irradiados (Figura 11). Essa aparente regeneração pode ter sua origem em uma capacidade

de renovação celular inerente à glândula parótida e que necessita de pesquisas complementares.

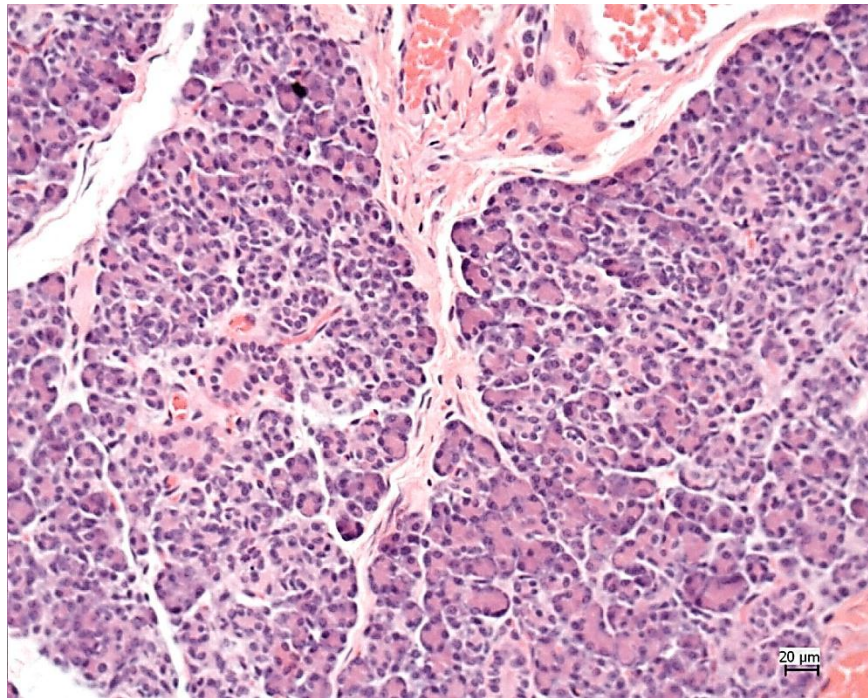


Figura 10: glândula parótida apresentando ácinos bem estruturados, mostrando células volumosas, com citoplasma abundante, núcleo esférico ocupando a região periférica do ácino. (HE objetiva 20x)

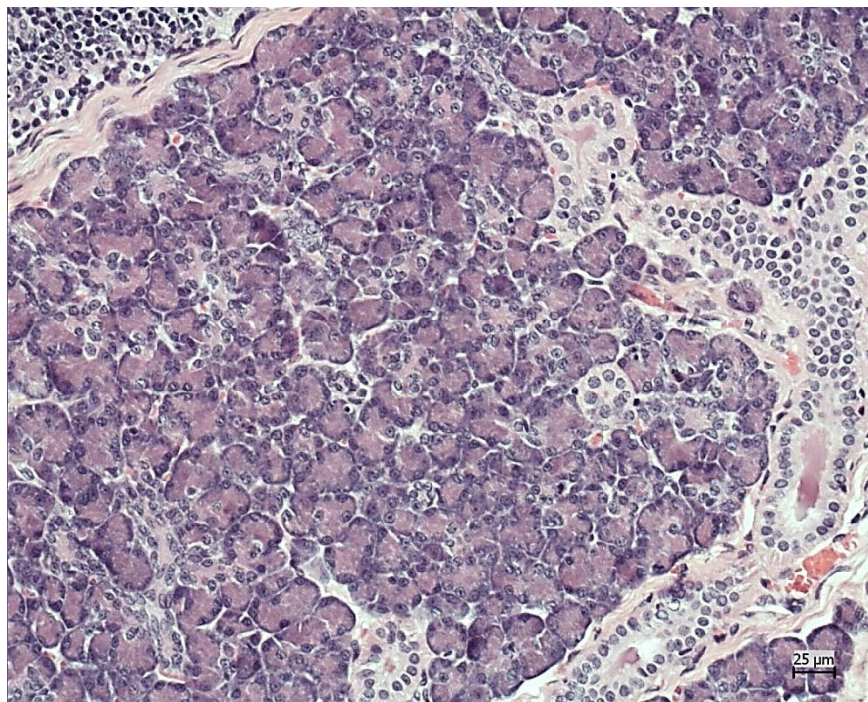


Figura 11: glândula parótida apresentando alterações morfológicas na organização dos ácinos e na glândula em geral. (HE objetiva 20x)

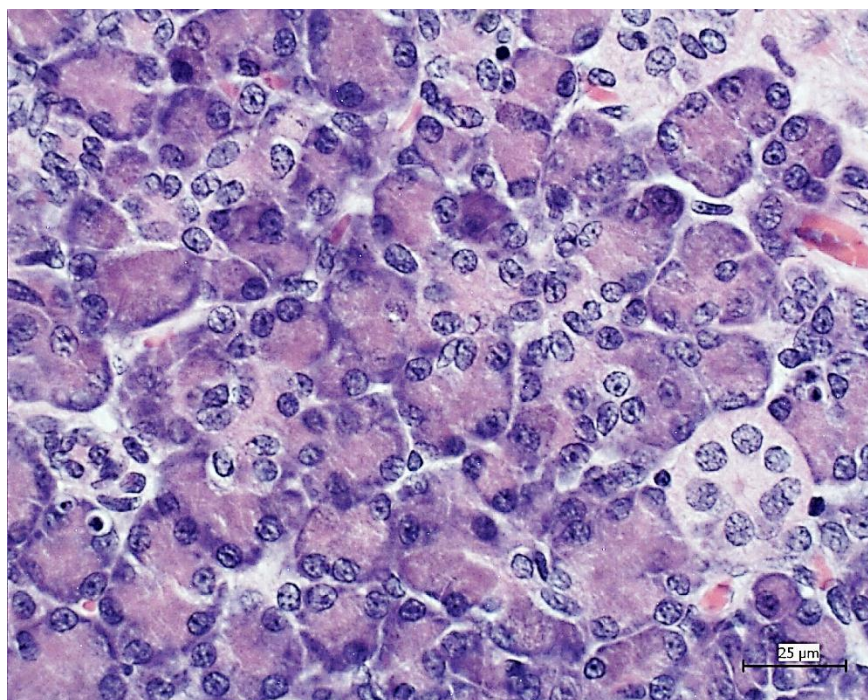


Figura 12: glândula parótida apresentando alterações morfológicas nos núcleos. (HE objetiva 50x)

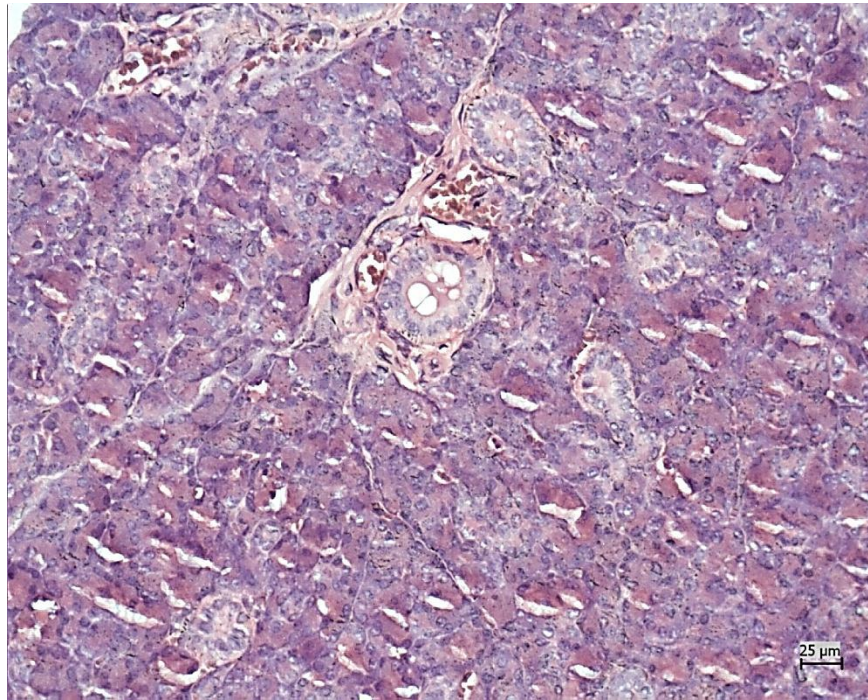


Figura 13: glândula parótida com desorganização estrutural mais acentuada, com perda de nitidez no interior dos ácinos. (HE objetiva 20x)

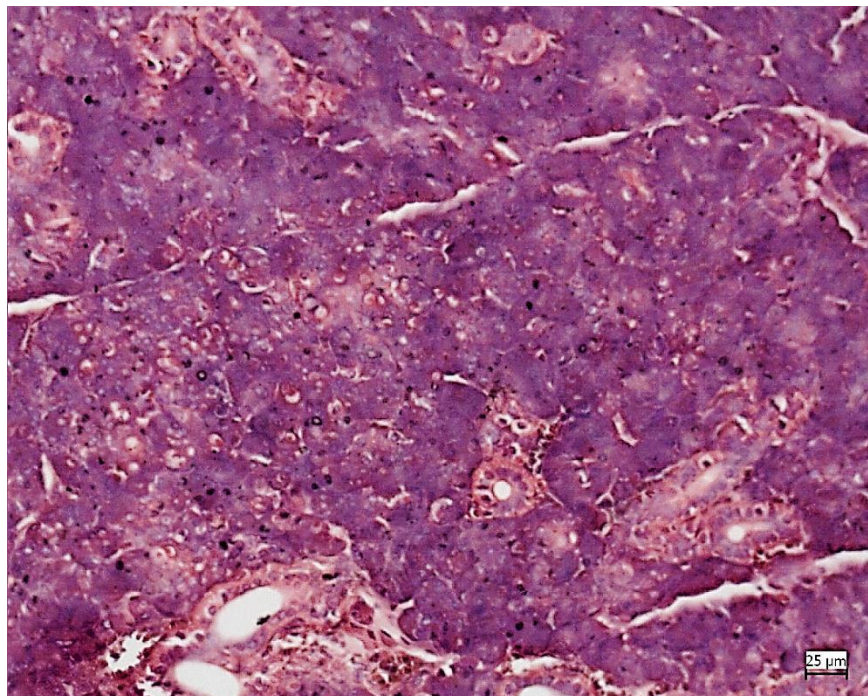


Figura 14: Glândula parótida em estágio avançado de destruição, ocorrendo rompimento total dos limites dos ácinos, com todo conteúdo citoplasmático e os núcleos picnóticos dispersos em uma massa amorfa. (HE objetiva 20x)

5.2.2-Análise quantitativa das glândulas (escore)

As Figuras 15, 16, 17 e 18 mostram as alterações histológicas nas glândulas salivares dos animais de acordo com os grupos e em função dos períodos.

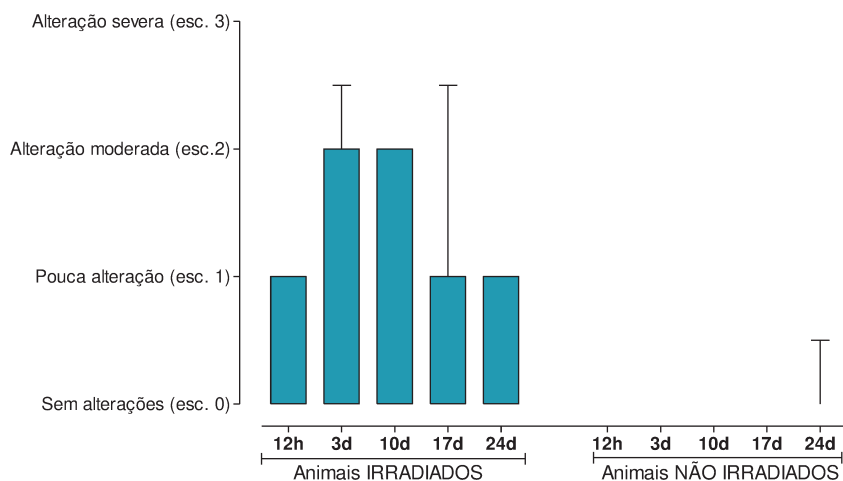


Figura 15: Mediana (desvio interquartílico) das alterações histológicas nas glândulas salivares dos animais irradiados (barras vermelhas) e não irradiados do grupo Controle em função dos períodos.

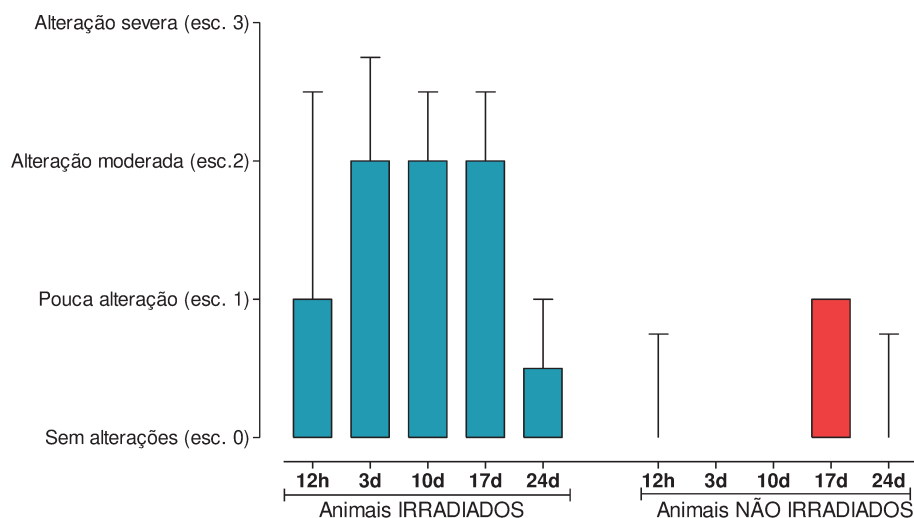


Figura 16: Mediana (desvio interquartílico) das alterações histológicas nas glândulas salivares dos animais irradiados (barras vermelhas) e não irradiados (barras verdes) do grupo Copaíba em função dos períodos.

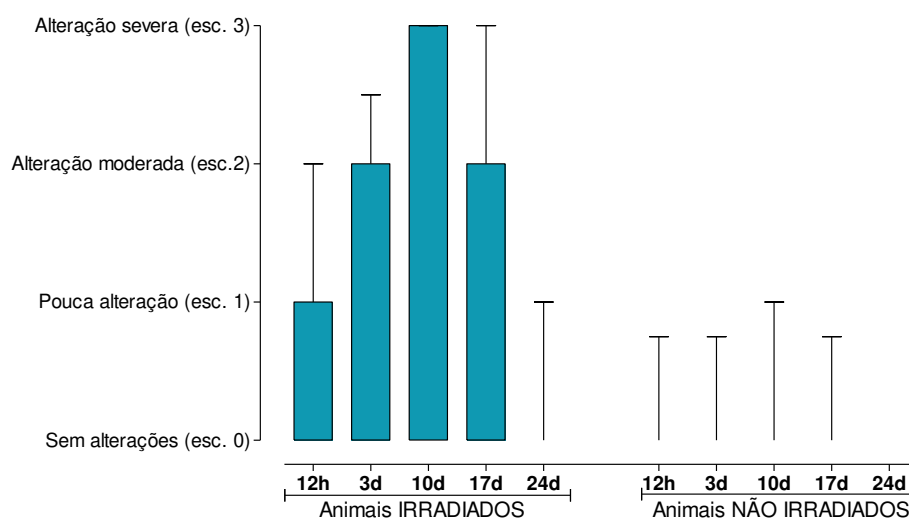


Figura17: Mediana (desvio interquartílico) das alterações histológicas nas glândulas salivares dos animais irradiados (barras vermelhas) e não irradiados (barras verdes) do grupo Homeopatia em função dos períodos.

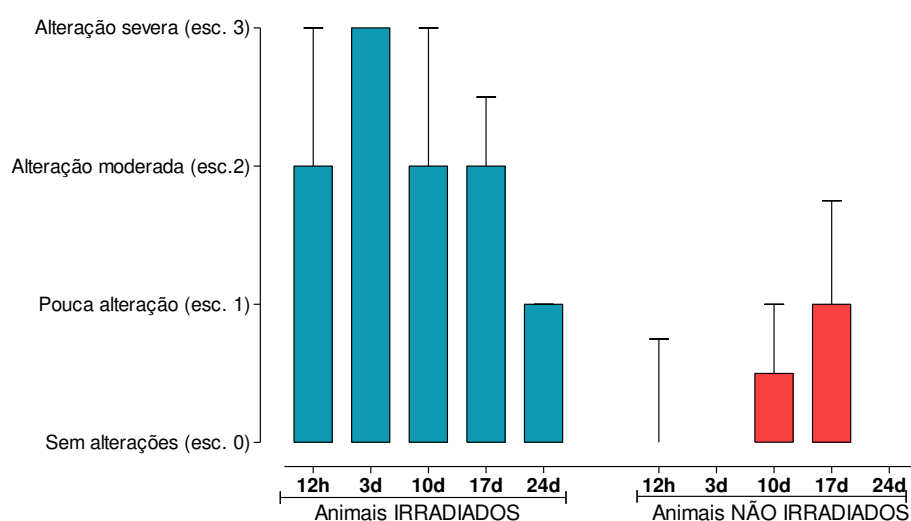


Figura 18: Mediana (desvio interquartílico) das alterações histológicas nas glândulas salivares dos animais irradiados e não irradiados do grupo Vitamina E em função dos períodos.

A análise dos dados (Kruskal-Wallis) mostrou que os escores obtidos com os animais irradiados foram maiores ($p < 0,05$) que aqueles obtidos com os animais não irradiados em todos os períodos de tempo no grupo controle.

Entretanto, considerando-se os animais irradiados ou não irradiados isoladamente, não houve diferenças estatisticamente significantes ($p>0,05$) entre os períodos de tempo no grupo controle. Da mesma forma, a análise do grupo copaíba revelou escores maiores ($p<0,05$) para os animais irradiados em relação aos não irradiados, exceto aos 24 dias quando não foram observadas diferenças estatisticamente significantes. Considerando-se de forma isolada os animais irradiados e não irradiados, não houve diferenças estatisticamente significantes ($p>0,05$) entre os períodos de tempo.

Nos animais irradiados do grupo Homeopatia foi possível observar que o período de 24 dias apresentou significativamente ($p<0,05$) menos destruição quando comparado aos demais períodos e, além disso, não apresentou diferenças estatisticamente significantes ($p<0,05$) com os animais não irradiados em nenhum dos períodos estudados. Não foram observadas diferenças estatisticamente significantes ($p>0,05$) entre os escores de nenhum dos períodos observados nos animais não irradiados deste grupo.

No grupo da vitamina E foram observados maiores escores ($p<0,05$) para os animais irradiados em relação aos não irradiados, exceto às 12 horas e aos 24 dias quando não foram observadas diferenças estatisticamente significantes. Também não foram observadas diferenças estatisticamente significantes ($p>0,05$) entre os períodos considerando-se isoladamente os animais irradiados e não irradiados.

A comparação entre os tratamentos tanto para os animais não irradiados quanto para os irradiados, considerando cada período de tempo separadamente, mostrou que não houve diferenças estatisticamente significantes entre os grupos.

Assim, estes resultados mostram em conjunto que a irradiação causou mudanças estruturais significativas nas glândulas salivares estudadas, sendo que os tratamentos utilizados não foram capazes de produzir alterações nas glândulas

salivares e nem tampouco atenuar de forma decisiva a destruição causada pela radiação X.

5.2.3-Análise quantitativa das glândulas (intensidade de pixel)

A Figura 18 mostra a densidade óptica obtida para os diferentes grupos, nos períodos em estudo.

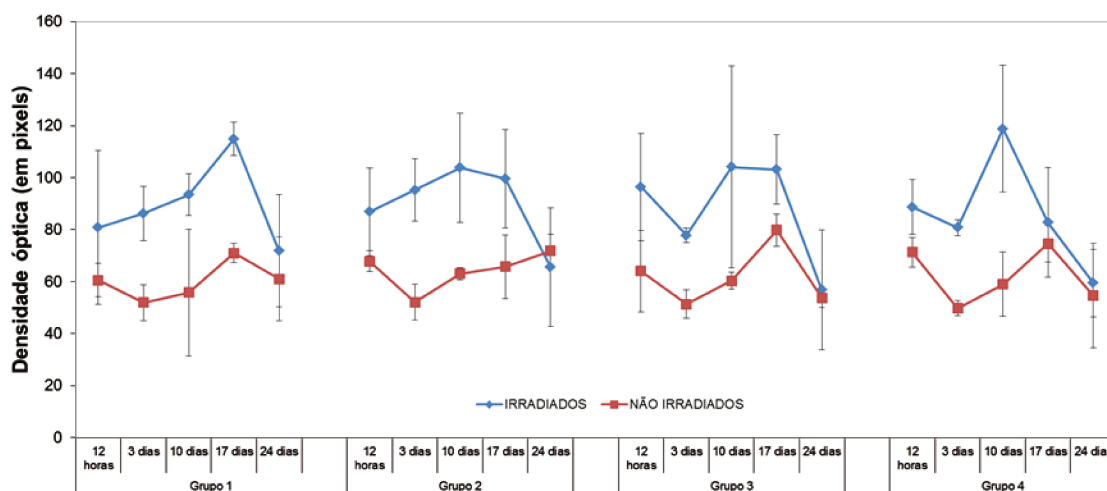


Figura 18: Média ($\pm$ EP) da densidade óptica em função dos parâmetros em estudo.

Para os animais não irradiados, a análise dos dados revelou que houve tendência de aumento da densidade para o grupo controle, a partir de 10 dias, voltando aos valores iniciais até 24 dias. Nos animais do grupo copaíba foi observada uma tendência de manutenção dos valores iniciais a partir de 10 dias, embora houvesse decréscimo significativo aos 3 dias. Para o grupo que recebeu a homeopatia, houve diminuição significativa dos valores iniciais após 12 horas e 3 dias do tratamento, sendo que houve aumento no período de 17 dias e valores menores que os níveis basais aos 24 dias. O mesmo perfil foi observado para a vitamina E.

A análise dos valores observados para os animais irradiados revelou que houve aumento significativo da densidade nos animais do grupo controle para o período de 17 dias, mas estes valores se mostraram significativamente menores ao final do período (24 dias). Os animais tratados com copaíba não exibiram alterações significativas na densidade de pixels até o período de 24 dias, quando os valores caíram abaixo dos níveis iniciais de densidade. Os animais tratados com a homeopatia ou pela vitamina E exibiram comportamento similar, sendo que houve aumento significativo da densidade de pixels no período de 10 dias e posterior queda abaixo dos níveis iniciais aos 24 dias.

O Quadro 1 mostra os valores de p obtidos pelas comparações dos tempos estudados para os valores de densidade obtidos de cada tratamento separadamente.

A comparação entre os valores obtidos nos animais irradiados e não irradiados, considerando cada tempo do estudo e cada tratamento de separadamente, revelou que houve diferenças estatisticamente significantes ($p < 0,05$) entre todos os grupos e em todos os períodos, à exceção do período de 24 dias. Neste último período, os valores de densidade obtidos nos animais irradiados, não apresentaram diferenças estatisticamente significantes com aqueles dos animais não irradiados.

Quadro 1: Valores de p da densidade óptica em função dos parâmetros em estudo.

		Não irradiado				Irradiado			
		12 h	3 d	10 d	17 d	12 h	3 d	10 d	17 d
Controle	3 d	0.0015				0.9866			
	10 d	0.88	0.0093			0.2277	0.2342		
	17 d	0.0084	< 0.0001	0.014		0.0004	0.0005	0.0212	
	24 d	0.464	0.0145	0.6289	0.0009	0.012	0.0114	0.0002	< 0.0001
Copaíba	3 d	< 0.0001				0.4262			
	10 d	0.0599	0.012			0.1043	0.4619		
	17 d	0.972	< 0.0001	0.0553		0.066	0.3486	0.8307	
	24 d	0.7791	< 0.0001	0.0306	0.8061	0.0009	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001
Homeopatia	3 d	0.0057				0.0839			
	10 d	0.9569	0.0122			0.0216	0.0002		
	17 d	0.0146	< 0.0001	0.0206		0.0566	0.0007	0.6956	
	24 d	0.0093	0.7534	0.0197	< 0.0001	0.0032	0.4117	< 0.0001	< 0.0001
Vitamina	3 d	< 0.0001				0.2477			
	10 d	0.0302	0.0159			0.0016	< 0.0001		
	17 d	0.3881	< 0.0001	0.0008		0.4764	0.6571	0.0001	
	24 d	0.0602	0.0061	0.7392	0.0025	0.0001	0.0065	< 0.0001	0.0015

A comparação entre os tratamentos, considerando os animais não irradiados em cada tempo separadamente, mostrou que a vitamina E apresentou maiores valores de pixels do que o grupo controle, sendo que no tempo 17 dias, a copaíba apresentou menores que os grupos homeopatia e vitamina E. No período 24 dias, entretanto, os valores apresentados no grupo copaíba foram maiores ($p < 0,05$) que os demais.

Para os animais irradiados, a análise revelou que aos 3 dias, a vitamina E e a homeopatia produziram níveis de pixels significativamente menores que aqueles dos grupos controle e copaíba. Já aos 10 dias, a vitamina E induziu maiores valores em relação aos demais grupos (exceto para o grupo Homeopatia). Aos 17 dias, a vitamina E mostrou valores menores que os demais, sendo que os grupos copaíba e homeopatia mostraram significativamente menos pixels do que o

grupo controle. Nos períodos de 12 horas e 24 dias, não houve diferenças estatisticamente significantes entre os tratamentos.

6-*Discussão*

Estudos comparativos entre as glândulas salivares do homem e do rato indicaram semelhanças histológicas, fisiológicas, tipo de ação e secreção enzimática (Cheyne, 1939). A opção de utilizar o modelo em animais no presente estudo foi devido ao perfil de secreção da saliva e da redução rápida no fluxo salivar após a irradiação similar às glândulas salivares humanas (Nagler 2002).

A escolha da dose de 15 Gy utilizada no presente trabalho foi porque a saturação das alterações funcionais provocadas pela radiação nas glândulas salivares maiores é iniciada com esta dose, segundo Vissink *et al.* (1990). Além disso, a dose escolhida segue a metodologia previamente utilizada em diversos estudos (Stephens *et al.*, 1986, 1989b; Vissink *et al.*, 1990, 1991; Peter *et al.*,

1994a, 1994b, 1995; Nagler *et al.*, 1997; Tuji, 2004; Ramos, 2006), facilitando a comparação com os dados existentes na literatura.

No presente estudo, a glândula parótida foi escolhida, pois segundo Peter *et al.* (1994) e Coppes *et al.* (1997), esta apresenta uma maior radiosensibilidade em comparação às demais glândulas salivares. Isto pode ser explicado devido esta glândula ser classificada como uma glândula serosa, sendo que em sua constituição aproximadamente 80% das células acinares são serosas, mais radiosensíveis em relação às células acinares mucosas que compõem as demais glândulas salivares. Roslindo *et al.* (1989) observaram que os ácinos serosos e ductos estriados de glândulas parótidas são as estruturas com maior radiosensibilidade.

Coppes *et al.* (1997) ainda relatam que apesar das glândulas salivares apresentarem-se compostas por tecido altamente diferenciado e não apresentarem um metabolismo elevado, o que indicaria uma radiorresistência, a morte das células parenquimais e um decréscimo no fluxo salivar, são observados nas primeiras 24 horas após a irradiação.

Os efeitos agudos e tardios da irradiação nas glândulas salivares são observados dependendo da dose e da maneira da exposição à radiação ionizante. Como as glândulas salivares são incluídas frequentemente no campo da radioterapia para o tratamento de tumores da região de cabeça e pescoço, sua função é rapidamente danificada (Nagler *et al.*, 1993a). Neste estudo, uma dose aguda e relativamente elevada de 15 Gy de radiação X foi utilizada para testar as propriedades de uma formulação homeopática feita à base de radiação X e outra fitoterápica feita à base de óleo de copaíba como um radioprotetor, comparando

com a vitamina E, um conhecido radioprotetor, mas que dentro das condições experimentais utilizadas, não se comportou como tal.

Muitas pesquisas examinaram a função salivar da glândula após a irradiação e os diferentes resultados encontrados são devido ao número diferentes de técnicas e de procedimentos experimentais usados (Nagler *et al.*, 1993a; Mossman *et al.*, 1981; Vissink *et al.*, 1990; Franzen *et al.*, 1992). A redução na função salivar pode ser observada logo após uma dose aguda à região de cabeça e pescoço. Os estudos funcionais de Nagler *et al.* (1993a), demonstraram alterações adiantadas na função, 30 minutos e 1 hora após a irradiação, sendo diferentes somente após 24 horas. No presente estudo, pudemos observar essas alterações a partir de 12 horas independente do tratamento utilizado.

O metabolismo exato da vitamina E é desconhecido. Sua principal função é reagir com radicais livres, interrompendo a reação em cadeia da peroxidação lipídica. Sua propriedade antioxidante é devida à proteção das membranas celulares do dano oxidativo por radicais livres (Kayden e Traber, 1993). Konopacka *et al.* (1998) demonstram uma grande redução nos danos genéticos induzidos por radiação com a administração oral de vitaminas C, E e beta-caroteno imediatamente após a exposição à radiação, sugerindo um mecanismo de reparação do DNA em linfócitos irradiados. O efeito radioprotetor da vitamina E depende da sua concentração, reduzindo o número de micronúcleos em concentração elevada. Em concentrações menores, sua ação é ineficaz (Konopacka, 2001). Na presente pesquisa 40mg/kg foi administrada oralmente, durante 14 dias, sendo 7 dias antes do procedimento de irradiação e não observamos qualquer alteração ou efeitos colaterais nos ratos estudados. As alterações na taxa de fluxo salivar causada pela irradiação são menos severas quando vitaminas, como o α -tocoferol e β -caroteno, são administradas diariamente

na dieta de ratos imediatamente antes e durante a irradiação, segundo Funegard *et al.* (1995). Proteção semelhante foi observada no presente estudo.

Ramos *et al.* (2006) avaliaram o efeito radioprotetor da vitamina E na função das glândulas salivares. Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos controle, controle/irradiado, vitamina E e vitamina E/irradiado nos tempos 4 e 8 horas. Aos 30 dias, os animais do grupo irradiado apresentaram uma redução significativa do volume de saliva quando comparados aos animais dos outros grupos, os quais apresentaram volumes de saliva similares. Os autores concluíram que a vitamina E protegeu a função salivar 30 dias após a irradiação. Neste estudo, considerando os animais irradiados, foi possível observar que não houve diferenças estatisticamente significantes entre os tratamentos nos períodos de 12 horas, 17 dias e 24 dias, sendo que aos 3 e 10 dias, a vitamina E aumentou a produção salivar em comparação aos demais tratamentos. Dessa maneira, é possível que a vitamina E, auxilie na recuperação da produção salivar mais rapidamente. Entretanto, de uma maneira geral, os tratamentos não afetaram a produção salivar tanto nos animais irradiados quanto nos não irradiados. Além disso, foi possível observar que após 10 dias da irradiação houve recuperação significativa da produção salivar, independentemente dos tratamentos utilizados.

A composição e taxa de secreção de amostras de saliva produzidas por glândulas parótidas, submandibulares e sublinguais de ratos irradiados foram objetos de estudo de Vissink *et al.*, em 1990. Eles também avaliaram a fase lag e puderam observar que as alterações nesta fase, foram máximas no 3º dia após a irradiação, o que também foi observado nos nossos resultados, independente do tratamento utilizado.

Estudos a respeito da embriogênese e histogênese de glândulas salivares indicam que a maior parte do desenvolvimento, da regeneração e do reparo das células acinares não são alcançados pela divisão dos próprios ácidos, mas pela proliferação e diferenciação das células epiteliais dos ductos intercalares (Stephens *et al.*, 1989; Peter *et al.*, 1994a). Devido a estas características, as células acinares não deveriam ser muito radiosensíveis e era de se esperar que sua resposta à radiação ionizante ocorresse vagarosamente. Entretanto, as rápidas alterações presentes no fluxo e na composição da saliva de pacientes irradiados indicam que o tecido glandular responde de forma aguda aos efeitos deletérios da radiação.

Sob o ponto de vista radiobiológico, a suposta radiorresistência das glândulas salivares opõe-se drasticamente aos diversos efeitos colaterais apresentados clinicamente por pacientes submetidos à radioterapia. Uma possível explicação para isto seria o fato das células epiteliais serosas encontrarem-se repletas de grânulos de secreção. Estes são ricos em enzimas proteolíticas e metais pesados, como o zinco, o manganês, o ferro e o cobre, que promovem reações de oxiredução e catalizam a peroxidação lipídica provocada pela radiação ionizante. Ao potencializar os efeitos radioativos, estes metais provocam a ruptura das membranas dos grânulos de secreção, promovendo, desta forma, o extravasamento de enzimas proteolíticas dentro do citoplasma e, conseqüentemente, a autólise e morte celular (Abok *et al.*, 1984, Stephens *et al.*, em 1986).

Um artigo publicado por Nagler (2002) parece esclarecer o mecanismo enigmático que envolve a radiosensibilidade do tecido glandular. Este autor esclareceu que dos metais contidos nos grânulos de secreção, somente o ferro e o cobre são capazes de promover reações de oxiredução e catalizar a formação de

radicais livres. Os radicais livres formados, por sua vez, podem atingir as membranas celulares, provocando a peroxidação de seus lipídios, ou afetar diretamente o DNA. Desta forma, quando as células necessitam entrar em mitose para promover a reparação do parênquima glandular, sua morte torna-se inevitável. Assim, pode-se afirmar que o DNA é considerado um alvo muito sensível em glândulas salivares irradiadas (Sasaki, 1976).

Em concordância com o primeiro estágio do estudo de Phillips (1970) e com os trabalhos de Stephens *et al.* (1986) e Paardekooper *et al.* (1998), no presente trabalho foi observada a presença de atrofia severa dos ácinos serosos em todos os grupos irradiados estudados. A análise subjetiva também demonstrou a presença de alterações nucleares, podendo ser observada uma quantidade abundante de núcleos com cariólises e cariorrexes a partir do período de 3 dias. As vacuolizações citoplasmáticas, por sua vez, estavam presentes de forma significativa neste período. Da mesma forma, Stephens *et al.* (1986) identificaram a presença das três figuras de necrose nuclear (picnose, cariólise e cariorrexe) e de vacúolos nas células serosas 12 e 24 horas após a irradiação de glândulas parótidas de macacos, enquanto Vissink *et al.* (1991) observaram picnose, assim como vacuolizações, no 3º e 6º dias após a dose local de 15 Gy ter sido administrada à glândulas submandibulares de ratos. No presente estudo, foi observado o mesmo achado de Stephens *et al.* (1986), em todos os grupos, exceto as 12 horas e 24 dias, onde a glândula se apresentava íntegra e com discretas alterações, respectivamente, concordando com alguns estudos que afirmam que a glândula parótida é mais radiossensível que a glândula submandibular. Essa aparente regeneração pode ter sua origem em uma capacidade de renovação celular inerente à glândula parótida e necessita de pesquisas complementares para poder ser explicada.

Em 1970, Phillips avaliou as mudanças funcionais e estruturais nas glândulas parótidas de ratos submetidos a uma dose única de 21 Gy de radiação X. O autor concluiu que as alterações morfológicas sofridas por glândulas salivares irradiadas poderiam ser divididas em três fases: uma fase aguda de atrofia e necrose (1º ao 7º dia), seguida por uma fase de reparação (8º ao 16º dia) e finalizada por uma nova fase de atrofia (após o 16º dia), contudo com danos menos severos que os encontrados na primeira fase. Também observamos uma fase aguda, a partir do 3º dia após a irradiação, atingindo sua máxima expressão no 17º dia, seguindo para uma fase de regeneração no 24º dia.

Pudemos observar que as estruturas da glândula parótida apresentam diferentes radiosensibilidade, assim como Anderson *et al.* (1981), que relataram as mudanças estruturais nas glândulas salivares decorrentes da radiação ionizante variam de acordo com a região. Os ácinos apresentam a maior radiosensibilidade, sendo, portanto a parte mais sensível da estrutura glandular, enquanto que os ductos estriados e convolutos apresentam uma radiosensibilidade intermediária. Já os ductos externos e extralobulares apresentam-se radiorresistentes.

O óleo-resina de copaíba demonstrou previamente várias ações farmacológicas, entre elas, como protetor e regulador do trato gastrointestinal e anti-ulcerogênico em um estudo realizado por Paiva *et al.*, em 2004, no qual pode avaliar e comprovar sua ação antioxidante. A sua ação antioxidante foi o que norteou sua escolha no presente estudo, uma vez que muito dos danos causados pela radiação podem ser explicados por reações químicas endógenas que elevam a concentração de radicais livres com alto poder oxidante. Mas, dentro das condições experimentais utilizadas, sua ação antioxidante não contribuiu para a radioproteção das glândulas salivares.

Pode-se afirmar que apesar dos imensuráveis benefícios oriundos da radioterapia como modalidade terapêutica dos tumores de cabeça e pescoço, a inclusão das glândulas salivares no campo de irradiação submete-as a diversos efeitos colaterais. Recomenda-se, portanto, o monitoramento periódico e criterioso de pacientes submetidos ao tratamento radioterápico, sendo esta a única forma de se manter os efeitos benéficos da radioterapia e minimizar os malefícios causados pela mesma.

7-Conclusão

A partir dos resultados obtidos e dentro das condições experimentais utilizadas, foi possível concluir que qualitativamente e quantitativamente, a formulação homeopática, o extrato de óleo de copaíba e a vitamina E não se mostraram como radioprotetores eficazes para as glândulas parótidas, não promovendo a preservação da função destas glândulas, embora a vitamina E tenha mostrado maior eficácia em relação aos demais tratamentos.

Referências

1. Abok K, Brunk U, Jung B, Ericsson J. Morphologic and histochemical studies on the differing radiosensitivity of ductular and acinar cells of the rat submandibular gland. *Virch Arch B Cell Pathol* 1984; 45: 443-460.
2. Amosson CM, Teh BS, Mai WY, Woo SY, Chiu JK, Donovan DT, Parke R, Carpenter LS, Lu HH, Grant WH 3rd, Butler EB. Using technology to decrease xerostomia for head and neck cancer patients treated with radiation therapy. *Semin Oncol*. 2002 Dec; 29(6 Suppl 19):71-9.
3. Anderson MW, Izutsu KT, Rice JC. Parotid gland pathophysiology after mixed gamma and neutron irradiation of cancer patients. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1981, 52(5): 495-500.

4. Asari T, Komatsu Y, Misawa K, Hara K, Akahane M. Prophylactic effects of pilocarpine hydrochloride on xerostomia models induced by X-ray irradiation in rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2001 Jul; 28(7):545-50.
5. Arora R, Chawla R, Puri SC, Sagar R, Singh S, Kumar R et al. Radioprotective and antioxidant properties of low-altitude *Podophyllum hexandrum* (LAPH). *J Environ Pathol Toxicol Oncol*. 2005; 24(4):299-314.
6. Balzarini A, Felisi E, Martini A, De Conno F. Efficacy of homeopathic treatment of skin reactions during radiotherapy for breast cancer: a randomised, double-blind clinical trial. *Br Homeopath J*. 2000; 89(1): 8-12.
7. Berdjis CC. Irradiation as a cause of "masculinization" in submaxillary glands. *Br J Exp Pathol*. 1960; XLII(1): 38-42
8. Brito MV, de Moreira RJ, Tavares ML, Carballo MC, Carneiro TX, dos Santos AAS. Copaiba oil effect on urea and creatinine serum levels in rats submitted to kidney ischemia and reperfusion syndrome. *Acta Cir Bras*. 2005 May-Jun; 20(3):243-6.
9. Burlage FR, Faber H, Kampinga HH, Langendijk JA, Vissink A, Coppes RP. Enhanced proliferation of acinar and progenitor cells by prophylactic pilocarpine treatment underlies the observed amelioration of radiation injury to parotid glands. *Radiother Oncol*. 2009 Feb; 90(2):253-6.
10. Chao KS. Protection of salivary function by intensity-modulated radiation therapy in patients with head and neck cancer. *Semin Radiat Oncol*. 2002 Jan;12(1 Suppl 1):20-5.
11. Cheyne VD. A description of the salivary glands of the rat and a procedure for their extirpation. *J Dent Res*. 1939; 18(5): 457-68.
12. Coleman NE, Blakely WF, Fike JR, *et al.*. Molecular and cellular biology of moderate-dose (1–10 Gy) radiation and potential mechanisms of radiation protection: Report of a workshop (Bethesda, Maryland, USA, December, 17–18, 2001). *Radiat Res* 2003 159: 812–834.

13. Coppes RP, Zeilstra LJ, Vissink A, Konings AW. Sialogogue-related radioprotection of salivary gland function: the degranulation concept revisited. *Radiation Research*. 1997; 148: 240-47.
14. Coppes RP, Zeilstra LJW, Kampinga HH, Konings AWT. Early to late saparing of radiation damage to the parotid gland adrenergic and muscarinic receptor agonists. *Br J Cancer*. 2001; 85(7): 1055-63.
15. Coppes RP, Vissink A, Konings AWT. Comparison of radiosensitivity of rat parotid and submandibular glands after different radiation schedules. *Radiotherapy and Oncology*. 2002; 63: 321-328.
16. de Araújo Júnior FA, Braz MN, da Rocha Neto OG, Costa FD, Brito MV. Copaiba oil effect on aminotransferases of rats with hepatic ischemia and reperfusion with and without ischemic preconditioning. *Acta Cir Bras*. 2005 Jan-Feb; 20(1):93-9.
17. Franzén L, Funegard U, Ericson T, Henriksson R. Parotid gland function during and following radiotherapy of malignancies in the head and neck. A consecutive study of salivary flow and patient discomfort. *Eur J cancer*. 1992; 28(2-3): 457-62.
18. Funegard U, Johansson I, Malmer B, Henriksson R, Ericson T. Can alpha tocopherol and beta-carotene supplementation reduce adverse radiation effects on salivary glands? *Eur J of Cancer*. 1995; 31A: 2347-2353.
19. Furuno I, Iwasaki T, Matsudaira H. Effects of X-irradiation on cell proliferation and DNA synthesis induced by administration of isoproterenol in salivary glands of the mouse. *Radiat Res*. 1974; 57 (3): 431-41.
20. Furuse M, Tsuneoka K, Uchida K, Nomoto K. 1997. Acceleration of granulocytic cell recovery in irradiated mice by a single subcutaneous injection of a heat-killed *Lactobacillus casei* preparation. *J Radiat Res* 38: 111–120.
21. Guenechea G, Albella B, Bueren JA, *et al*. 1997. AM218, a new polyanionic polysaccharide, induces radioprotection in mice when administered shortly

- before irradiation. *Int J Radiat Biol* 71: 101–108.
22. Gomes NM, Rezende CM, Fontes SP, Matheus ME, Fernandes PD. Antinociceptive activity of Amazonian Copaiba oils. *J Ethnopharmacol.* 2007; 109(3): 486-92.
 23. Hakim SG, Kosmehl H, Lauer I, Nadrowitz R, Wedel T, Sieg P. A comparative study on the protection profile of lidocaine, amifostine, and pilocarpin on the parotid gland during radiotherapy. *Cancer Res.* 2005 Nov; 65(22): 10486-93.
 24. Harapanhalli RS, Nara VR, Yaghamai V, *et al.* 1994. Vitamins as radioprotectors in vivo: II Protection by vitamin A and soybean oil against radiation damage caused by internal radionuclides. *Radiat Res* 139: 115–122.
 25. Kayden HJ, Traber MG. Absorption, lipoprotein transport, and regulation of plasma concentration of vitamin E in humans. *J Lipid Res* 1993; 34: 343-358.
 26. Konopacka M, Widel M, Rzeszowska-Wolny J. Modifying effect of vitamins C, E and beta carotene against gamma-ray-induced DNA damage in mouse cells. *Mutat Res* 1998; 417: 85-94.
 27. Konopacka M, Rzeszowska-Wolny J. Antioxidants vitamins C, E and beta carotene reduce DNA damage before as well as after gamma-ray irradiation of human lymphocytes in vitro. *Mutat Res* 2001; 491: 1-7.
 28. Kumar KS, Srinivasan V, Toles R, Jobe L, Seed TM. Nutritional approaches to radioprotection: vitamin E. *Mil Med.* 2002 Feb;167(2 Suppl):57-9.
 29. Landauer MR, McChesney DG, Ledney GD. 1997. Synthetic trehalose dicorynomycolate (S-TDCM): behavioural effects and radioprotection. *J Radiat Res* 38: 45–54.
 30. Leslie MD, Dische S. The early changes in salivary gland function during and after radiotherapy given for head and neck cancer. *Radiother Oncol.* 1994 Jan; 30(1):26-32.
 31. Li J, Shan Z, Ou G, Liu X, Zhang C, Baum BJ, Wang S. Structural and functional characteristics of irradiation damage to parotid glands in the miniature pig. *Int*

- J Radiat Oncol Biol Phys. 2005 Aug; 62(5):1510-6.
32. Lima SR, Junior VF, Christo HB, Pinto AC, Fernandes PD. In vivo and in vitro studies on the anticancer activity of *Copaifera multijuga* Hayne and its fractions. *Phytother Res*. 2003; 17(9): 1048-53.
 33. Michalani G. Técnica histológica em anatomia patológica. São Paulo: Pedagógica e Universitária; 1980.
 34. Montfort H. A new homeopathic approach to neoplastic diseases: from cell destruction to carcinogen-induced apoptosis. *Br Homeopath J*. 2000 Apr;89(2):78-83.
 35. Mossman KL, Shatzman AR, Chencharick JD. Effects of radiotherapy on human parotid saliva. *Radiat Res*. 1981; 88:403-412
 36. Nagler RM, Baum BJ, Fox PC. Acute effects of X Irradiation on the function of rat salivary glands. *Radiat Res*. 1993a; 136: 42-47.
 37. Nagler RM, Baum BJ, Fox PC. Effects of X-Irradiation on the function of rat salivary glands at 3 and 40 days. *Radiat Res*. 1993b; 136:392-396.
 38. Nagler RM, Baum BJ, Fox PC. A 2-week pair fed study of early X Irradiation effects on rat major salivary gland function. *Archs Oral Biol*. 1996; 41:713-717.
 39. Nagler RM, Nagler A, Laufer D. Sialochemical profile of X-irradiated major salivary glands in the rat. *Int J Radiat Biol*. 1997a; 71: 441-448.
 40. Nagler RM, Marmary Y, Fox PC, Baum BJ, Har-El R, Chevion M. Irradiation-induced damage to the salivary glands: the role of redox-active iron and copper. *Radiat Res*. 1997b; 147: 468-75.
 41. Nagler RM, Baum BJ, Miller G, Fox PC. Long term salivary effects of single dose head and neck irradiation in the rat. *Archs Oral Biol*. 1998a; 43: 297-303.
 42. Nagler RM, Marmary Y, Golan E, Chevion M. Novel protection strategy against X-Ray-induced damage to salivary glands. *Radiat Res*. 1998b; 149: 271-276.
 43. Nagler RM. Extended-term effects of head and neck irradiation in a rodent. *Eur J Cancer*. 2001; 37:1938-45.

44. Nagler RM. The enigmatic mechanism of irradiation-induced damage to the major salivary glands. *Oral Dis.* 2002; 8: 141-146.
45. O'Connell AC, Redman RS, Evans RL, Ambudkar IS. Radiation-induced progressive decrease in fluid secretion in rat submandibular glands is related to decreased acinar volume and not impaired calcium signaling. *Radiat Res.* 1999; 151(2): 150-8
46. Paardekooper GMRM, Cammelli S, Zeilstra LJW, Coppes RP, Konings AWT. Radiation-induced apoptosis in relation to acute impairment of rat salivary gland function. *Int J Radiat Biol.* 1998; 73(6): 641-8.
47. Paiva LA, Rao VS, Gramosa NV, Silveira ER. Gastroprotective effect of *Copaifera langsdorffii* oleo-resin on experimental gastric ulcer models in rats. *J Ethnopharmacol.* 1998 Aug; 62(1):73-8.
48. Paiva LA, de Alencar Cunha KM, Santos FA, Gramosa NV, Silveira ER, Rao VS. Investigation on the wound healing activity of oleo-resin from *Copaifera langsdorffii* in rats. *Phytother Res.* 2002; 16(8): 737-9.
49. Paiva LA, et. al. Protective effect of *Copaifera langsdorffii* oleo-resin against acetic acid-induced colitis in rats. *J. Ethnopharmacol.* 2004a; 93:51-6.
50. Paiva LA, Gurgel LA, Campos AR, Silveira ER, Rao VS. Attenuation of ischemia/reperfusion-induced intestinal injury by oleo-resin from *Copaifera langsdorffii* in rats. *Life Sci.* 2004b; 75(16): 1979-87.
51. Peter B, Van Waarde MAWH, Vissink A, 's-Gravenmade EJ, Konings AWT. Radiation-induced cell proliferation in the parotid and submandibular glands of the rat. *Radiation Res.* 1994a; 140(2): 257-65.
52. Peter B, Van Waarde MAWH, Vissink A, s-Gravenmade E J, Konings AWT. The role of secretory granules in the radiosensitivity of rat salivary gland acini- a morphological study. *Radiat Res.* 1994b; 140 (3): 419-28.
53. Peter B, Van Warde MAWH, Vissink A, s-Gravenmade EJ, Konings AWT. The role of secretory granules in Radiation-Induced dysfunction of rat salivary

- glands. *Radiat Res.* 1995; 141: 176-182.
54. Phillips RM. X-ray induced changes in function and structure of the rat parotid gland. *J Oral Surg.* 1970; 28(6): 432-7.
55. Rajendran ES. Homeopathy as a supportive therapy in cancer. *Homeopathy.* 2004 Apr; 93(2):99-102.
56. Ramnath N, Lo Russo, Simon M, Martino S. 1997. Phase II evaluation of cisplatin and WR-2721 for refractory metastatic breast cancer. *Am J Clin Oncol* 20: 368–372.
57. Ramos FM, Pontual ML, de Almeida SM, Bóscolo FN, Tabchoury CP, Novaes PD. Evaluation of radioprotective effect of vitamin E in salivary dysfunction in irradiated rats. *Arch Oral Biol.* 2006 Feb; 51(2):96-101.
58. Riehl T, Cohen S, Tessner T, Scholemann S, Stenson WS. 2000. Lipopolysaccharide is radioprotective in mouse intestine through a prostaglandin mediated mechanism. *Gastroenterology* 118: 1106–1116.
59. Roesink JM, Konings AWT, Terhaard CHJ, Battermann JJ, Kampinga HH, Coppes RP. Preservation of the rat parotid gland function after radiation by prophylactic pilocarpine treatment: radiation dose dependency and compensatory mechanisms. *Int J Radiation Oncol Biol Phys.* 1999; 45 (2): 483-9.
60. Roslindo EB, Utrilla LS, Roslindo NC, Onofre MA. Estudo histomorfológico da glândula parótida de rato jovem, submetida à radiação ionizante. *Rev Odontol UNESP.* 1989; 18: 131-42.
61. Sasaki T. Latent and persistent lethal injury in mouse salivary gland cells following gamma irradiation. *Radiat Res.* 1976; 67(1): 104-13.
62. Schlappack O. Homeopathic treatment of radiation-induced itching in breast cancer patients. A prospective observational study. *Homeopathy.* 2004 Oct; 93(4):210-5.
63. Stephens LC, King GK, Peters LJ, Ang KK, Schultheiss TE, Jardine JH. Acute

- and late radiation injury in Rhesus parotid glands. Evidence of interphase cell death. *Am J Pathol.* 1986; 124(3): 469-78.
64. Stephens LC, Schultheiss TE, Ang KK, Peters LJ. Pathogenesis of radiation injury to the salivary glands and potential methods of protection. *Cancer Bull.* 1989; 41(2): 106-114.
65. Sodicoff M, Conger AD, Pratt NE, Trepper P. Radioprotection by WR-2721 against long-term chronic damage to the rat parotid gland. *Radiat Res.* 1978; 76 (1): 172-9.
66. Sodicoff M, Conger AD. Radioprotection of the rat parotid gland by WR-2721 and isoproterenol and its modification by propranolol. *Radiat Res.* 1983a; 94 (1): 97-104.
67. Sodicoff M, Conger AD. Radioprotection of the rat parotid gland by cAMP. *Radiat Res.* 1983b; 96 (1): 90-4.
68. Takagi K, Yamaguchi K, Sakurai T, Asari T, Hashimoto K, Terakawa S. Secretion of saliva in X-Irradiated rat submandibular glands. *Radiat Res.* 2003; 159: 351-360.
69. Thompson ME. Notes on the salivary glands of the albino rat. *Transactions of the Kansas Academy of Science.* 1933 Apr; 13-15: 323-7.
70. Tuji FM, Pontual ML, Barros SP, Almeida SM, Bóscolo FN. Ultrastructural assessment of the radioprotective effects of sodium selenite on parotid glands in rats. *J Oral Sci.* 2010;52(3):369-75.
71. Uğüncü H, Ertekin MV, Yörük O, Sezen O, Ozkan A, Erdoğan F, Kiziltunç A, Gündoğdu C. Vitamin E and L-carnitine, separately or in combination, in the prevention of radiation-induced oral mucositis and myelosuppression: a controlled study in a rat model. *J Radiat Res (Tokyo).* 2006 Mar; 47(1):91-102.
72. Valdez IH, Atkinson JC, Ship JA, Fox PC. Major salivary gland function in patients with radiation-induced xerostomia: flow rates and sialochemistry. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 1993 Jan; 25(1): 41-7.

73. Van Buul PPW, Van Duyn-Goedhart A, Shankaranarayanan K. 1999. In vivo and in vitro radioprotective effects of prostaglandin E, analogue misoprostol in DNA repair-proficient and – deficient rodent cell systems. *Radiat Res* 152: 398–403.
74. Veiga Júnior VF, Pinto AC. O GÊNERO *Copaifera* L. *Quim. Nova*. 2002; 25(2): 273-286.
75. Vissink A, Gravenmade EJ, Ligeon EE, Konings AWT. A Functional and chemical study of radiation effects on rat parotid and submandibular/sublingual glands. *Radiat Res*. 1990; 124: 259-265.
76. Weiss JF. 1997. Pharmacologic approaches to protection against radiation-induced lethality and other damage. *Environ Health Perspect* 105 (Suppl 6): 1473–1478.
77. Wescott WB, Shannon IL. Anatomy of Salivary Glands in C3H Mice. *J Dent Res*. 1974: Mar-Apr. 53(2): 499.



Comissão de Ética na Experimentação Animal
CEEA/Unicamp

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 1434-1, sobre "Efeito da homeopatia e fitoterapia sobre parâmetros morfológicos em alvéolo e glândulas salivares de ratos irradiados. Estudo morfológico e morfométrico", sob a responsabilidade de Profa. Dra. Solange Maria de Almeida / Letícia Rodrigues Nery, 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/Unicamp em 13 de fevereiro de 2008.

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº 1434-1, entitled "The effect of homeopathy and phytoterapeutic agents on morphologic parameters of socket and salivary glands of irradiated rats. Morphologic and morphometric study", 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 February 13, 2008.

Campinas, 13 de fevereiro de 2008.

Profa. Dra. Ana Maria Gualdo
Presidente

Fátima Alonso
Secretária Executiva