

**ELLEN GABY NEVES**

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DO SELENITO DE SÓDIO  
EM DENTES DE FILHOTES DE RATAS  
IRRADIADAS**

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

Orientador: Profa. Dra. Solange Maria de Almeida

**PIRACICABA**

**2011**

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

N414a	<p>Neves, Ellen Gaby. Avaliação do efeito do selenito de sódio em dentes de filhotes de ratas irradiadas / Ellen Gaby Neves. -- Piracicaba, SP: [s.n.], 2011.</p> <p>Orientador: Solange Maria de Almeida. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.</p> <p>1. Radioterapia. 2. Esmalte dentário. 3. Birrefringência. 4. Microscopia eletrônica de varredura. 5. Selênio. I. Almeida, Solange Maria de. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.</p> <p style="text-align: right;">(eras/fop)</p>
-------	--

Título em Inglês: Evaluation of sodium selenite effect on offspring teeth of irradiated female rats

**Palavras-chave em Inglês (Keywords): 1. Radiotherapy. 2. Dental enamel. 3. Birefringence. 4. Microscopy, Electron, Scanning. 5. Selenium**

**Área de Concentração: Radiologia Odontológica**

Titulação: Doutor em Radiologia Odontológica

Banca Examinadora: Solange Maria de Almeida, Flávia Maria de Moraes Ramos-Perez, Fabrício Mesquita Tuji, Deborah Queiroz de Freitas, Frab Norberto Bóscolo

Data da Defesa: 04-02-2011

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 04 de Fevereiro de 2011, considerou a candidata ELLEN GABY NEVES aprovada.

Profa. Dra. SOLANGE MARIA DE ALMEIDA

Profa. Dra. FLÁVIA MARIA DE MORAES RAMOS PEREZ

Prof. Dr. FABRÍCIO MESQUITA TUJI

Profa. Dra. DEBORAH QUEIROZ DE FREITAS

Prof. Dr. FRAB NORBERTO BOSCOLO

## DEDICATÓRIA

*À Deus e Nossa Senhora de Nazaré, que me iluminou e derramou suas bênçãos sobre mim, me dando saúde e força para que eu pudesse sempre seguir em frente!*

*Aos meus queridos pais, Maria de Jesus e Luiz, pela força e incentivo que me deram nos momentos difíceis durante esses oito anos de minha vida, tornando esses momentos cada vez mais fáceis com seu amor incondicional. Obrigada!*

*Ao meu querido irmão Murilo, que sempre se preocupou e torceu para que desse tudo certo. Obrigada pelos momentos de alegria!*

*À minha tia Beth, que acreditou no meu sonho desde o começo e me apoiou nesse longo caminho para que eu pudesse chegar até aqui. Obrigada por tudo!*

*Ao meu amor Romulo, pelo apoio neste último ano de doutorado, pelas palavras de incentivo quando eu achava que nada daria certo, por*

*“pegar no meu pé” para que eu fizesse cada dia um pouco, por compreender meus momentos de ausência, os quais já eram grandes devido à distância que nos separava e principalmente pelo seu imenso amor!*

*AMO TODOS VOCÊS!!!*

## *AGRADECIMENTOS*

*À Faculdade de Odontologia de Piracicaba-UNICAMP.*

*À minha orientadora Professora Dra. Solange Maria de Almeida, uma pessoa muito querida. Exemplo de competência e inteligência. Obrigada pela sua orientação, atenção, idéias, sugestões e compreensão durante a realização dessa pesquisa. Obrigada também pelo carinho, momentos de amizade e descontração por todo esse tempo que passei em Piracicaba.*

*Ao Professor Dr. Frab Norberto Bóscolo. Obrigada pela disposição em me ajudar durante a realização dessa e de outras pesquisas durante estes anos que passei em Piracicaba. Pelos sábios ensinamentos sobre radiologia e sobre a vida. Por me ensinar que independente de qualquer coisa, resultado é resultado! E principalmente pelo carinho que sempre tratou todos nós, seus alunos de pós-graduação.*

*Obrigada pela confiança que depositaram em mim, ao me deixarem voltar para Belém no segundo ano de doutorado para a realização de um dos meus grandes sonhos. Espero não tê-los decepcionado!*

*Ao Professor Dr. Francisco Haiter Neto, por ser um exemplo de determinação, pela transmissão de seus conhecimentos para que pudéssemos nos tornar bons radiologistas. Obrigada!*

*À Professora Dra. Gláucia Maria Bovi Ambrosano, que mesmo estando sempre muito ocupada, me recebeu várias vezes em sua sala para me auxiliar na realização da análise estatística dos resultados desse trabalho.*

*Ao Professor Dr. Mário Roberto Vizioli, por ter disponibilizado sua atenção e seus ensinamentos na área de histologia, para que eu pudesse ter concluído esse trabalho.*

*Ao Professor Dr. Pedro Duarte Novaes, pela ajuda, sugestões e atenção que me foi dada no decorrer de todo o trabalho.*

*A essas duas pessoas especiais na minha vida, Maria e Flávia, que fizeram parte da minha história em Piracicaba desde os primeiros momentos e aí se passaram oito anos. Foram sempre incansáveis e*

*nunca negaram uma ajuda, mesmo nos momentos mais atribulados de suas vidas. Obrigada por tudo meninas!*

*A minha amiga **Deborah**, para a qual não tenho nem palavras para agradecer por tudo, hospedagens, caronas, conselhos... e principalmente, sua amizade. **Dani Pita, Alynne e Jana**, excelentes pessoas e amigas, sempre de alto astral, era raro ficar séria ao lado dessas meninas. Obrigada pela amizade em todo esse tempo de convivência. São amizades que com certeza levarei para o resto da vida, independentemente da distância que nos separa!*

*Aos amigos que conquistei em Piracicaba. **Carol**, sempre prestativa, me deixava tão à vontade quando emprestava seu carro que às vezes até esquecia de devolver. **Amanda**, que saía da faculdade tarde da noite só pra me ajudar nas fotos da tese. **Letícia**, que além dos momentos bons que passávamos em casa, me ajudou muito nas pesquisas também. Meninas podem ter certeza que essas ajudas significaram muito pra mim e serei sempre grata a vocês.*

*Aos meus novos primos queridos **Bruno e Celeste**, que com toda boa vontade disponibilizaram seu tempo para me auxiliar em parte da tese.*

*Aos amigos da Radiologia, **Dani Brait, Dani Frota, Matheus, Luciana, Manu, Bela, Anne, Saulo, Fred, Laura, Bia, Carla, Débora, Monikeli, Luana, Luiz e Marco**, pelos momentos de felicidade e por tornarem mais agradável minha vida em Piracicaba.*

*Aos funcionários da Radiologia, **Waldeck, Fernando e Giselda**, que sempre me auxiliaram em tudo que precisei com toda boa vontade e principalmente alegria. À **Luciane**, sempre calma e serena, uma ótima pessoa, prestativa e eficiente. Sua ajuda foi muito importante!*

*Ao físico **Israel** e as técnicas do Hospital dos Fornecedores de Cana de Piracicaba, **Eliete, Vilma e Maíra**, pela ajuda na realização da irradiação dos animais nessa pesquisa.*

*À disciplina de Histologia, em especial, a **Cidinha e Eliene** que disponibilizaram seus laboratórios, seus conhecimentos, sua atenção,*

*sua boa vontade e principalmente sua amizade. Dois anjos que caíram do céu na minha vida, as quais não devem ter noção do quão importante são para nós. Agradeço também a **Ivani**, pela simpatia e grandiosa ajuda na fase laboratorial da pesquisa. E a todos os colegas, **Cris, Gustavo, Juliana, Nádia, Marcos, Marcelo** e em especial ao **Xandê**, que até o último momento, mesmo de longe me auxiliou no que precisei.*

*Um imenso agradecimento à **Ana**, sempre pronta a ajudar, pelo auxílio na confecção das lâminas.*

*À bibliotecária **Sueli**, pela ajuda na elaboração desse trabalho.*

*Aos bioteristas, **Vanderley e Fábio**, no auxílio do tratamento dos animais utilizados nessa pesquisa.*

*A todos meus **familiares** muito queridos e amados. Vocês estão sempre em meu coração.*

*”Transformar o medo em respeito, o respeito em confiança.  
Descobrir como é bom chegar quando se tem paciência. E para se  
chegar onde quer que seja não é preciso dominar a força, mas a razão.  
É preciso, antes de mais nada, querer”*

*AMYR KLINK*

## RESUMO

O objetivo, neste trabalho, foi avaliar o efeito do selenito de sódio em molares de filhotes de ratas irradiadas. Foram utilizadas 20 ratas grávidas divididas aleatoriamente em quatro grupos experimentais: controle, selênio, irradiado e selênio irradiado. As ratas dos grupos irradiado e selênio irradiado receberam na região abdominal dose única de 4 Gy de radiação X, sendo que o momento da irradiação correspondeu a da fase de sino da odontogênese, 19º dia de gestação. Os animais dos grupos selênio e selênio irradiado receberam 0,3 mg/kg de selenito de sódio aos 18 dias de gestação e o grupo controle foi composto por animais que não receberam selenito de sódio e nem foram irradiados. Os filhotes foram sacrificados aos 3 e 4 dias de nascimento para a avaliação da birrefringência da matriz orgânica do esmalte com o auxílio do microscópio de polarização e aos 30 dias de idade para avaliação da dimensão intercuspídea dos molares por meio da microscopia eletrônica de varredura. Os dados foram submetidos à análise de variância ( $p < 0,05$ ). Por meio da birrefringência, foi possível observar os efeitos deletérios da radiação, uma vez que os grupos irradiados diferiram estatisticamente dos grupos não irradiados, em todos os tempos de estudo. Porém, não houve diferença estatística entre os grupos selênio irradiado e irradiado. Foi observado também diferença estatística entre os grupos controle e selênio no tempo de 4 dias, demonstrando a toxicidade do selenito para esse tempo de estudo. A análise das distâncias intercuspídeas dos molares demonstrou atraso no desenvolvimento desses dentes, sendo observada diferença estatística entre os grupos controle e irradiado, nas medidas lineares méso-distal, vestibulo-lingual mesial e vestibulo-lingual central dos dentes superiores e vestibulo-lingual distal dos dentes inferiores. Entre os grupos selênio irradiado e irradiado, não foi observada diferença estatística nos dentes inferiores e entre o grupo controle e selênio não houve diferença estatística em nenhuma das medidas realizadas. Baseado nesses resultados pôde-se concluir que o selenito de sódio não teve ação radioprotetora e teve efeito tóxico nos tempos iniciais em molares de filhotes de ratas irradiadas durante a odontogênese.

Palavras-chave: radioterapia, esmalte dentário, birrefringência, microscopia eletrônica de varredura.

## ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the sodium selenite effect on offspring molars of irradiated female rats. For this purpose, twenty pregnant female rats were used and divided into four experimental groups: control, selenium, irradiated and selenium-irradiated. The animals of the irradiated and selenium-irradiated groups received a single exposure dose of 4 Gy of X rays in the abdominal region, at this moment the molar is in the bell stage of odontogenesis, 19<sup>o</sup> gestation days. The animals of the selenium and selenium-irradiated group received 0,3 mg/kg of sodium selenite (i.p) at eighteen days of pregnancy and the animals of the control group did not received neither sodium selenite nor irradiation. The pups were sacrificed at 3 and 4 days of birth for the organic enamel matrix birefringence evaluation using a polarizing microscope and at 30 days of birth for assessment of the molar intercuspal size by scanning electron microscopy. Data were submitted to statistical analysis ANOVA ( $p < 0,05$ ). It was possible to observe, by the birefringence, the deleterious effects of radiation. There was a statistically significant difference between the irradiated groups and no irradiated groups on all times of the study. By the way, there was not a statistically significant difference between selenium-irradiated and irradiated groups. It was also observed statistically significant difference between control and selenium groups in the fourth day, showing the selenium toxicity. The analysis of molars intercuspal distances presented a delayed development, with statistical difference between control and irradiated groups. In the linear measurements mesiodistal, buccolingual mesial cusp and buccolingual center cusp of the upper teeth and buccolingual distal cusp of the lower teeth. Between the selenium-irradiated and irradiated groups there was no statistical difference of the lower teeth and between control and selenium groups there was no statistical difference in any of the measurements. Based on these results, it was possible to conclude that sodium selenite did not present a radioprotective effect and present a toxic effect on the initial times on offspring molars of irradiated female rats during odontogenesis.

Key-words: radiotherapy; dental enamel; birefringence; microscopy, electron, scanning.

# SUMÁRIO

<b>1 Introdução</b>	<b>1</b>
<b>2 Revisão da Literatura</b>	<b>4</b>
2.1 Esmalte e Matriz Orgânica	4
2.2 Efeito da Radiação Ionizante no desenvolvimento Dentário	6
2.3 Selenito de Sódio	14
2.4 Ação Radioprotetora do Selenito de Sódio	19
<b>3 Proposição</b>	<b>26</b>
<b>4 Material e Métodos</b>	<b>27</b>
<b>5 Resultados</b>	<b>37</b>
<b>6 Discussão</b>	<b>48</b>
<b>7 Conclusão</b>	<b>55</b>
<b>Referências</b>	<b>56</b>
<b>Anexos</b>	<b>65</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A radioterapia é uma modalidade de tratamento muito utilizada para tumores malignos. O sucesso da radioterapia depende tanto da adequada dose de radiação usada quanto da minimização dos efeitos adversos que a radiação pode provocar no organismo vivo (Ubios *et al.*, 1992), incluindo os tecidos circunjacentes à lesão, já que esses estão inclusos no campo de radiação. Isso porque a interação da radiação com os tecidos causa ionização nos átomos e moléculas que os constituem, podendo levar à alterações morfológicas graves pela presença de radicais livres.

Várias são as alterações que podem se desenvolver no organismo irradiado, como cerebrais, renais, no complexo maxilomandibular, incluindo fissura palatina (Bang *et al.*, 2002), xerostomia, osteorradionecrose, mucosite, distúrbios de crescimento associados às injúrias na cartilagem, nos centros de crescimento condilar e distúrbios no crescimento e desenvolvimento dos dentes (Niehoff *et al.*, 2008).

Estudos realizados em ratos indicam que a dose de radiação e o estágio de histogênese são fatores importantes para determinar o grau do dano causado pela radiação. Quando a irradiação ocorre durante o desenvolvimento dentário, os efeitos podem ser desde um pequeno retardo no crescimento e/ou erupção até a total destruição do germe.

O desenvolvimento dentário dos ratos ocorre de maneira semelhante ao do ser humano, quanto aos tipos celulares e mecanismo de formação (Thesleff & Aberg, 1997). A dentição decídua humana inicia sua formação entre a sexta e oitava semana de vida embrionária, enquanto os dentes permanentes iniciam entre a vigésima semana intra-uterina e o décimo mês pós-natal, exceto os terceiros molares, que tem a sua formação até o quinto ano de vida.

O desenvolvimento do dente ocorre em três estágios: broto, capuz e sino. O estágio de broto é constituído pela primeira invasão epitelial para o interior do ectomesênquima dos maxilares. As células epiteliais demonstram pouca ou nenhuma alteração na forma ou função. As células do ectomesênquima se concentram ao redor do broto epitelial. No estágio de capuz, continua a proliferação e condensação de células do ectomesênquima ao

redor do epitélio em desenvolvimento, o qual se apresenta em forma de capuz. Já no estágio de sino, também conhecido como fase de histodiferenciação e morfodiferenciação, observam-se mudanças importantes no desenvolvimento, em que várias células epiteliais se modificam quanto à forma e a função, além da evidência da papila e do folículo dentário (Ten Cate, 2008).

A instituição da terapia oncológica na fase de morfodiferenciação, afetando as células envolvidas na odontogênese, pode causar: atraso no desenvolvimento dentário, fechamento precoce dos ápices radiculares e mudanças no desenvolvimento do esmalte dentário (Lopes *et al.*, 2006 e Rodrigues *et al.*, 2009).

O esmalte dentário é um tecido de origem ectodérmica, altamente mineralizado, formado por cristais de hidroxiapatita. Sua formação ocorre extracelularmente, com o auxílio de proteínas que são processadas e se reúnem de forma ordenada, originando uma armadura temporária com a importante função de controlar o crescimento, a morfologia e a orientação dos cristais (Moradian-Oldak *et al.*, 2003). A referida matriz é sintetizada, secretada e organizada por células especializadas do órgão dental chamadas ameloblastos. Ela é depositada durante a fase de secreção de formação do esmalte, juntamente com pequena quantidade de mineral, tem sua degradação iniciada na fase de transição e é extensamente degradada e substituída por componente mineral na fase de maturação (Bronckers *et al.*, 1995).

Defeitos na formação do esmalte estão entre as alterações mais comuns da dentição humana. Apesar de não ser um problema de saúde pública, os distúrbios na formação do esmalte podem causar alterações estéticas graves, comprometendo a estrutura do esmalte maduro. As formas graves podem levar a perda precoce do esmalte causando desgaste acentuado com perda de função. As hipoplasias são causadas por falhas durante a formação do esmalte dental. Essas falhas podem ter origem genética ou ser decorrentes da interferência de fatores ambientais, causando posteriormente, disfunções no metabolismo dos ameloblastos ou ainda interferindo diretamente na matriz do esmalte dental em formação. Mutações nos genes das proteínas da matriz orgânica do esmalte, a amelogenina (Collier *et al.*, 1997), a enamelina (Kida *et al.*, 2002) e a ameloblastina (Paine *et al.*, 2002) podem causar hipoplasia do esmalte grave e generalizada.

Atualmente vários pacientes pediátricos obtêm sucesso no tratamento contra o câncer por meio da radioterapia de cabeça e pescoço. Na medida em que essas crianças crescem e se desenvolvem, os cirurgiões dentistas são procurados para a realização de tratamentos odontológicos. Assim, esses profissionais devem conhecer as possíveis alterações dentárias que podem ocorrer nesse pacientes, principalmente àqueles que foram irradiados antes dos 5 anos de idade (Lopes *et al.*, 2006) ou na vida intra-uterina, período no qual os dentes estavam em formação. Com isso, eles podem propor um tratamento adequado, possibilitando um prognóstico favorável.

Com a finalidade de minimizar os danos causados pela radiação nos tecidos sadios são utilizados os agentes radioprotetores. Os radioprotetores são substâncias antioxidantes que tem como função diminuir os efeitos colaterais causados pela radioterapia. Existem vários tipos de radioprotetores e, dentre eles, pode-se citar o selênio, um metal que atua na enzima glutatona peroxidase, facilitando a redução do nível de peróxidos nos tecidos, por causar sua destruição.

Dentre os tipos de selênio, um dos mais utilizados em pesquisas para radioproteção é o selenito de sódio. Sua ação radioprotetora já foi demonstrada no processo de reparação tecidual (Tuji *et al.* 2005), no processo de reparação óssea alveolar de ratos (Neves, 2007), no processo de reparo ósseo em ratas ovariectomizadas (Freitas, 2007) e na reparação óssea em tíbias irradiadas de ratos (Rocha, 2005).

Uma vez comprovadas alterações no órgão dentário devido à ação da radiação ionizante, é importante testar substâncias que possam promover radioproteção desses tecidos, evitando ou minimizando as possíveis anormalidades dentárias, que apresentam importante significado clínico e impacto na vida dos sobreviventes ao câncer ou em seus descendentes.

## **2 REVISÃO DA LITERATURA**

### **2.1 Esmalte e Matriz Orgânica**

Smith & Nanci, em 1995, afirmaram que a amelogênese é controlada pelo órgão do esmalte, que resulta na formação de um tecido altamente mineralizado que recobre a coroa dos dentes. As células do epitélio interno do órgão do esmalte são colunares baixa e possuem um complexo de Golgi rudimentar localizado no pólo do núcleo. Com a sua diferenciação, sofrem alterações consideráveis em seu volume, tornando-se células colunares altas, os ameloblastos. Essas células invertem sua polaridade, e o complexo de Golgi passa a se movimentar ao redor do núcleo. Inicia-se a secreção das proteínas do esmalte as quais são depositadas apicalmente. Assim que a primeira camada de esmalte é formada, ocorre à formação de extensões citoplasmáticas nos ameloblastos, chamada de processo de Tomes. Quando a espessura do esmalte é atingida, cessa-se a secreção, os ameloblastos diminuem de tamanho e o processo de Tomes desaparece.

De acordo com Fincham *et al.*, em 1999, o esmalte é a principal estrutura mineralizada dos organismos vertebrados, sendo formado dentro de uma matriz derivada da síntese e secreção de proteínas pelos ameloblastos. As amelogeninas são as principais proteínas que constituem a matriz orgânica extracelular, elas formam espontaneamente agregados globulares supramoleculares, denominados nanosferas, que representam um fator essencial para formação da matriz de esmalte, guiando o início do crescimento dos cristais na formação do esmalte. Estas nanosferas são compostas de aproximadamente 100 monômeros de amelogeninas. Foram encontradas também na matriz orgânica proteínas sulfatadas, as quais são rapidamente degradadas após sua secreção; albumina sérica, presentes entre os estágios de secreção e transição, não sendo sintetizada pelos ameloblastos; lipídios; além das proteinases, que são responsáveis pela quebra das proteínas do esmalte e completa degradação da matriz, permitindo um rápido crescimento dos cristais durante o estágio de maturação.

Moradian-Oldak (2001) definiu os principais eventos extracelulares que envolvem a formação do esmalte: delimitação do espaço; secreção de proteínas, principalmente amelogeninas; organização das amelogeninas formando uma estrutura supramolecular altamente ordenada; transporte de íons cálcio e fosfato; e nucleação, alongamento e crescimento dos cristais de apatita. No estágio de maturação, ocorre um rápido crescimento e espessamento destes cristais, assim como, a degradação e remoção das proteínas da matriz orgânica extracelular do esmalte, principalmente amelogeninas. Segundo o autor as amelogeninas constituem o principal componente estrutural para o desenvolvimento da matriz extracelular do esmalte dentário.

Espírito Santo & Line, em 2005, afirmaram que as proteínas que compõem a matriz de esmalte são: as amelogeninas, que correspondem a mais de 90% das proteínas da matriz; as enamelinas e tufelinas, as quais representam cerca de 2%; e a ameloblastina, que perfaz um total de 5% do total de proteínas do esmalte. Estas proteínas formam um tecido bastante organizado e estruturado, sendo muito importante para a fase de crescimento, morfologia e orientação dos cristais de hidroxiapatita.

Moradian-Oldak & Goldberg (2005), afirmaram que os ameloblastos, além de sintetizarem e secretarem as amelogeninas e demais constituintes da matriz são responsáveis pelo transporte iônico e eventual reabsorção da matriz protéica. A matriz orgânica tem sua degradação iniciada na fase de transição e é extensamente degradada e substituída por componente mineral na fase de maturação. A amelogenina tem uma função importante no controle da fase mineral, incluindo a forma, orientação e organização dos cristais de hidroxiapatita durante a mineralização do esmalte.

Espírito Santo *et al.* (2006), realizaram uma pesquisa com o objetivo de estudar a birrefringência da matriz orgânica do esmalte durante o desenvolvimento dos incisivos e molares de ratos utilizando microscopia de polarização. Medidas do retardo óptico foram realizadas no estágio precoce de secreção do esmalte, animais com 0 dia, estágio tardio de secreção, animais com 4 dias e no esmalte maduro, filhotes com 9 dias de idade. Os autores

relataram que o brilho da birrefringência começa a se tornar evidente no estágio precoce de secreção, sendo que na fase final de secreção da matriz do esmalte observa-se o maior valor do brilho de birrefringência. No início do estágio da maturação a birrefringência diminuiu. Nos molares, foi observada forte birrefringência nas áreas de secreção do esmalte, quatro dias após o nascimento.

Espírito Santo *et al.*, 2007, analisaram a birrefringência da matriz orgânica do esmalte no estágio de esmalte secretório em ratos para o gene da amelogenina e enamelinina. Os autores observaram alterações no brilho da birrefringência nos ratos homocigoto e heterocigoto para amelogenina e homocigoto para enamelinina. Foi possível concluir que a birrefringência da matriz orgânica do esmalte no estágio de secreção é influenciada pela organização supramolecular dos seus componentes.

Espírito Santo *et al.* (2010) propuseram avaliar a matriz orgânica do esmalte em incisivos de ratos tratados com bisfosfonatos (alendronato e etidronato). Foi observado nos resultados que o retardo óptico dos animais que receberam etidronato é semelhante ao do grupo controle e a matriz orgânica do esmalte dos animais que receberam alendronato apresentaram um brilho de birrefringência diminuído em relação ao controle e etidronato. Os autores sugeriram que os bisfosfonatos afetam a birrefringência da matriz orgânica do esmalte e que alterações na organização supramolecular da matriz de esmalte secretório são mecanismos plausíveis pelo qual fatores ambientais podem causar defeitos no esmalte.

## **2.2 Efeito da Radiação Ionizante no Desenvolvimento Dentário**

Burstone, em 1951, administrou solução de fósforo ( $^{32}\text{P}$ ) radioativo em ratas grávidas nos últimos dias de gestação para posterior avaliação dentária dos filhotes. Foi observado que houve interferência na diferenciação celular nos primeiros e segundos molares e completa inibição da formação dos terceiros molares.

English *et al.* (1954) avaliaram as manifestações orais causadas pela radiação X. Para isso, 64 ratos receberam dose única de 1500 rad na região de cabeça e pescoço. Após 43 dias da irradiação, foram realizadas radiografias dos animais para avaliar o desenvolvimento dos dentes e ossos. Foram observadas alterações no desenvolvimento dos dentes, como hipoplasia de esmalte, irregularidades na junção amelo-dentinária e arquitetura anormal da dentina.

Em 1972, Lindvall *et al.* avaliaram a relativa sensibilidade da amelogênese e dentinogênese. Foram utilizados 75 ratos divididos aleatoriamente em 9 grupos, de acordo com a dose de radiação e tempo de sacrifício, sendo 1 grupo controle e 8 grupos irradiados com doses que variaram de 5 a 9,5 Gy. Foi possível observar alterações em esmalte e dentina, sendo as alterações no esmalte observadas com doses menores; já as alterações em dentina com a mesma dose foram menos freqüentes. Os autores concluíram que a amelogênese é mais radiossensível que a dentinogênese.

Markitziu *et al.* (1974) realizaram uma pesquisa para examinar o efeito produzido por dose única e fracionada de radiação X no desenvolvimento da raiz do terceiro molar de ratos. Os animais foram divididos em dois grupos experimentais: grupo A, animais com 21 dias de idade e grupo B, animais com 40 dias de idade. Ambos os grupos foram subdivididos em quatro: subgrupo 1, no qual os animais receberam dose única de 1500 R; subgrupo 2, com animais que receberam dose fracionada em três vezes, totalizando 2400 R; subgrupo 3, em que os animais receberam 2690 R fracionado em cinco vezes e subgrupo 4, com animais que não receberam tratamento, sendo esse o controle. A avaliação do efeito da radiação, nas condições citadas, foi realizada por meio de radiografias, sendo observado que os terceiros molares nos ratos de 21 dias do subgrupo 1 apresentaram raízes curtas; já os animais do subgrupo 2 apresentaram dentes com raízes curtas, e em alguns casos, ausência de raízes, assim como os do subgrupo 3, porém com menor intensidade. Os animais do grupo controle apresentaram o desenvolvimento normal das raízes do terceiro molar. Nenhum dos ratos de 40 dias de idade de qualquer dos subgrupos mostrou mudanças detectáveis radiograficamente nos terceiros molares. De acordo com os resultados, os

autores concluíram que as mudanças mais pronunciadas ocorreram nos dentes dos ratos que receberam doses fracionadas em três vezes e quando irradiados no início da formação das raízes.

Horn *et al.* (1975) estudaram os efeitos de doses de radiação X única e fracionada em incisivos de ratos. Os animais foram divididos em 4 grupos: grupo 1, cujos animais receberam dose única de 1500 R; grupo 2, com animais que receberam três doses, totalizando 2400 R; grupo 3, animais que receberam cinco doses, com total de 2690 R e grupo 4, controle. Foi possível observar interrupção na aposição de dentina nos ratos que receberam doses fracionadas. Nos animais que receberam dose única, foi observada interrupção da odontogênese reversível. Os autores concluíram que o fracionamento da dose total em três doses causa mais efeitos deletérios do que dose única e dose fracionada em 5 vezes.

Sweeney *et al.* (1977) compararam os efeitos de doses fracionadas num total de 24 Gy, 48 Gy e 72 Gy de radiação gama no desenvolvimento de dentes de ratos. Os animais receberam 6 Gy a cada 3 dias até o total da dose estabelecida para cada grupo. Foi possível observar que a dose de 72 Gy causou mudanças mais severas, porém essas mudanças foram limitadas aos incisivos, sem alterações nos molares erupcionados. Os autores concluíram que dose de 72 Gy, efetiva em tumores, não tem nenhum efeito em dentes erupcionados.

Khan *et al.*, em 1979, avaliaram *in vitro* os efeitos da radiação X nos germes dentários dos molares de ratos. Para isso, foi realizada uma cirurgia para remoção dos filhotes das ratas aos 18 dias de gestação; em seguida, os germes dos primeiros molares foram extraídos e expostos a 16 Gy de raios X. Para avaliação dos germes dentários, foi realizado um acompanhamento diário por 12 dias. Severa desorganização nos germes foi observada após 24 horas da irradiação, assim como, falha na calcificação da dentina e ausência da matriz do esmalte. Culturas com mais de 10 dias demonstraram extensa morte celular, degeneração severa dos ameloblastos e completa dos odontoblastos.

Carl & Wood, em 1980, relataram dois casos clínicos, nos quais avaliaram os efeitos da radiação no desenvolvimento dentário e ósseo. No primeiro caso clínico, foi avaliada a radiografia panorâmica de um paciente de 10 anos, que aos 4 anos de idade foi submetido à radioterapia com uma dose de 5 Gy na região de cabeça e pescoço, devido a um rabdmiossarcoma embrionário. Foram observadas formação parcial das raízes dos molares, ausência das raízes dos dentes anteriores e pré-molares e mandíbula pouco desenvolvida. No segundo caso clínico, uma paciente de 9 anos de idade, também acometida por um rabdmiossarcoma embrionário, foi submetida à radioterapia com dose de 4 Gy. Foram observados somente problemas na formação dos terceiros molares, os quais não se formaram aos 14 anos de idade.

Pearson & Phelps, em 1981, estudaram as mudanças que ocorreram em dentes de ratos após irradiação gama de corpo todo. As doses utilizadas foram de 8, 10, 12, 14 e 16 Gy. Os danos aos dentes foram detectados após sete semanas de irradiação nos grupos que receberam 12, 14 e 16 Gy e o efeito mais observado pelos autores foi a ausência dentária. Os autores afirmaram também que a região odontogênica é altamente radiosensível.

Em 1987, McGinnis *et al.* avaliaram o desenvolvimento dos terceiros molares de 47 pacientes que foram submetidos à radioterapia na região de cabeça e pescoço, devido a doença de Hodgkin's, com uma dose de 37 Gy de radiação. Por meio de acompanhamento radiográfico, foram constatados nesses pacientes, aumento na frequência de agenesia bilateral e unilateral, hipoplasia de esmalte e anomalia no desenvolvimento radicular, quando comparados com indivíduos que não receberam a terapia.

Takeda *et al.*, em 1987, relataram um caso clínico de uma paciente de 27 anos de idade que, aos 3 anos e 1 mês, foi submetida a dose de 5400 R de radiação gama para tratamento de um glioma retinal no olho direito. Foi verificada a ausência total das raízes dos incisivos, canino direito e pré-molar superior direito. Pela análise histológica dos dentes supracitados, não havia alterações no esmalte e na dentina coronária, porém no assoalho

pulpar foi observada obliteração por depósito irregular de dentina, com ausência das respectivas raízes.

Saad *et al.* (1991) avaliaram os efeitos da radiação gama no desenvolvimento dos incisivos em fetos de ratos. As ratas grávidas foram irradiadas com 4 Gy de radiação gama no 12º dia de gestação, sendo sacrificadas aos 18 dias de gestação. Foi observado um atraso no desenvolvimento dos incisivos nos fetos irradiados, em que a matriz de dentina estava ausente e a papila dental apresentou-se desorganizada. Já nos animais do grupo controle, foi possível observar a matriz da dentina. Os autores concluíram que a radiação gama interfere na citodiferenciação do órgão do esmalte e da papila dental, com subsequente inibição da odontogênese normal.

Ubios *et al.* (1992) realizaram uma pesquisa para avaliar os efeitos da radiação X no crescimento da mandíbula e na erupção dos molares de ratos. Cinquenta animais com 5 dias de idade foram divididos em dois grupos experimentais. Metade foi irradiada localmente na região dos molares com uma dose de 20 Gy de radiação X e o restante serviu como controle. Após dissecação, as hemimandíbulas foram radiografadas para avaliar medidas de altura e comprimento da mandíbula e a erupção dos molares. Os autores observaram que os molares dos grupos irradiados não erupcionaram ou apresentaram-se com erupção atrasada em relação ao controle e que os valores das medidas de altura e comprimento da mandíbula no grupo irradiado foram menores que no controle.

Em 1994, Dahllof *et al.*, avaliaram, por meio de métodos radiográficos e histológicos, os efeitos da quimioterapia e radioterapia no desenvolvimento dentário. Uma criança portadora de leucemia linfoblástica aguda, inicialmente tratada de acordo com o protocolo de quimioterapia padrão aos 2 anos de idade, recebeu uma dose de 10 Gy de radiação no corpo todo e transplante de medula óssea dois anos após o diagnóstico. Nove anos após a irradiação, todos os dentes exibiram distúrbios de desenvolvimento de raízes e as coroas dos pré-molares e segundo molar apresentaram-se menores que o normal, sendo observada também hipoplasia no terço cervical do segundo pré-molar, o que corresponde à

região que estava em formação no momento da radioterapia. Foi possível observar que a radioterapia induziu mudanças quantitativas e qualitativas durante a formação dentária.

Takinami *et al.* (1994) relataram um caso clínico de uma criança que aos 7 meses de idade foi diagnosticada com higroma cístico, que se estendia da nasofaringe ao mediastino. Inicialmente foi realizada radioterapia com cobalto 60, sendo 24 Gy na região de cabeça e pescoço e 45 Gy no mediastino. Aos 4 anos de idade, foi observada em radiografias panorâmica e periapicais, hipoplasia nas raízes dos caninos e molares decíduos e dos incisivos e molares permanentes, além da ausência dos pré-molares.

Merino *et al.* (1998) relataram um caso clínico de uma criança de 8 anos de idade, que aos 20 meses, apresentou fibrossarcoma na região submandibular. Aos 23 meses de idade foi realizada cirurgia para remoção do tumor e aos 3 anos de idade foi realizada quimioterapia e radioterapia com 27 Gy de radiação X. Foi possível observar clinicamente a presença de cáries e, nas radiografias panorâmica e periapicais, observou-se marcante encurtamento das raízes dentárias e alterações de forma das coroas dos pré-molares antes da erupção. Os autores concluíram que os dentes que estão em formação durante o período do tratamento radioterápico e quimioterápico estão mais susceptíveis a sofrerem danos.

Bang *et al.* (2002) realizaram um estudo utilizando ratas grávidas submetidas a doses de 0,5; 1; 2 e 4 Gy de radiação gama 11,5 dias após a concepção, com o objetivo de avaliar os efeitos da radiação nos fetos. As ratas foram sacrificadas aos 18 dias de gestação e os fetos foram avaliados. Quanto maior a dose de radiação, maior a incidência das malformações. As anomalias mais encontradas foram fissuras palatinas, dilatação do ventrículo cerebral, anormalidades nas extremidades, como cauda, principalmente nas doses mais elevadas, como 4 Gy.

Manzi, em 2005, avaliou o efeito da radiação ionizante no desenvolvimento dentário de ratos. Para isso, foram utilizadas 21 ratas divididas em sete grupos de forma aleatória. O ciclo estral das ratas para avaliação do seu período fértil foi determinado por meio de

esfregaço vaginal diário. O primeiro dia de gestação foi determinado pela presença do plug vaginal e visualização de espermatozóides em outro esfregaço vaginal. A região abdominal das ratas dos grupos nomeados de Lâmina 1 e Lâmina 4 foi irradiada aos 13 dias de gestação com doses de 1 Gy e 4 Gy de radiação X, respectivamente. Nessa fase, os primeiros molares dos embriões se encontravam no estágio de lâmina. Utilizando as mesmas doses de radiação, os grupos Broto 1 e Broto 4 foram irradiados aos 16 dias de gestação e os animais dos grupos Sino 1 e Sino 4 aos 19 dias, correspondendo assim aos estágios de broto e sino, respectivamente. O grupo controle foi formado por animais não irradiados. Após 30 dias do nascimento, foram sacrificados 3 filhotes de cada ninhada para avaliação. Pela análise dos resultados, a radiação promoveu efeito deletério nas dimensões oclusais dos molares em desenvolvimento, em todos os estágios estudados na dose de 4 Gy, principalmente no estágio de sino, assim como na dose de 1 Gy.

Lopes *et al.* (2006) avaliaram em radiografias panorâmicas a presença de mudanças morfológicas dentais em crianças com câncer, que foram submetidas à quimioterapia ou associação de quimioterapia e radioterapia. As 137 crianças que participaram da pesquisa foram divididas em dois grupos de acordo com o tipo de neoplasia maligna: grupo 1, do tipo linfoproliferativa e grupo 2, do tipo tumores sólidos. Em seguida, foram subdivididos em dois subgrupos de acordo com a idade: 0-6 anos e 7-12 anos e, finalmente, distribuídos em outros dois grupos de acordo com o tratamento, quimioterapia e associação de quimioterapia e radioterapia. Foram encontradas nos pacientes microdontia, macrodontia, taurodontia, hipodontia, dentes com raízes curtas ou com volume aumentado. A anormalidade dentária mais encontrada foi a taurodontia, em crianças menores que cinco anos, que receberam quimioterapia associada à radioterapia. Os autores concluíram que essas anomalias podem estar diretamente relacionadas com a idade em que o tratamento foi realizado e intensidade da dose de quimioterapia e radioterapia.

Niehoff *et al.* (2008) estudaram a ação de dose única de 20 Gy de radiação por braquiterapia nos ossos e dentes da mandíbula de ratos. Os animais foram divididos em dois grupos experimentais: grupo 1, não irradiado e grupo 2, irradiado. Para a realização da

radioterapia, foi implantado um tubo aplicador de plástico ao longo da cortical direita vestibular da mandíbula, após a radioterapia, o tubo foi removido. Os animais foram sacrificados cem dias após a irradiação. Foi possível observar nos resultados alopecia e redução no crescimento dos dentes do lado irradiado. Nenhum desses sinais foi observado do lado oposto ao irradiado. A diferença entre os lados direito e esquerdo dos animais irradiados era visível, mas não significativa. Somente a espessura do côndilo do lado esquerdo apresentou-se significativamente maior que o côndilo do lado direito irradiado.

Rodrigues *et al.* (2009) relataram um caso clínico de um paciente do sexo masculino de 15 anos de idade, que relatou história de rabiomiossarcoma na mandíbula, diagnosticado aos 18 meses de idade. O tratamento consistiu em remoção de metade do tumor, irradiação de 5400 cGy e quimioterapia. O exame extrabucal revelou micrognatia mandibular acentuada. No exame intrabucal foram observados defeitos de desenvolvimento do esmalte, mobilidade dentária e microdontia. Nas radiografias panorâmica e periapicais, foram observadas agenesia dentária, raízes extremamente curtas e em formato cônico e hipoplasia de esmalte nos dentes inferiores. Os autores concluíram que a gravidade dos distúrbios do paciente em estudo deve ser devido principalmente à dose de radiação usada na radioterapia e à sua idade precoce na época do tratamento e que, embora o paciente tenha sido submetido também a quimioterapia, os efeitos, como micrognatia mandibular e encurtamento radicular, restritos ao arco inferior, resultaram de efeitos locais da radioterapia.

Em 2009, Kaste *et al.* avaliaram os impactos da radioterapia e quimioterapia nos riscos de anormalidade dental em pacientes sobreviventes de câncer na infância. A dose de radiação e dos agentes quimioterápicos utilizados variou de acordo com o tipo de câncer de cada paciente. Foram encontrados nos pacientes microdontia, hipodontia, desenvolvimento anormal das raízes dentárias, hipoplasia de esmalte e aumento da frequência de xerostomia. Os autores concluíram que pacientes submetidos à radioterapia e quimioterapia com menos de 5 anos de idade e que utilizam particularmente doses acima de 20 Gy de radiação devem ser monitorados pois apresentam alto risco de desenvolverem anormalidade dental.

Ramos-Perez (2009) avaliou a taxa de erupção dentária, a birrefringência da matriz orgânica do esmalte, a morfologia dos tecidos odontogênicos e a ultraestrutura do ameloblasto secretor em incisivos de ratos submetidos a altas doses de radiação X. Para isso foram utilizados sessenta ratos machos, sendo trinta divididos em três grupos experimentais: Controle, Irradiado 15Gy e Irradiado 25Gy. A mensuração da taxa de erupção dentária foi realizada a cada dois dias, perfazendo o tempo total do experimento (seis dias e meio). Para birrefringência, mediu-se o valor do retardo óptico da área de maior brilho utilizando microscópio de polarização. Para avaliação da morfologia dos tecidos odontogênicos e ultraestrutura celular, foi realizada análise descritiva. Foi possível observar, nos grupos irradiados, uma redução significativa da taxa de erupção a partir do quarto dia. Uma diminuição no brilho de birrefringência foi encontrada nos grupos irradiados em relação ao controle, porém essa só foi significativa para o grupo Irradiado 25Gy. A avaliação dos tecidos odontogênicos revelou, no grupo controle, região odontogênica com aspecto de normalidade e camada de odontoblastos e ameloblastos preservados. Baseado nesses resultados foi concluído que altas doses de radiação X foram capazes de retardar a erupção dentária a partir do quarto dia; reduzir a birrefringência da matriz orgânica do esmalte na fase de secreção da amelogênese; alterar significativamente a morfologia dos tecidos odontogênicos e causar agressão, modificando a ultraestrutura celular.

### **2.3 Selenito de Sódio**

Hafeman *et al.* (1974) investigaram a relação entre dieta com ingestão de selenito de sódio e a atividade da glutathiona peroxidase em eritrócitos e fígado de ratos. Para isso, foram realizados dois experimentos. No primeiro, os ratos foram divididos em seis grupos nos quais à dieta foram adicionados 0; 0,05; 0,1; 0,5; 1 e 5 ppm de selenito de sódio, sendo cada concentração de selênio para um grupo. No segundo experimento, os ratos foram submetidos a uma dieta com deficiência de selenito de sódio durante nove meses; após esse tempo, os animais foram divididos em quatro grupos, que foram submetidos a uma dieta

com as seguintes concentrações de selenito: 0; 0,1; 0,5 e 5 ppm. No experimento 1, foi observado que o selenito de sódio teve grande influência na atividade da glutathione peroxidase nos eritrócitos. O efeito do selenito de sódio no fígado foi mais pronunciado, com maior atividade da glutathione peroxidase no grupo com 1 ppm de selenito de sódio. Foi observado no segundo experimento que, antes da administração do selenito, os ratos apresentaram uma deficiência na atividade da glutathione peroxidase. Nos eritrócitos, após a adição do selenito de sódio, o aumento da atividade da enzima foi maior no grupo com 5 ppm de selenito.

Thomson & Stewart (1974) realizaram uma pesquisa para avaliar a qualidade nutricional do selênio em indivíduos da Nova Zelândia. Participaram da pesquisa três jovens mulheres que receberam uma dose oral de aproximadamente 10  $\mu\text{gCi}$  [ $^{75}\text{Se}$ ] selenito de sódio, contendo não mais que 10  $\mu\text{g}$  de selênio. Após a ingestão do selenito, foi realizada a coleta de urina, fezes, amostra de sangue, mensuração da excreção respiratória, da perda dérmica, da radioatividade do corpo todo e dos órgãos. Os resultados mostraram que o selenito de sódio foi rapidamente excretado pela urina no primeiro dia, sendo a maior taxa de excreção de 0,4-1,4% dose/dia dentro das duas primeiras horas. A excreção urinária do selenito foi diminuindo gradualmente durante a pesquisa e, nas semanas 16-20, os valores foram de 0,06-0,08% dose/dia. A excreção fecal teve seu valor máximo nos quarto e quinto dias. Os valores para a retenção de selenito no organismo foram determinados pela mensuração da excreção urinária e fecal que variaram entre 38 e 60% da dose no dia 7 e de 35 a 53% no dia 14. Os autores concluíram que a absorção do selenito de sódio variou consideravelmente entre as três voluntárias e esses valores foram bem menores que a média de absorção em ratos (92% da dose).

Lawrence & Burck (1976) afirmaram que a glutathione peroxidase está diretamente ligada à dieta com selênio e que dietas deficientes de selênio diminuam a atividade dessa enzima. Em seu estudo, foram utilizados ratos divididos em dois grupos: um com dieta deficiente de selênio e o outro com adição de 0,5 mg/kg de peso corpóreo do animal de selenito de sódio. Foi observado que a atividade da enzima glutathione peroxidase em

relação ao peróxido de hidrogênio e hidroperóxido em ratos com dieta deficiente de selenito de sódio foi de 8% e 42% em relação ao grupo com selenito, respectivamente.

Patterson *et al.* (1989) desenvolveram um modelo que descreve a cinética do metabolismo do selenito de sódio em humanos. Para isso, foram obtidas amostras de plasma, urina e fezes de seis voluntários depois de uma dose oral única de 200 µg de selenito de sódio. Foi observado que o selenito é rapidamente absorvido pelo plasma em 30 minutos e rapidamente excretado pela urina, sendo seu pico entre 2 e 4 horas. O selenito de sódio também é excretado pelas fezes e, em humanos, é excretado em maior quantidade pela bile e suco pancreático do que em ratos. A máxima concentração do selenito ocorre entre 9 e 14 horas após a administração. Foi verificado também que, após 90 dias da administração do selenito, aproximadamente 65% foi excretado, sendo 38% pela urina e 27% pelas fezes e aproximadamente 35% da dose foi retida no organismo, principalmente nos tecidos.

Yan & Spallholz (1993) avaliaram a capacidade de formação do ânion superóxido e/ou o peróxido do hidrogênio a partir da reação de quatro compostos de selênio quimicamente diferentes, dentre eles o selenito de sódio, com a glutathione e outros tióis na ausência e presença de células de tumores mamários. A produção de radicais livres foi mensurada pela quimioluminescência. Foi observado que o selenito de sódio é mais reativo com a glutathione do que os outros compostos de selênio, para produzir superóxidos e a quimioluminescência aumentou na presença de células tumorais de mama. Os autores concluíram que a dieta com componentes de selênio em excesso causa oxidação da glutathione e de outros tióis com a produção de radicais superóxidos e peróxido de hidrogênio.

Em 1995, Groenbaek *et al.* examinaram o efeito do selenito de sódio no crescimento, nos fatores de crescimento de insulina e de proteína em ratos, visto que, segundo os autores, embora o selênio seja um micronutriente essencial, em altas doses ele pode ser tóxico, causando vários sintomas, incluindo retardo no crescimento. Para isso, os

animais foram divididos em três grupos: o grupo A, tratado com uma dose de 3,3 mg/l de selenito de sódio diluído em água; o grupo B, o controle, e o grupo C, tratado com a metade da dose de selenito em relação ao grupo A. O peso corpóreo e a ingestão da comida dos animais foram registrados e o comprimento do rabo e da tíbia foram mensurados após a dissecação do animal para a obtenção dos rins e fígado. Os fatores de crescimento foram determinados nos dias 0, 14 e 35. Os resultados mostraram que o peso corpóreo dos animais tratados com alta dose de selenito foi significativamente mais baixo comparado com os grupos B e C. O comprimento da tíbia em ratos tratados com selenito de sódio, assim como os pesos dos rins foram menores. Foi observado também que houve uma diminuição dos fatores de crescimento do grupo tratado com dose maior de selenito em relação aos grupos B e C. Os autores concluíram que o selenito de sódio leva a um retardo do crescimento, acompanhado por níveis reduzidos dos fatores de crescimento.

Wilson *et al.* (1997) avaliaram a farmacocinética do selenito de sódio em patos. Para isso, foram aplicados nesses animais 160-190  $\mu\text{Ci}$  de selênio. Foram utilizados cinco animais por grupo, que eram determinados de acordo com o tempo em que os níveis de selenito nos tecidos eram mensurados: 15 min, 1, 4, 12 e 24 horas após a injeção. Os tecidos analisados incluíram o fígado, rim, pâncreas, coração, pulmão, baço, cérebro, ovário e plasma sanguíneo, nos quais foi encontrado acúmulo de selenito de sódio, sendo que o cérebro teve um acúmulo contínuo durante o período de tempo estudado e o ovário mostrou uma concentração bastante elevada em relação aos outros órgãos em 24 horas, sugerindo que o acúmulo de selenito de sódio em altos níveis pode levar a efeitos teratogênicos durante o desenvolvimento do embrião.

Saito *et al.* (2003) avaliaram a morte das células humanas causadas pela deficiência de selenito de sódio. Quando os meios de cultura estavam deficientes de selenito, foi observada a diminuição da quantidade de células; com 24 horas e com 60 horas, foi observada uma perda de 95%, em contraste com células cultivadas em meio contendo 100 nM de selenito de sódio, que não mostrou perda significativa. Foi observado também que a atividade da glutathiona peroxidase e a tioredoxina redutase foi reduzida em 36% e 39%,

respectivamente, em meio deficiente de selenito após 24 horas. Os autores concluíram que a deficiência de selenito de sódio diminuiu a atividade das selenoenzimas, aumentou a peroxidação lipídica nas membranas e induziu a morte celular. Esses resultados indicam que as espécies oxigênio reativas, especialmente hidroperóxidos lipídicos, estão envolvidas nas mortes celulares causados por deficiência de selênio.

Segundo Jacobson *et al.* (2006), muitas análises têm investigado a atividade da glutathiona peroxidase, mas existem poucos relatos dos métodos de determinação dessa enzima no plasma e sua relação com o selênio no plasma. Participaram dessa pesquisa 170 adultos selecionados aleatoriamente, dos quais foram coletadas amostras de sangue. Em laboratório, o plasma foi colhido e foram realizadas as análises ELISA, ICP-MS e eletroforese, a fim de determinar a atividade da glutathiona peroxidase e selênio no plasma. Foi observado que a glutathiona peroxidase do plasma estava associada com os níveis de selênio no plasma. A enzima foi maior em homens que em mulheres e mais baixa em fumantes que em não e ex-fumantes. Baseados nos resultados, os autores concluíram que, embora haja uma considerável variabilidade de glutathiona peroxidase entre os pacientes, a enzima do plasma está correlacionada com o selênio.

Amara *et al.*, em 2010, investigaram os efeitos do selênio na disfunção renal induzida pelo metimazol em ratos adultos e seus filhotes. Os animais foram divididos aleatoriamente em quatro grupos experimentais: grupo 1, que serviu como controle; grupo 2, que recebeu somente metimazol; grupo 3, que recebeu metimazol e 0,5 mg/kg de selenito de sódio e grupo 4, que recebeu somente selenito de sódio. Os tratamentos foram iniciados no 14º dia de gestação até 14 dias após o nascimento dos filhotes, quando os animais foram sacrificados. Foram observadas nos resultados alterações marcantes na função renal dos animais do grupo 2. O peso corporal e renal, tanto dos filhotes quanto das mães desse grupo, foi diminuído quando comparado com os animais do grupo controle; além disso, a atividade das enzimas antioxidantes, como a glutathiona peroxidase também diminuiu. A administração do selênio melhorou os parâmetros acima citados, assim como, o aspecto histológico dos rins dos animais, apresentando-se similares ao controle. Os autores

concluíram que o selênio é um elemento importante de proteção, que pode ser usado como um suplemento dietético contra disfunção renal.

## **2.4 Ação Radioprotetora do Selenito de Sódio**

Cekan *et al.* (1985) avaliaram o efeito radioprotetor do selênio contra malformações induzidas pela radiação ionizante em ratos. Para isso, os grupos de animais receberam 0,5 mg/kg de selenito de sódio via intraperitoneal 30 minutos e 2 horas antes da irradiação. Os ratos foram submetidos a uma dose de 1,75 Gy de radiação no corpo todo no nono dia de gestação. Foi observado que a dose de selenito usada não causou morte ou qualquer sinal clínico aparente de intoxicação por selênio nas ratas mães durante todo o experimento. Observou-se também que a irradiação em ratas grávidas resultou em uma diminuição significativa do número de fetos sobreviventes e o pré-tratamento dos animais com selenito 2 horas antes da irradiação diminuiu o número de fetos malformados, porém nenhuma mudança no número e tipo de malformações foi observada quando o selenito foi administrado 30 minutos antes da irradiação.

Rafferty *et al.* (1998) afirmaram que a geração de espécies de oxigênio reativa tem sido apontada como parte do mecanismo responsável pelos danos na pele, induzidos pela radiação ultravioleta (UVB). Os autores se propuseram a avaliar o efeito radioprotetor do selênio em queratinócitos e melanócitos contra efeito letal da radiação UVB. Nas culturas de células às quais as formas de selênio não foram adicionadas, houve morte de 80% das células 48 horas após a irradiação com uma dose de 960 J/m<sup>2</sup>. A adição do selenito e da selenometionina antes da exposição ao UVB preveniu as mortes celulares, sendo o efeito radioprotetor diferente entre os dois compostos. A proteção efetiva do selenito de sódio foi vista em uma dose de 10 nM e nenhum efeito protetor significativo da selenometionina foi observado abaixo desse valor, sua máxima proteção foi encontrada com 50 nM. Os melanócitos apresentaram-se mais sensíveis do que os queratinócitos à radiação UVB, sua proteção máxima foi realizada com selenito de sódio e selenometionina em concentrações de 10 nM e 100 nM respectivamente. Quando o selenito e a selenometionina foram

adicionados aos queratinócitos após a exposição, a proteção não foi tão eficiente quanto àquela em que o selênio foi adicionado às células 24 horas antes da exposição ao UVB. Os resultados sugeriram que a forma inorgânica do selênio como o selenito de sódio pode ser mais potente em promover proteção contra UVB do que a forma orgânica como a selenometionina.

Em 1999, Stewart *et al.* compararam três compostos de selênio (Se); o selenito de sódio, a selenocistamina e a selenometionina em relação à citotoxicidade, à atividade da enzima glutathiona peroxidase, à radioproteção e à apoptose em cultura de células queratinócitos de ratos. As culturas de células foram previamente tratadas com os compostos de selênio e após 24 horas as análises foram realizadas. Dos três compostos, o selenito de sódio produziu maior citotoxicidade, induzida com concentração de Se acima de 10µg Se/ml. Foi observado também que os três derivados de selênio testados aumentaram a atividade da glutathiona peroxidase e protegeram as células contra lesões oxidativas no DNA induzidas pela exposição à radiação ultravioleta. Quanto à apoptose, o selenito de sódio causou o maior índice, enquanto que não houve indução de apoptose por parte da selenometionina em comparação às células controle.

Mutlu-Turkoglu *et al.* (2000) avaliaram o efeito do pré-tratamento com selenito de sódio, vitamina E e selênio mais vitamina E antes da irradiação do intestino de ratos. Os animais foram irradiados com uma dose de 10 Gy de radiação X e, três dias depois, uma parte do intestino delgado foi removida para avaliação. Foi observado que o pré-tratamento com selênio e/ou vitamina E preveniu parcialmente a diminuição do número e tamanho das vilosidades intestinais, aumentou os níveis de glutathiona significativamente, reduziu a atividade de superóxidos e que houve um aumento na atividade da glutathiona peroxidase exceto nos grupos tratados apenas com vitamina E. Esses resultados sugeriram que o tratamento antes da irradiação principalmente com selênio mais vitamina E, teve algum efeito protetor contra as injúrias intestinais induzidas pela radiação.

Rafferty *et al.* (2003) avaliaram o efeito protetor do selenito de sódio e selenometionina em culturas de queratinócitos contra apoptose induzida pela radiação ultravioleta. Os queratinócitos foram incubados em selenito de sódio e selenometionina com concentrações entre 1 nM e 1  $\mu$ M 24 horas antes das exposições à 600 J/m<sup>2</sup> de radiação ultravioleta. O selênio diminuiu a apoptose induzida por radiação ultravioleta. A concentração de selenito de sódio que diminuiu a quantidade de células apoptóticas variou entre 10 nM e 1  $\mu$ M, dando maior proteção entre 100 e 200 nM; e para a selenometionina a proteção contra a apoptose foi realizada com concentração acima de 50 nM. A partir dos resultados, foi concluído que os compostos de selênio preveniram a apoptose induzida pela radiação ultravioleta em culturas de queratinócitos.

Schueller *et al.* (2004) avaliaram o efeito radioprotetor do selenito de sódio em células tumorais expostas a altas, porém não tóxicas, concentrações de selênio. Primeiramente, foi mensurada a toxicidade do selenito para determinar a concentração máxima tolerável, que foi de 3,6  $\mu$ M. Essa concentração foi definida de modo que nenhuma morte ou dano visível pudesse ser detectado nas células por uma observação em microscópio. As células foram cultivadas em quatro concentrações não tóxicas de selenito (0, 2, 3 e 3,6  $\mu$ M) por 14 dias; em seguida, elas foram submetidas à radiação gama com cobalto 60 com doses de 0, 2, 5, 10, 15 e 20 Gy. Foi observado que, com doses acima de 2 Gy de radiação, menores quantidades de células sobreviveram e que células irradiadas expostas à concentração de selenito aumentada mostraram uma menor eficiência de plaqueamento. Esses resultados sugeriram um efeito radiosensibilizante do selenito de sódio nas células tumorais em concentrações de 2 a 3  $\mu$ M.

Em estudo realizado por Sagowski *et al.*, em 2004, para avaliar o efeito da amifostina e selenito de sódio na radiosensibilidade de tumor experimental e a influência das drogas na constituição geral dos ratos durante a radioterapia, foram utilizados 66 ratos com tumores. Desses, 6 eram controle e 60 foram divididos em 4 grupos. Os animais do grupo 1 foram apenas irradiados; os do grupo 2 foram irradiados e receberam amifostina; os animais do grupo 3 foram irradiados e receberam selenito de sódio e os do grupo 4 foram

irradiados e receberam as duas drogas. A dose de selenito de sódio recebida pelos animais foi 15 µg Se/kg de peso corpóreo. Essas drogas foram administradas 30 minutos antes de cada irradiação, que foram doses fracionadas, com um total de 60 Gy de radiação gama. Foram observados nos resultados que a irradiação inibiu o crescimento do tumor e os radioprotetores não aumentaram a frequência de formação de metástase. Em relação ao peso corpóreo dos ratos, esse não foi tão afetado pelo selenito mostrando sua menor toxicidade em relação ao outro radioprotetor, e o efeito radiosensibilizante do selenito de sódio foi menor, quando comparado com o grupo apenas irradiado, porém não diferiu estatisticamente. Os autores concluíram que a aplicação de amifostina e selenito de sódio antes da irradiação não teve influência na radiosensibilidade dos tumores.

Tuji *et al.*, em 2005, avaliaram a ação radioprotetora do selenito de sódio no processo de reparação tecidual. Para isso, utilizaram 50 ratos machos, nos quais foram realizadas feridas na região dorsal e, em seguida, foram divididos em quatro grupos experimentais: controle, selênio, irradiado e selênio irradiado. Os grupos selênio e selênio irradiado receberam 2 mg/kg de peso de selenito de sódio 48 horas após a cirurgia e apenas os grupos irradiado e selênio irradiado receberam uma dose única de 6 Gy de radiação. Os animais foram sacrificados nos tempos de 4, 7, 13 e 21 dias e avaliados por meio de análise morfológica, histoquímica e birrefringência do tecido. Foi possível observar, por essas análises, intenso retardo no processo de reparação tecidual desde o quarto dia provocado pela radiação, bem como o efeito radioprotetor do selênio, concluindo que o selenito de sódio apresentou-se como eficaz radioprotetor, visto que o processo de reparação no grupo selênio irradiado comportou-se, histologicamente, semelhante ao grupo controle.

Sendo a radiação ionizante causadora de efeitos deletérios no processo de reparação tecidual e o selênio um agente antioxidante que atua contra radicais livres no organismo, Rocha (2005) avaliou o efeito radioprotetor do selenito de sódio no processo de reparação óssea em tíbias de ratos. Para isso, foram utilizados 100 ratos divididos em 4 grupos: controle, selênio, irradiado e selênio irradiado. Foram produzidos defeitos ósseos nas tíbias dos animais (3 dias antes da irradiação) e administrado 1 mg Se/kg de peso corpóreo do

animal de selenito de sódio em ratos dos grupos selênio e selênio irradiado, sendo que esse último foi realizado 15 horas antes da irradiação com uma dose de 8 Gy de radiação gama. As peças contendo defeitos ósseos foram obtidas 7, 14, 21, 28 e 45 dias após a cirurgia. Foi observado que, aos 7 e 14 dias, o grupo selênio irradiado apresentou o processo de reparação óssea atrasada em relação ao controle, indicando a não proteção do selênio para esses tempos; já nos dias 21 e 28 dias, o grupo irradiado apresentou-se atrasado em relação aos demais e o padrão de reparação óssea do selênio irradiado foi bastante semelhante ao do grupo controle, mostrando-se como eficaz radioprotetor na reparação óssea em tíbias de ratos, apesar da toxicidade inicial do selenito.

Sagowski *et al.* (2005) realizaram uma pesquisa para avaliar o efeito radioprotetor do selenito de sódio em glândulas salivares de ratos durante irradiação fracionada. Selenito de sódio (15 µg Se/kg de peso corpóreo) foi administrado nos animais 30 minutos antes da irradiação com uma dose de 60 Gy de cobalto 60 fracionada. Com a aplicação da dose de 16 Gy, foi observado edema intracelular nas células acinares, com maior progresso com a aplicação de uma dose de 30 Gy, mostrando também vacuolização; com a dose de 60 Gy, ocorreu necrose das células acinares, que foram reduzidas de 75% no grupo controle para 30% no grupo com adição de selenito. A administração do selenito de sódio atrasou o desenvolvimento dos danos descritos. De acordo com os resultados encontrados, o selenito de sódio pareceu ser um potente radioprotetor de glândulas salivares.

Em 2007, Neves avaliou o efeito radioprotetor do selenito de sódio no processo de reparação óssea em alvéolos de ratos. Para isso, foram utilizados 100 ratos divididos em 4 grupos: controle, selênio, irradiado e selênio irradiado. Foram realizadas exodontias dos incisivos superiores dos animais 3 dias antes da irradiação e administrado 0,5 mg Se/kg de peso corpóreo do animal de selenito de sódio em ratos dos grupos selênio e selênio irradiado, sendo que essa administração foi realizada 24 horas antes da irradiação com uma dose de 15 Gy. As peças foram obtidas 4, 7, 14, 21 e 28 dias após a cirurgia. Foi observado que o selenito de sódio realizou proteção aos 4, 7 e 14 dias, embora tenha sido discreta.

Freitas (2007) realizou uma pesquisa com o objetivo de avaliar o efeito radioprotetor do selenito de sódio no processo de reparo ósseo em ratas ovariectomizadas submetidas à irradiação. Para isso, oitenta ratas foram submetidas à ovariectomia e divididas em quatro grupos: ovariectomizado, ovariectomizado/selênio, ovariectomizado/irradiado e ovariectomizado/selênio/irradiado. Quarenta dias após, um defeito ósseo foi confeccionado nas tíbias dos animais. Dois dias após essa cirurgia, os animais dos grupos ovariectomizado/selênio e ovariectomizado/selênio/irradiado receberam 0,8 mg Se/Kg de peso corpóreo. No dia seguinte, apenas os animais pertencentes aos grupos ovariectomizado/irradiado e ovariectomizado/selênio/irradiado receberam 10 Gy de radiação X na região dos membros inferiores. Os animais foram sacrificados 7, 14, 21 e 28 dias após a cirurgia. Foi possível observar um atraso no processo de reparo ósseo nos animais do grupo ovariectomizado/irradiado e similaridade entre os grupos ovariectomizado, ovariectomizado/selênio e ovariectomizado/selênio/irradiado, o que demonstrou o efeito radioprotetor do selênio sem toxicidade.

Pontual *et al.*, em 2007, avaliaram o efeito radioprotetor do selenito de sódio nas células secretoras das glândulas submandibulares de ratos, por meio da análise ultra-estrutural. Foram utilizados 57 ratos, divididos em quatro grupos experimentais. Os animais dos grupos irradiado e selênio irradiado foram submetidos a 15 Gy de radiação gama e os animais dos grupos selênio e selênio irradiado receberam 0,5 mg/kg de peso de selenito de sódio 24 horas antes da irradiação. As glândulas foram removidas após 4, 8, 12, 24, 48 e 72 horas da irradiação. Como resultado, foi observado que a radiação causou danos nas células secretoras desde o primeiro tempo de estudo e que o grupo selênio irradiado apresentou maior semelhança com o grupo controle que os outros grupos. Foi concluído que o selenito de sódio apresentou ação radioprotetora nas células secretoras das glândulas submandibulares.

Buntzel *et al.*, em 2010, realizaram uma pesquisa para avaliar se a reposição de selênio diminui os efeitos associados à radiação ionizante em pacientes que apresentam câncer ginecológico e de cabeça e pescoço e se a dose utilizada no paciente é suficiente.

Todos os pacientes que participaram da pesquisa demonstraram diminuição da concentração de selênio no sangue. Esses pacientes foram divididos em dois grupos experimentais: grupo 1, cujos pacientes receberam 500 µg de selenito de sódio nos dias da radioterapia e grupo 2 ou controle, cujos pacientes não receberam selênio. Foram coletadas amostras de sangue antes, na metade, no último dia e seis semanas após o fim da radioterapia, nas quais a concentração de selênio foi mensurada. Foi observada diferença significativa na concentração de selênio somente na metade e no último dia de radioterapia entre os dois grupos estudados. Uma melhora significativa foi observada somente na perda de paladar e na disfagia, devido à reposição de selênio. Nenhuma mudança foi vista em relação à mucosite e à xerostomia. Os autores concluíram que a dose de selênio utilizada foi suficiente para tratar a deficiência de selênio durante a irradiação e minimizar os efeitos deletérios da radiação ionizante.

Tuji *et al.* (2010) realizou uma pesquisa com a finalidade de avaliar ultra-estruturalmente o efeito radioprotetor do selenito de sódio nas células acinares de glândulas parótidas de ratos. Foram utilizados 57 ratos divididos em 4 grupos experimentais: controle, irradiado, selênio e selênio irradiado. Os animais dos grupos selênio e selênio irradiado receberam uma dose de 0,5 mg Se/kg de peso corpóreo do animal e os dos grupos irradiado e selênio irradiado foram submetidos a uma dose de 15 Gy de radiação gama na região de cabeça e pescoço. Após 4, 8, 12, 24, 48 e 72 horas da irradiação, todos os ratos foram sacrificados. Foi observado nos resultados que a radiação causou alterações celulares a partir do grupo de 4 horas. No tempo de 24 horas após a irradiação, ocorreu o início do processo de reparo no tecido glandular, observando-se melhor organização com 48 e 72 horas. O grupo selênio irradiado apresentou menos danos em relação ao grupo apenas irradiado, tendo a reparação tecidual ocorrido mais cedo, mostrando a radioproteção do selenito. Contudo, observou-se que o selenito causou alterações celulares, sendo evidente a partir do tempo de 8 horas, mostrando assim a toxicidade do selenito de sódio, uma vez que essas alterações foram menores que as causadas pela radiação.

### **3 PROPOSIÇÃO**

Diante do fato de que o dente em desenvolvimento pode ser alterado pela exposição à radiação terapêutica nos maxilares e de que o selênio apresenta uma ação radioprotetora, teve-se como objetivo neste trabalho avaliar o efeito do selenito de sódio em molares de filhotes de ratas irradiadas durante a odontogênese.

## **4 MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1 Seleção dos animais**

Foram selecionadas 20 ratas (*Rattus norvegicus*, Albinus, Wistar), fêmeas para indução de gravidez e obtenção de filhotes, totalizando 64 filhotes para estudo. As ratas, procedentes do Biotério Central da Unicamp, apresentavam idade aproximada de 90 dias e média de peso de 250 gramas. Durante a realização da pesquisa, as ratas foram mantidas em gaiolas de policarbonato, em local com temperatura e umidade controladas e com um ciclo alternado de 12 horas claro-escuro. A alimentação das ratas constou de ração balanceada padrão e água *ad libitum*, diariamente. O projeto dessa pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética na Experimentação Animal da Universidade Estadual de Campinas, protocolo nº 1250-1 (Anexo 1).

### **4.2 Avaliação do período fértil das ratas**

Uma vez que os animais a serem avaliados seriam filhotes de ratas irradiadas durante a gestação, era necessário estabelecer o período fértil das mesmas, sendo este determinado por meio de esfregaço vaginal diário. Para isso foi colocada uma pequena quantidade de solução salina no interior da vagina da rata, com o auxílio de uma pipeta, sendo a solução rapidamente aspirada e seu conteúdo transferido para uma lâmina e essa imediatamente observada por meio de microscopia óptica (Figuras 1 e 2).

O período do ciclo estral é ideal para investigar as mudanças ocorridas no ciclo reprodutivo. Esse ciclo tem duração média de 4 a 5 dias e é caracterizado por quatro fases distintas: Proestro, Estro, Metaestro e Diestro, as quais podem ser determinadas pelos tipos celulares observados no esfregaço vaginal (Figura 3). Na fase proestro, são observadas células epiteliais nucleadas e pequeno número de leucócitos. Na fase estro, período mais curto do ciclo, são visualizadas basicamente células epiteliais anucleadas queratinizadas da

camada córnea, sendo a fase mais fértil da rata. Na fase metaestro, observa-se novamente a presença de leucócitos e algumas células epiteliais anucleadas remanescentes. Na fase diestro, período mais longo do ciclo, observa-se muitos leucócitos e algumas células epiteliais nucleadas.



Figura 1: Esfregaço vaginal por meio de introdução de solução salina no interior da vagina da rata.

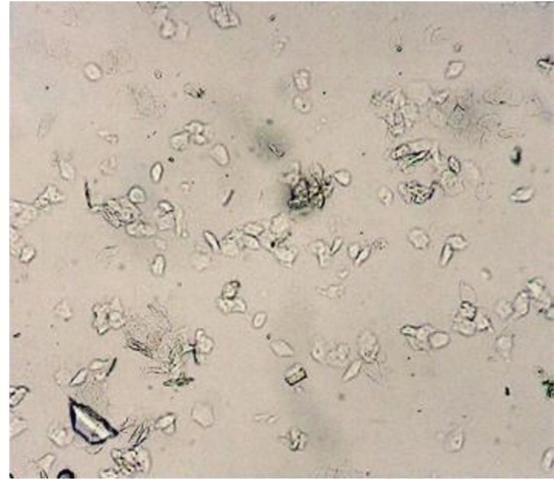


Figura 2: Visualização de células epiteliais anucleadas no esfregaço vaginal, caracterizando a fase estro.

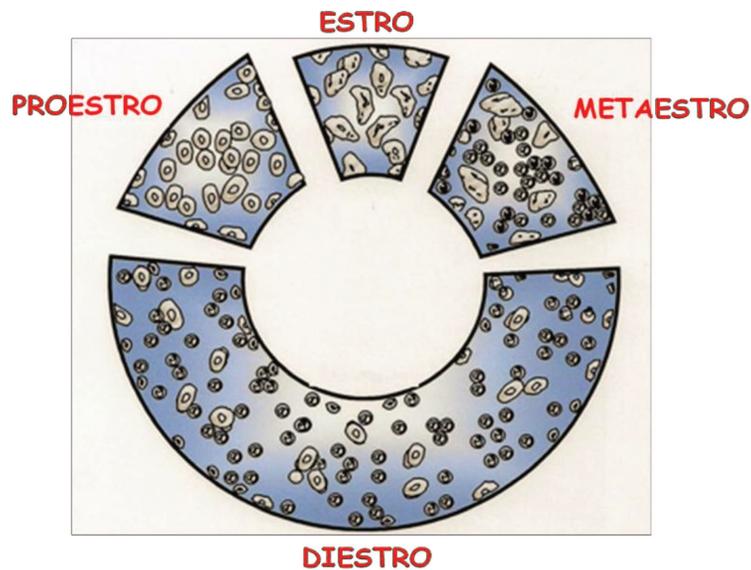


Figura 3: Ciclo Estral

Uma vez comprovado o período fértil (Fase Estro), as ratas foram isoladas em gaiolas individuais com um macho para a realização do coito, durante o período noturno. Ao amanhecer, o primeiro dia de gestação foi determinado pela presença do tampão vaginal (Figura 4), além da visualização de espermatozóides em outro esfregaço vaginal (Figuras 5A e 5B).

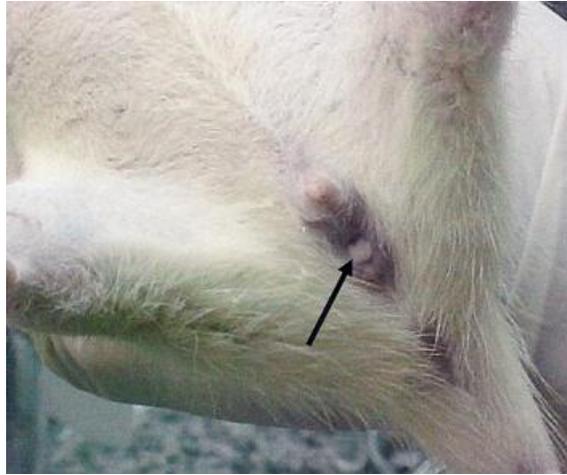


Figura 4: Visualização do tampão vaginal (indicado pela seta).

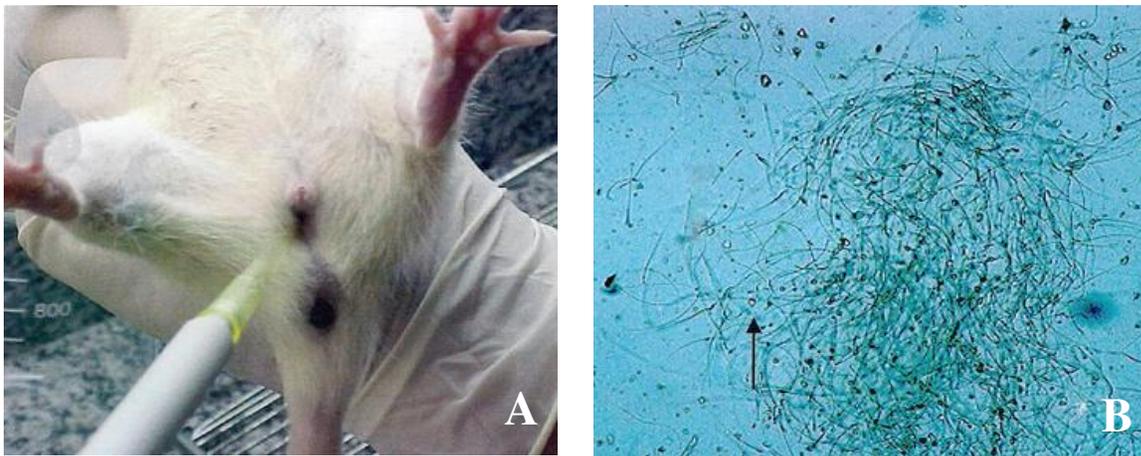


Figura 5: Esfregaço vaginal (A) e visualização de espermatozóides no dia seguinte ao acasalamento (B).

### **4.3 Grupos experimentais**

As ratas grávidas foram divididas em quatro grupos experimentais:

- Grupo Controle: formado por animais que não receberam selenito de sódio e nem foram irradiados.
- Grupo selênio: grupo de animais tratados com selenito de sódio aos 18 dias de gestação.
- Grupo irradiado: grupo de animais expostos à radiação X na região de abdômen aos 19 dias de gestação.
- Grupo selênio/irradiado: grupo de animais tratados com selenito de sódio e expostos à radiação X na região de abdômen.

### **4.4 Administração de Selenito de Sódio**

Aos 18 dias de gestação, os animais pertencentes aos grupos selênio e selênio irradiado receberam 0,3 mg Se/kg de peso corpóreo de selenito de sódio (Merck KgaA, Darmstadt, Germany) via intraperitoneal (Figuras 6 e 7). Nos animais dos grupos controle e irradiado, foi administrada água destilada (4 ml/kg), utilizada para dissolução do selenito nos outros dois grupos. A administração de água destilada ocorreu para que os animais fossem submetidos aos mesmos estímulos e situações de estresse que os animais que receberam selênio, sendo que a dose de água foi em quantidade equivalente aquela utilizada para dissolução do selenito de sódio.

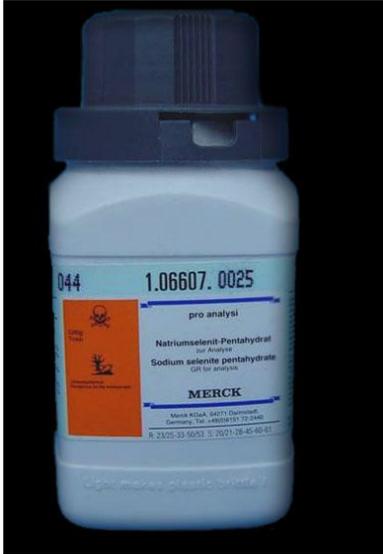


Figura 6: Selenito de Sódio Pentahidratado (pró-análise).



Figura 7: Aplicação da solução de selenito de sódio intraperitonealmente.

## 4.5 Irradiação

Aos 19 dias de gestação, as ratas pertencentes aos grupos irradiado e selênio irradiado foram submetidas a uma dose única de 4 Gy de radiação X. A irradiação foi realizada em um acelerador linear, da marca Varian, modelo Clinic 6/100 com distância focal de 100 cm (Figura 8). O campo de colimação foi de 18x18 cm, sendo incluída nesse campo, exclusivamente a região de abdômen dos animais (Figura 9).

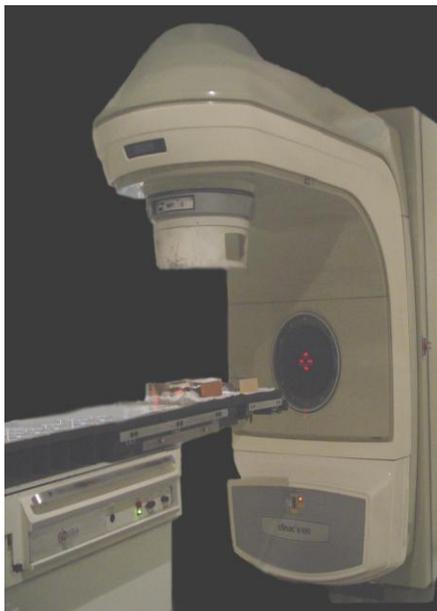


Figura 8: Aparelho de radioterapia utilizado para a irradiação dos



Figura 9: Animais posicionados para exposição à radiação na região abdominal.

O 19º dia, no qual as ratas foram irradiadas correspondeu à fase de sino da odontogênese, ou fase de morfodiferenciação (Figura 10).



Figura 10: Visualização histológica da fase de sino.

## **4.6 Sacrifício dos animais**

Os filhotes das ratas foram sacrificados nos tempos de 3, 4 e 30 dias após o nascimento, com cinco animais por grupo nos tempos de 3 e 4 dias e seis filhotes por grupo no tempo de 30 dias.

## **4.7 Avaliação dos dentes molares de ratos**

### **4.7.1 Análise da birrefringência da matriz orgânica do esmalte**

Após 3 e 4 dias de nascimento, foram sacrificados cinco filhotes de cada grupo e em cada tempo de estudo, totalizando assim, vinte filhotes por tempo de estudo. Nesse período os primeiros molares inferiores estão em síntese ativa de secreção da matriz orgânica de esmalte. Os animais foram sacrificados por decaptação, as hemimandíbulas foram removidas e imediatamente fixadas em mistura de paraformaldeído 10% e glutaraldeído 0,5% tamponado. Após fixação, as peças foram descalcificadas em EDTA (Ácido etilenodiaminotetracético) 4,13%, incluídas em Paraplast Plus e foram obtidos cortes longitudinais de 5 µm de espessura utilizando um micrótomo (Leica RM 2155), de acordo com o protocolo estabelecido pela Disciplina de Histologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba-UNICAMP. Os cortes foram montados em lâminas e a birrefringência foi analisada por um microscópio de luz polarizada (Figura 11), utilizando-se como meio de embebição glicerina 80% (Espírito Santo *et al.*, 2006).

A birrefringência é uma propriedade anisotrópica que reflete alto grau de organização em nível molecular; esse fenômeno é causado pela diferença entre dois índices de refração de uma substância. Quando a luz polarizada atravessa estruturas birrefringentes, como a matriz orgânica do esmalte secretório, ela se propaga como duas frentes de onda, o desvio relativo entre essas duas frentes é denominado de retardo óptico, que é expresso em nanômetros, sendo diretamente proporcional à intensidade do brilho de birrefringência

(Espírito Santo *et al.*, 2007). O retardo óptico foi medido na área de maior brilho de birrefringência da matriz orgânica do esmalte no estágio de secreção da amelogênese, utilizando-se o compensador de Brace-Koeler. Esse procedimento foi realizado 20 vezes em 5 lâminas de cada animal de modo a se obter uma média. O retardo óptico da birrefringência foi comparado entre os 4 grupos.



Figura 11: Microscópio Leica DMLP

#### **4.7.2 Análise morfológica da coroa**

Após 30 dias do nascimento dos filhotes dos quatro grupos experimentais, foram sacrificados, por aprofundamento anestésico, seis filhotes de cada grupo experimental para a avaliação morfológica dos primeiros molares. As maxilas e mandíbulas do lado direito foram removidas e imersas no fixador formol 10% por 48 horas. A seguir, as amostras foram dissecadas com um pequeno osteótomo para desidratação com acetona em concentrações crescentes e a secagem em estufa a 37°C. Após a secagem, essas maxilas e mandíbulas foram montadas em porta-espécimes (stubs) e levadas ao metalizador (Sputter

Coater MED 010, Balzers, Liechtenstein) por 100 segundos para uma cobertura de ouro de aproximadamente 10 nanômetros sobre as faces oclusais dos molares.

Para a análise, as amostras foram observadas ao microscópio de varredura JSM-5600 LV da JOEL (Tokyo, Japan), operando em uma aceleração de 10 KV. Assim, foram obtidas imagens de alta resolução dos primeiros molares em três dimensões, onde foram realizadas mensurações na coroa: medida linear méσιο-distal e vestibulo-lingual das três cúspides desses molares, segundo Chowdhury & Bromage (2000) e Manzi (2005). As medidas das distâncias entre as cúspides dos molares inferiores e superiores foram realizadas entre os pontos mais externos das coroas (Figuras 12 e 13).

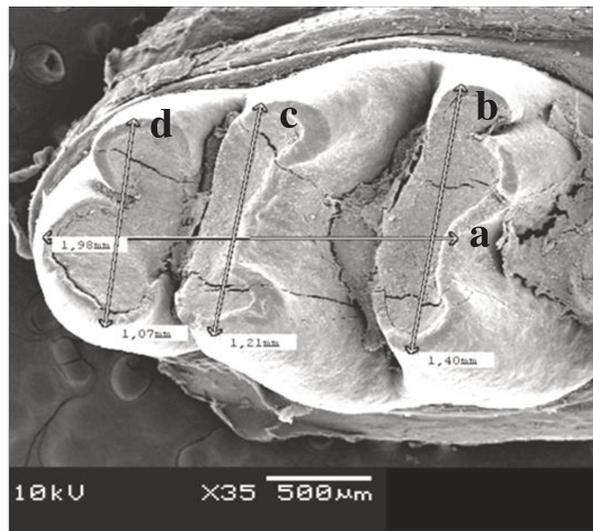


Figura 12: Medidas lineares mesio-distal (a), vestibulo-lingual mesial (b), central (c) e distal (d) das cúspides da coroa de um primeiro molar inferior em microscopia eletrônica de varredura.

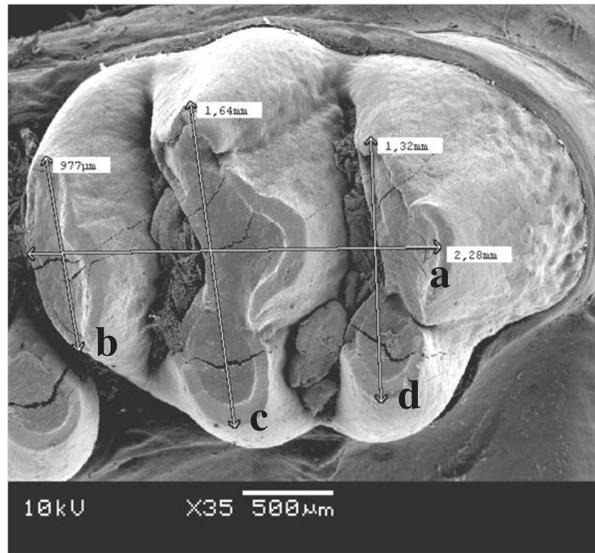


Figura 13: Medidas lineares mesio-distal (a), vestibulo-lingual mesial (b), central (c) e distal (d) das cúspides da coroa de um primeiro molar superior em microscopia eletrônica de varredura.

#### **4.8 Análise dos dados**

Após a análise exploratória dos dados, os mesmos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) em esquema fatorial radiação x selênio ( $\alpha=0,05$ ).

## **5 RESULTADOS**

### **5.1 Avaliação da matriz orgânica do esmalte dos primeiros molares de ratos por meio da birrefringência.**

Como pode ser observado na Tabela 1, nos dois tempos de estudo, houve diminuição nos valores do retardo óptico para os grupos irradiados (selênio irradiado e irradiado) em relação aos grupos não irradiados (controle e selênio), sendo observada diferença estatisticamente significativa entre eles.

O grupo controle apresentou maior valor de retardo óptico, não diferindo estatisticamente do grupo selênio nos animais que foram avaliados com 3 dias de idade, porém apresentando diferença estatística com o grupo selênio, para os animais sacrificados aos 4 dias de idade.

Comparando-se os grupos selênio irradiado e irradiado, não se observou diferença estatisticamente significativa entre eles nos animais sacrificados aos 3 dias de idade. Nos animais de 4 dias de idade, foi observada diferença estatística entre os grupos supracitados, porém sem demonstrar radioproteção já que o grupo irradiado apresentou maior valor de retardo óptico do que o grupo selênio irradiado.

Tabela 1 – Média (desvio padrão) dos valores de retardo óptico (nm) de cortes de 5µm de espessura dos grupos avaliados.

TEMPO	IRRADIAÇÃO	SELÊNIO	
		COM	SEM
		Média (Desvio Padrão)	Média (Desvio Padrão)
3 DIAS	COM	3,00 (1,58) Ab	3,84 (0,62) Ab
	SEM	5,97 (0,36) Aa	7,25 (1,89) Aa
4 DIAS	COM	3,00 (1,58) Bb	5,17 (0,81) Ab
	SEM	7,41 (1,29) Ba	13,67 (1,01) Aa

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

### ➤ Descrição Morfológica:

- Birrefringência da matriz orgânica do esmalte nos animais de 3 dias:

O grupo **controle** exibiu brilho de birrefringência forte e contínuo na região de esmalte secretório. O grupo **selênio** exibiu regiões com ausência de brilho e outras com brilho de birrefringência reduzido em relação ao grupo controle. O grupo **irradiado** apresentou espessura reduzida e irregularidade na região de esmalte secretório, com áreas de pouco brilho de birrefringência. O grupo **selênio irradiado** apresentou-se semelhante ao grupo irradiado, no que diz respeito à espessura e irregularidade da região de matriz orgânica de esmalte.

As figuras 14 e 15 ilustram os cortes histológicos não corados (à esquerda) e corados com hematoxilina e eosina (à direita) que representam o brilho da birrefringência e a morfologia tecidual correspondente, respectivamente, dos grupos estudados.

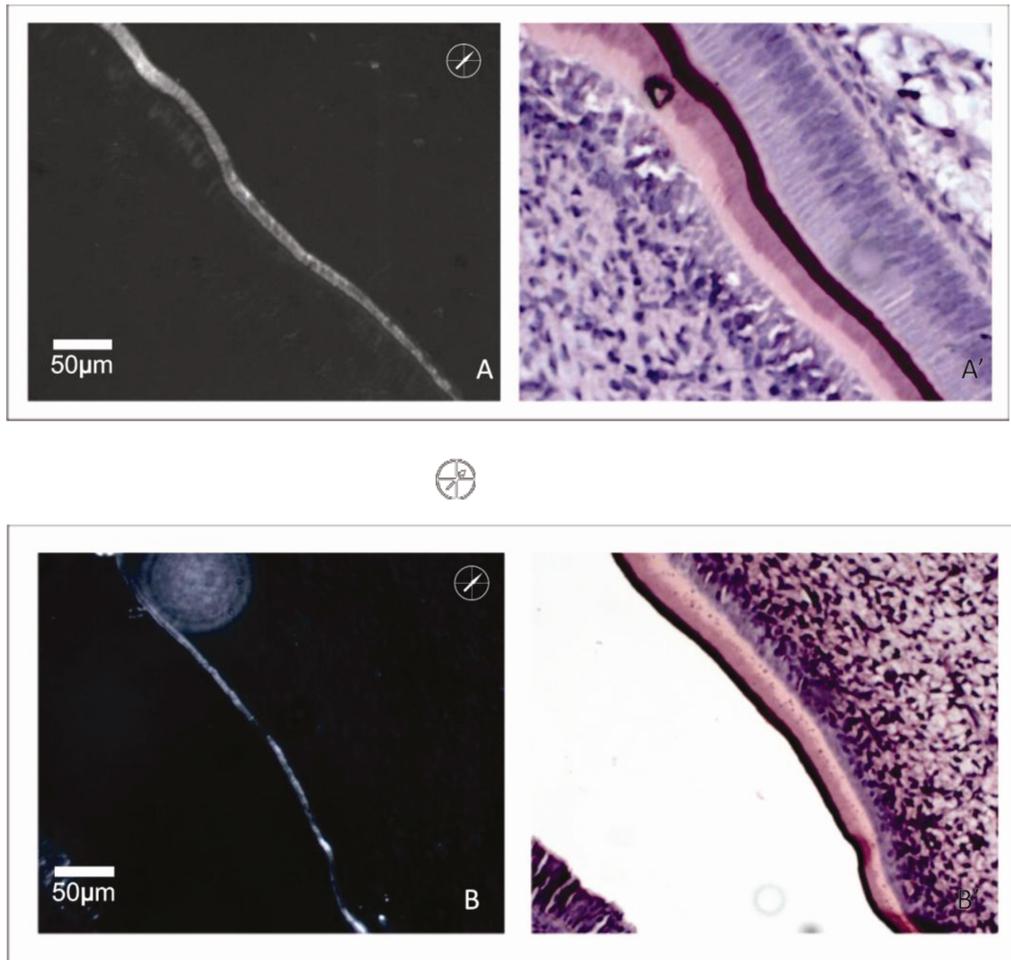


Figura 14: Cortes microscópicos (5  $\mu$ m) longitudinais de molares inferiores de ratos em luz polarizada não corados (à esquerda) e luz comum corados em HE (à direita). O círculo com barras cruzadas em seu interior representa o analisador e polarizador. A seta em 45° com o analisador e polarizador indica a posição de máxima birrefringência. (A): Brilho de birrefringência no grupo Controle, 3 dias; (A`): corte representativo de A corado em HE (x200); (B): Brilho de birrefringência no grupo Selênio, 3 dias; (B`): corte representativo de B corado em HE (x200).

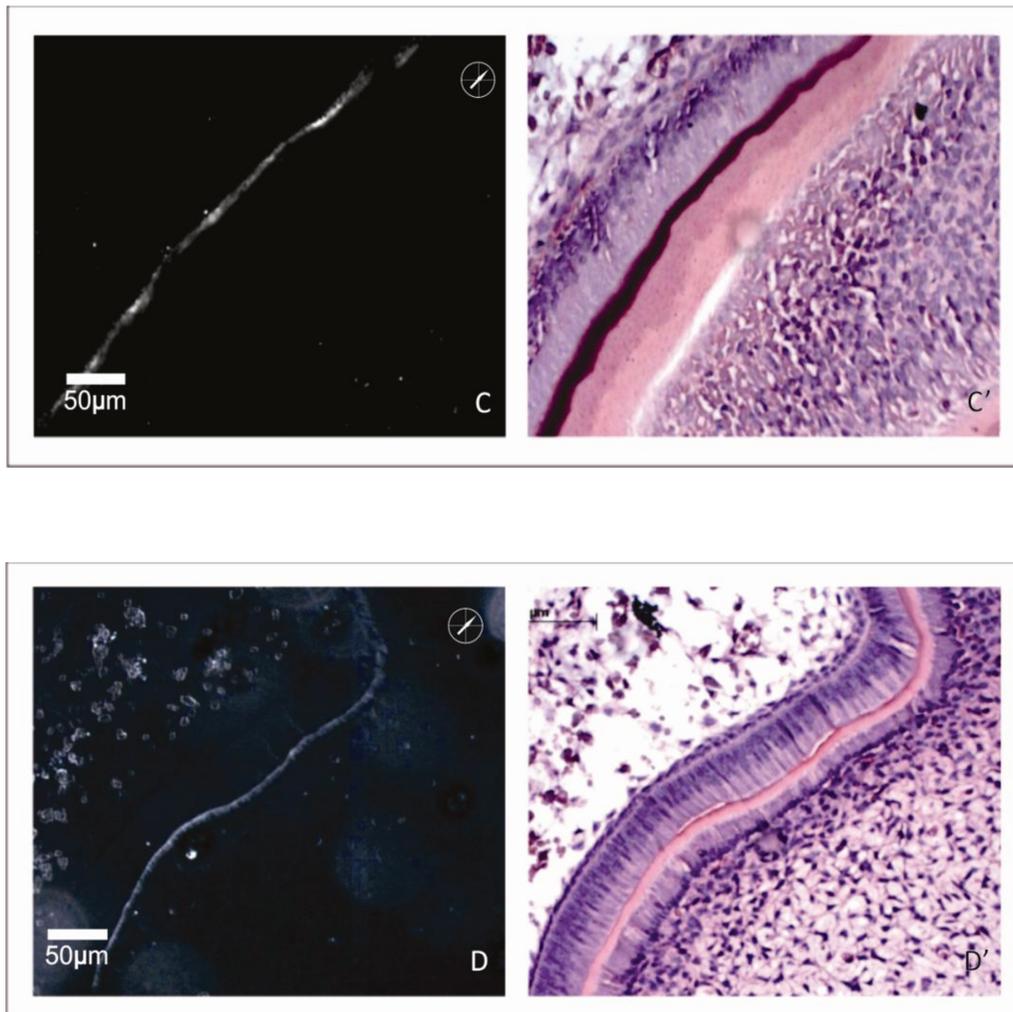


Figura 15: Cortes microscópicos (5 µm) longitudinais de molares inferiores de ratos em luz polarizada não corados (à esquerda) e luz comum corados em HE (à direita). O círculo com barras cruzadas em seu interior representa o analisador e polarizador. A seta em 45° com o analisador e polarizador indica a posição de máxima birrefringência. (C): Brilho de birrefringência no grupo Irradiado, 3 dias; (C'): corte representativo de C corado em HE (x200); (D): Brilho de birrefringência no grupo Selênio irradiado, 3 dias; (D'): corte representativo de D corado em HE (x200).

- Birrefringência da matriz orgânica do esmalte nos animais de 4 dias:

O grupo **controle** exibiu intenso brilho de birrefringência na região de esmalte secretório, com espessura maior do que a encontrada aos 3 dias. O grupo **selênio** exibiu regiões com ausência de brilho e outras com pouco brilho de birrefringência, assim como, redução na espessura da matriz orgânica do esmalte. O grupo **irradiado** apresentou-se semelhante ao grupo selênio, em relação à presença de pouco brilho ou ausência de brilho de birrefringência. O grupo **selênio irradiado** exibiu um discreto aumento de brilho em relação ao grupo irradiado, porém apresentou também regiões com ausência de brilho.

As figuras 16 e 17 ilustram os cortes histológicos não corados (à esquerda) e corados com hematoxilina e eosina (à direita) que representam o brilho da birrefringência e a morfologia tecidual correspondente, respectivamente, dos grupos estudados.

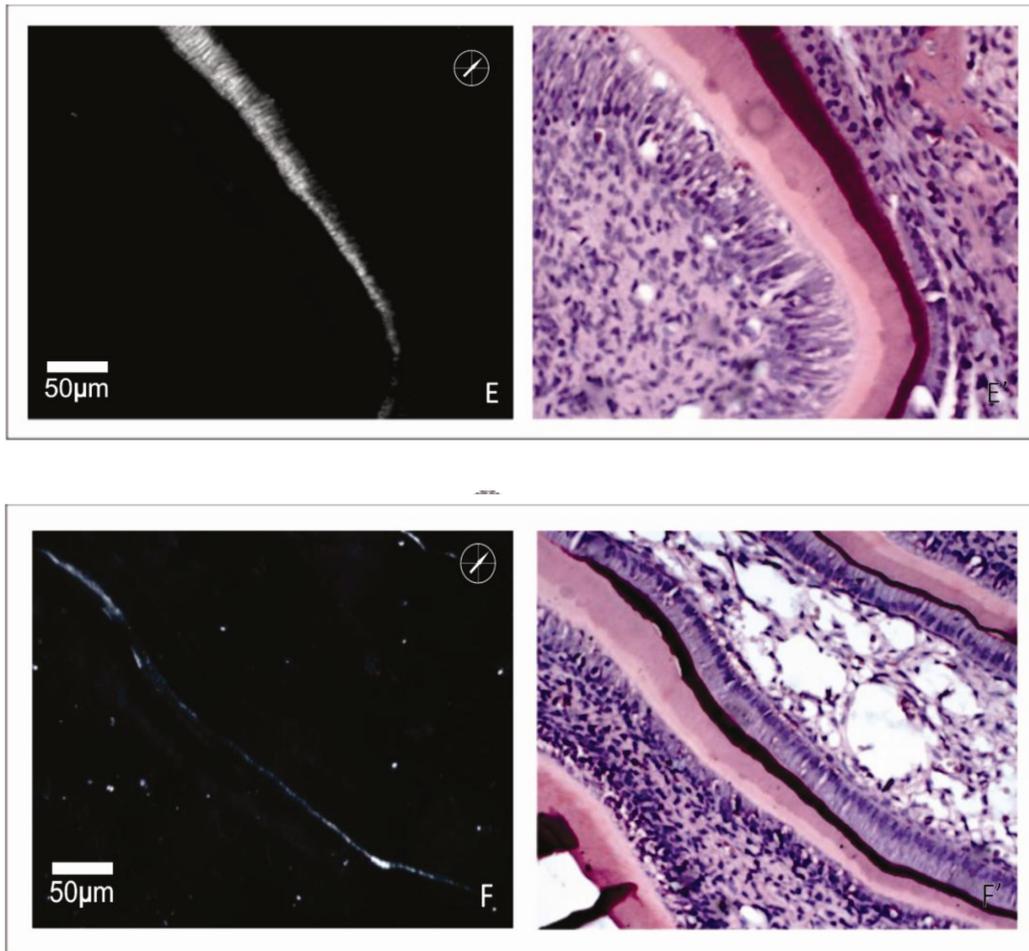


Figura 16: Cortes microscópicos (5  $\mu$ m) longitudinais de molares inferiores de ratos em luz polarizada não corados (à esquerda) e luz comum corados em HE (à direita). O círculo com barras cruzadas em seu interior representa o analisador e polarizador. A seta em 45° com o analisador e polarizador indica a posição de máxima birrefringência. (E): Brilho de birrefringência no grupo Controle, 4 dias; (E`): corte representativo de E corado em HE (x200); (F): Brilho de birrefringência no grupo Selênio, 4 dias; (F`): corte representativo de F corado em HE (x200).

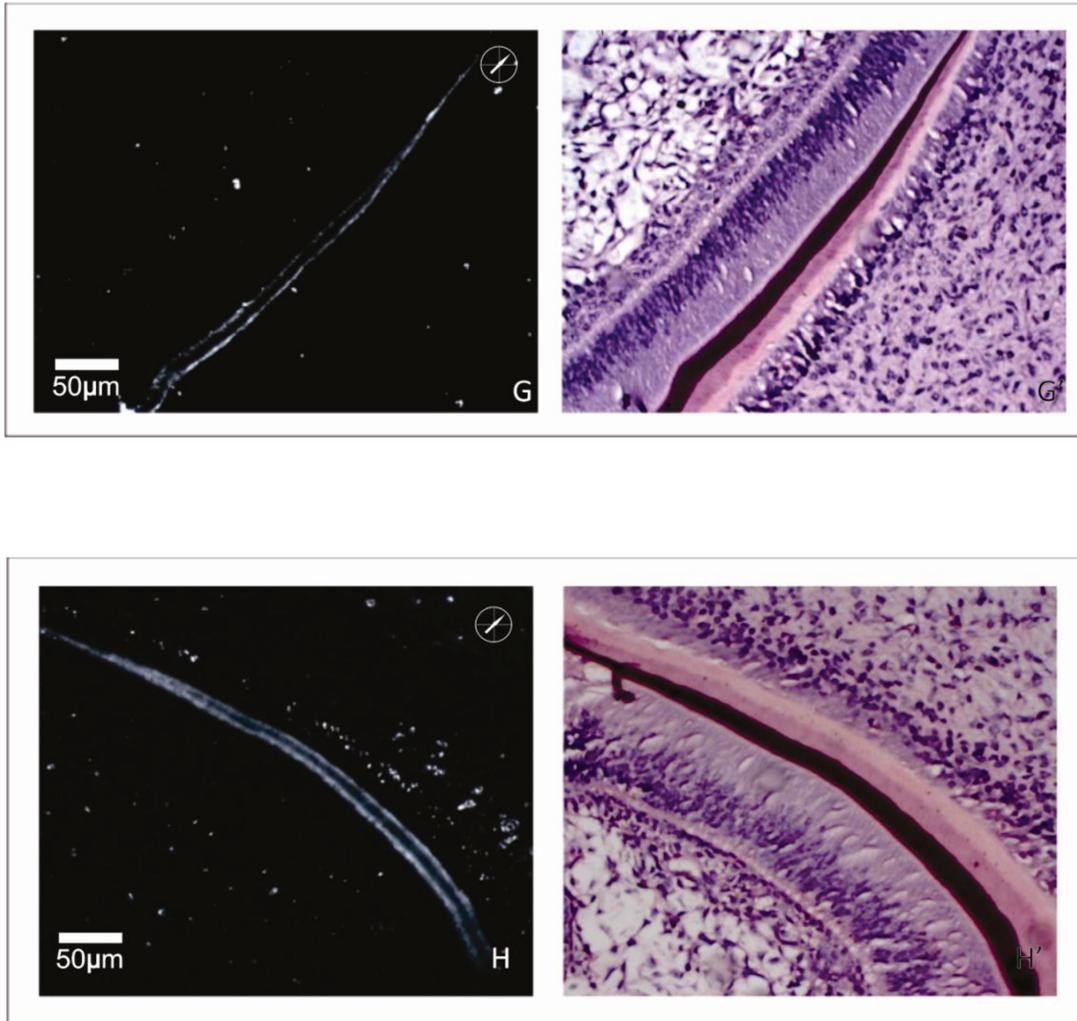


Figura 17: Cortes microscópicos (5  $\mu$ m) longitudinais de molares inferiores de ratos em luz polarizada não corados (à esquerda) e luz comum corados em HE (à direita). O círculo com barras cruzadas em seu interior representa o analisador e polarizador. A seta em 45° com o analisador e polarizador indica a posição de máxima birrefringência. (G): Brilho de birrefringência no grupo Irradiado, 4 dias; (G'): corte representativo de G corado em HE (x200); (H): Brilho de birrefringência no grupo Selênio irradiado, 4 dias; (H'): corte representativo de H corado em HE (x200).

## 5.2 Avaliação da morfologia dos primeiros molares de ratos por meio da microscopia eletrônica de varredura.

A análise estatística dos resultados referentes às medidas lineares méso-distais das coroas dos primeiros molares superiores e inferiores estão demonstradas nas tabelas 2 e 3, respectivamente. Os efeitos deletérios da radiação puderam ser observados nesses dentes em que os grupos somente irradiados diferiram estatisticamente dos grupos controle. Nota-se a diminuição das distâncias intercuspídeas méso-distais tanto dos dentes superiores quanto dos inferiores, demonstrando o atraso no desenvolvimento dentário causado pela radiação ionizante.

Tabela 2 – Média (desvio padrão) das medidas lineares méso-distais (mm) dos primeiros molares superiores.

SELÊNIO	IRRADIAÇÃO	
	COM	SEM
	Média (Desvio Padrão)	Média (Desvio Padrão)
COM	2.15 (0.10) Aa	2.34 (0.08) Aa
SEM	1.86 (0.22) Bb	2.53 (0.25) Aa

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

Tabela 3 – Média (desvio padrão) das medidas lineares méso-distal (mm) dos primeiros molares inferiores.

SELÊNIO	IRRADIAÇÃO	
	COM	SEM
	Média (Desvio Padrão)	Média (Desvio Padrão)
COM	1.95 (0.06) Ba	2.08 (0.08) Aa
SEM	1.92 (0.09) Ba	2.08 (0.19) Aa

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

Nas tabelas 4 e 5, observa-se os resultados estatísticos das medidas da distância intercuspídea vestibulo-palatina/lingual mesial dos dentes superiores e inferiores respectivamente. Os efeitos da radiação foram demonstrados principalmente nos molares superiores, nos quais se observou diferença estatística entre o grupo controle e irradiado, porém não houve diferença estatística entre os grupos selênio irradiado e irradiado.

Tabela 4 – Média (desvio padrão) das medidas lineares vestibulo-palatinas (mm) das cúspides mesiais dos primeiros molares superiores.

SELÊNIO	IRRADIAÇÃO	
	COM	SEM
	Média (Desvio Padrão)	Média (Desvio Padrão)
COM	<b>0.80 (0.12) Ba</b>	<b>1.26 (0.05) Aa</b>
SEM	<b>0.84 (0.31) Ba</b>	<b>1.29 (0.08) Aa</b>

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

Tabela 5 – Média (desvio padrão) das medidas lineares vestibulo-linguais (mm) das cúspides mesiais dos primeiros molares inferiores.

SELÊNIO	IRRADIAÇÃO	
	COM	SEM
	Média (Desvio Padrão)	Média (Desvio Padrão)
COM	<b>1.25 (0.02) Aa</b>	<b>1.11 (0.06) Ba</b>
SEM	<b>1.17 (0.09) Aa</b>	<b>1.08 (0.06) Aa</b>

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

Nas tabelas 6 e 7, observa-se diminuição das medidas da distância intercuspídea vestibulo-palatina/lingual central do grupo irradiado em relação ao selênio irradiado, porém sem diferença estatística, e do grupo irradiado em relação ao controle, tanto dos molares superiores quanto dos inferiores.

Tabela 6 – Média (desvio padrão) das medidas lineares vestibulo-palatinas (mm) das cúspides centrais dos primeiros molares superiores.

SELÊNIO	IRRADIAÇÃO	
	COM	SEM
	Média (Desvio Padrão)	Média (Desvio Padrão)
COM	1.28 (0.13) Ba	1.55 (0.07) Aa
SEM	1.19 (0.05) Ba	1.51 (0.09) Aa

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

Tabela 7 – Média (desvio padrão) das medidas lineares vestibulo-linguais (mm) das cúspides centrais dos primeiros molares inferiores.

SELÊNIO	IRRADIAÇÃO	
	COM	SEM
	Média (Desvio Padrão)	Média (Desvio Padrão)
COM	1.22 (0.05) Aa	1.23 (0.03) Aa
SEM	1.14 (0.06) Aa	1.21 (0.08) Aa

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

Em relação à distância vestibulo-palatina/lingual das cúspides distais dos molares superiores e inferiores observadas nas tabelas 8 e 9 respectivamente, mais uma vez notou-se diminuição das medidas do grupo irradiado em relação ao selênio irradiado.

As medidas intercuspídeas vestibulo-palatina/lingual distais entre os grupos controle e irradiado foram semelhantes nos dentes superiores, porém nos dentes inferiores a radiação mostrou-se prejudicial.

Tabela 8 – Média (desvio padrão) das medidas lineares vestibulo-palatinas (mm) das cúspides distais dos primeiros molares superiores.

SELÊNIO	IRRADIAÇÃO	
	COM	SEM
	Média (Desvio Padrão)	Média (Desvio Padrão)
COM	<b>1.22 (0.36) Aa</b>	<b>0.97 (0.04) Ba</b>
SEM	<b>0.95 (0.05) Ab</b>	<b>0.94 (0.07) Aa</b>

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

Tabela 9 – Média (desvio padrão) das medidas lineares vestibulo-linguais (mm) das cúspides distais dos primeiros molares inferiores.

SELÊNIO	IRRADIAÇÃO	
	COM	SEM
	Média (Desvio Padrão)	Média (Desvio Padrão)
COM	<b>1.01 (0.02) Ba</b>	<b>1.35 (0.04) Aa</b>
SEM	<b>0.94 (0.06) Ba</b>	<b>1.41 (0.11) Aa</b>

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

## 6 DISCUSSÃO

A odontogênese é o processo de desenvolvimento do dente, que se inicia como resultado da interação entre o epitélio oral e o ectomesênquima subjacente, originando a banda epitelial primária e, a seguir, a lâmina dentária, em cuja região anterior se dará a formação dos futuros dentes. A partir desse instante, o desenvolvimento do dente prossegue em três estágios: botão, capuz e campânula. Inicialmente, ocorre a invasão epitelial para o interior do ectomesênquima dos maxilares. As células ectomesenquimais são condensadas abaixo e ao redor do botão epitelial. O botão continua a proliferar, crescendo e se tornando mais largo, semelhante a um capuz. Nesse momento, já é possível identificar os elementos formadores do dente e seus tecidos, sendo chamado de órgão do esmalte. Na fase de campânula, também conhecida como fase de sino devido ao formato do germe dentário, ocorrem a histodiferenciação e a morfodiferenciação das células que produzem os tecidos duros da coroa, os ameloblastos e odontoblastos, sendo nessa fase o início da formação do esmalte e da dentina (Ten Cate, 2008).

Segundo Schour & Massler (1971), a histodiferenciação dos ameloblastos dos primeiros molares de ratos albinos ocorre aos 20 dias intra-uterinos. Manzi, em 2005, realizou uma pesquisa para avaliar as fases da odontogênese de ratos, na qual confirmou que a fase de sino acontece aos 19 dias intra-uterinos.

Diversos fatores externos podem afetar a formação dos tecidos dentários. Dentre esses fatores, pode-se citar a radiação ionizante, que apresenta uma grande importância no radiodiagnóstico e também no tratamento de tumores malignos.

Primeiramente, ocorre uma interação entre a radiação ionizante e a matéria, podendo causar efeitos biológicos. Essa interação resulta em modificações de moléculas biológicas após segundos ou horas. Conseqüentemente, as alterações moleculares podem causar modificações em células e organismos que persistem por horas e, possivelmente, por gerações. Se células são modificadas, tais mudanças podem levar ao desenvolvimento de distúrbios para o indivíduo exposto ou para seus descendentes (White & Pharoah, 2007).

Para obtenção de bons resultados em tratamento de câncer, a radioterapia geralmente está associada à cirurgia e quimioterapia. No entanto, ela envolve certos riscos, dependendo da quantidade de radiação ionizante absorvida pelos tecidos. Algumas vezes, os tecidos podem sofrer danos irreparáveis, já que o tecido normal está presente no campo de radiação, assim como a lesão (Chow & Theodore, 1998).

Os efeitos da radiação ionizante em dentes em desenvolvimento têm sido relatados e discutidos por diversos autores, assim como a dose de radiação utilizada e o período da odontogênese em que foi realizada a irradiação. Devido à complexidade do desenvolvimento dentário, podem ocorrer alterações na papila dentária, no esmalte ou na dentina, com conseqüente anormalidade na morfologia dentária.

Em um caso clínico relatado por Rodrigues *et al.* (2009), foi realizada radioterapia em um paciente com rhabdomyosarcoma na mandíbula aos 18 meses de idade, com uma dose de 5.400 cGy. Foram observadas no paciente aos 15 anos de idade, agenesias dentárias, raízes extremamente curtas e em formato cônico e hipoplasia de esmalte nos dentes inferiores. Na pesquisa de Kaste *et al.*, em 2009, em que pacientes que tiveram câncer na infância e receberam dose de radiação de acordo com o tipo de tumor, também foram encontradas alterações dentárias, como microdontia, hipodontia, hipoplasia de esmalte e desenvolvimento anormal das raízes. No caso clínico relatado por Carl & Wood, em 1980, a paciente recebeu 5 Gy de radiação X aos 4 anos de idade. Foram observadas alterações dentárias, como a formação parcial das raízes dos molares, ausência das raízes dos dentes anteriores e pré-molares e mandíbula pouco desenvolvida. Essas alterações foram causadas em locais sadios, que provavelmente se encontravam no campo de radiação no momento da radioterapia.

A gravidade dos distúrbios pode ser devida principalmente à dose usada na radioterapia e à idade precoce do paciente na época do tratamento. Pois, segundo Sonis *et al.* (1990), crianças tratadas antes de 5 anos de idade apresentam anormalidades dentárias mais severas. Os autores sugerem que dentes imaturos apresentam maior risco de sofrerem distúrbios do que dentes maduros.

Os ameloblastos no dente em desenvolvimento são extremamente sensíveis aos estímulos externos e muitos fatores podem resultar em anomalias no esmalte (Neville *et al.*,

1998). Sendo a radiação ionizante um estímulo externo, pôde ser observado nos resultados da presente pesquisa as alterações causadas por ela. Dury *et al.* (1984) relataram que 1 Gy de radiação é suficiente para causar danos permanentes no ameloblasto e que 3 Gy são suficientes para causar distúrbios no desenvolvimento dentário. Portanto, é de se esperar que 4 Gy seja capaz de causar alterações dentárias, como pode ser observado nos resultados da presente pesquisa, na qual notou-se alteração no brilho de birrefringência na matriz orgânica de esmalte dos molares dos animais de 3 e 4 dias e diminuição das dimensões intercuspidais nos animais de 30 dias.

A metodologia utilizada nesse trabalho foi semelhante à utilizada por Manzi, em 2005, em que irradiou ratas aos 13 dias de gestação (fase de lâmina), aos 16 dias (fase de broto) e aos 19 dias de gravidez (fase de sino). Pela análise dos resultados, a radiação promoveu efeito deletério nas dimensões oclusais dos molares, em todos os estágios estudados na dose de 4 Gy, principalmente no estágio de sino. Assim, no presente estudo, a partir desses resultados, optou-se por irradiar as ratas aos 19 dias de gestação. Estando nossos resultados em concordância com os resultados de Manzi (2005), no qual também foi visualizado alterações nas dimensões oclusais.

Nesse trabalho foram utilizados os dentes molares de ratos pelo fato de existirem poucos relatos sobre o efeito da radiação no desenvolvimento desses dentes e por sua formação assemelhar-se aos dentes de humanos, ao contrário dos incisivos, já que esses apresentam crescimento contínuo e suas células estão em constante renovação no órgão odontogênico (Lindvall *et al.*, 1972). Dessa forma, devido a essa constante proliferação celular, o órgão odontogênico é uma região bastante radiosensível (Pearson & Phelps, 1981).

Nesse estudo, optou-se por utilizar dose aguda única de 4 Gy de radiação X devido ser uma dose radioterápica e seguindo a metodologia de alguns estudos como o de Saad *et al.* (1991), Bang *et al.* (2002) e Manzi (2005). É importante citar que, nas pesquisas supracitadas, a radiação causou danos nos organismos irradiados, sendo possível ser visto nos resultados dessas pesquisas através da alteração das dimensões oclusais dos molares dos filhotes das ratas.

Na pesquisa de Bang *et al.* (2002) ratas grávidas foram irradiadas com 0,5; 1; 2 e 4 Gy aos 11,5 dias de gestação e aos 18 dias foram sacrificadas. A incidência de fetos mortos foi observada principalmente com exposição de 4 Gy, sendo observadas também malformações nos filhotes sobreviventes. Os filhotes das ratas irradiadas, no presente trabalho, nasceram em menor número e em tamanho reduzido, quando comparados com os filhotes das ratas do grupo controle e selênio, porém semelhantes aos do grupo selênio irradiado.

Na tentativa de minimizar esses danos causados pela radiação, foi utilizado nesse estudo o selênio, em sua forma inorgânica, que é o selenito de sódio. O selênio é um nutriente essencial para muitas espécies de animais, incluindo os humanos (Stewart *et al.*, 1999). É também um constituinte do sítio ativo da enzima glutathione peroxidase, podendo ser essa a explicação do seu efeito radioprotetor, visto que o mecanismo primário dessa enzima é a degradação do peróxido de hidrogênio nas células, mostrando ser um importante protetor dos lipídios da membrana celular contra a desintegração a partir da oxidação, como lembra Tuji *et al.*, 2005. Flohe *et al.*, em 1973, comprovaram que a deficiência de selênio leva a uma diminuição na atividade da glutathione peroxidase, considerando o selênio como um componente essencial dessa enzima. Levando em consideração essas afirmações, foi proposto nesse estudo a utilização do selenito de sódio para minimizar as possíveis anomalias dentárias induzidas pela radiação e fazer esses dentes assemelhar-se com a morfologia dentária dos dentes dos animais do grupo controle.

A avaliação da matriz orgânica do esmalte foi realizada por meio do brilho da birrefringência com o uso de um microscópio de polarização. Nas pesquisas de Espírito Santo *et al.*, em 2007, foi constatado que o brilho da birrefringência da matriz orgânica do esmalte no estágio de secreção é influenciado pela organização ordenada supramolecular dos seus componentes. A amelogenina é a principal proteína da matriz orgânica do esmalte, representando mais de 90% do conteúdo protéico nesse tecido (Moradian-Oldak, 2001; Espírito Santo *et al.*, 2006).

A análise do primeiro molar de ratos mostrou que a matriz orgânica do esmalte em animais de 4 dias de idade do grupo controle exibiu forte birrefringência nas áreas de esmalte secretório, estando de acordo com os resultados de Espírito Santo *et al.*, (2006),

explicando também a escolha dos tempos de sacrifício para a avaliação da matriz orgânica do esmalte. Os autores afirmaram ainda que em animais com 0 dia, em que o esmalte tem uma fina camada e em animais com 9 dias, cujo esmalte está em fase de maturação, não foi exibido qualquer brilho de birrefringência, pois ocorreu perda de proteína e subsequente aposição mineral. Essa ausência de brilho foi observada nos animais do grupo irradiado em resultados encontrados aqui, não pelo fato de ter ocorrido perda de proteínas, ou por exibir uma fina camada de matriz orgânica, mas pelo efeito deletério que a radiação ionizante causou, resultando em alteração da organização supramolecular da matriz orgânica do esmalte.

Ramos-Perez (2009) avaliou a birrefringência da matriz orgânica do esmalte em incisivos de ratos e pôde observar, nos grupos irradiados, uma diminuição no brilho de birrefringência em relação ao controle. Na análise da atual pesquisa, também foi possível observar diminuição no brilho de birrefringência nos animais irradiados. Já nos animais do grupo controle pôde ser observado forte brilho nos dois tempos de estudo, caracterizando uma organização a nível molecular do tecido avaliado.

Tradicionalmente, o selênio tem sido associado à proteção contra radiação por causa de suas propriedades antioxidantes (Schueller *et al.*, 2004 e Rafferty *et al.*, 2003), capturando os radicais livres provenientes da ionização causada pela radiação. Entretanto, nesse estudo, os grupos selênio irradiado e irradiado não diferiram estatisticamente entre si, estando o brilho de birrefringência da matriz orgânica do esmalte nos animais do grupo selênio irradiado semelhante ao do grupo irradiado, demonstrando que o selenito de sódio, na dose utilizada, não exerceu função radioprotetora em animais de 3 e 4 dias de idade.

Comparando os grupos controle e selênio, na avaliação da matriz orgânica de esmalte, não se observou diferença estatística no tempo de 3 dias, embora o retardo óptico do grupo controle tenha sido maior que o do selênio; já aos 4 dias, foi observada diferença estatística entre esses dois grupos, demonstrando assim a toxicidade do selenito de sódio.

Nos animais de 30 dias de idade, as avaliações foram realizadas por meio de microscopia eletrônica de varredura, através de medidas intercuspídeas nos primeiros molares superiores e inferiores. Foi possível constatar diminuição das dimensões oclusais da coroa desses dentes nos grupos irradiados, em que a maioria diferiu estatisticamente dos

do grupo controle, o que configura uma anomalia de forma. Esse resultado é semelhante ao de Manzi, em 2005.

De todas as medidas intercuspídeas realizadas, os grupos selênio irradiado e irradiado diferiram estatisticamente apenas nas medidas lineares méso-distais e nas medidas lineares vestibulo-palatinas das cúspides distais dos primeiros molares superiores. Não se observou essa diferença estatística nas medidas realizadas nos dentes inferiores, mais uma vez demonstrando que o selenito de sódio não teve uma ação radioprotetora, concordando com a pesquisa de Rocha (2005) na qual o selenito de sódio não se mostrou como eficaz radioprotetor aos 7 e 14 dias de estudo em tecido ósseo e de Neves (2007), em alvéolos de incisivos de ratos, nos tempos de 21 e 28 dias. Ao contrário do que foi observado nas pesquisas de Rafferty *et al.* (1998), com radiação UVR; Mutlu-Turkoglu *et al.* (2000), com radiação X; Tuji *et al.*, (2005 e 2010); Sagowski *et al.* (2005); Pontual, *et al.* (2007) e Buntzel *et al.*, em 2010.

O fato da diferença estatística dos grupos supracitados ter ocorrido em sua maioria nas medidas realizadas nos dentes superiores supõe-se que seja devido à sua formação ocorrer cerca de 24 horas após a dos dentes inferiores, segundo Schour & Massler, em 1971. Esses resultados podem ser justificados também pela resposta individual de cada animal, supondo que nem todos os animais estivessem na mesma fase da odontogênese no momento da irradiação. Portanto, se a irradiação não ocorreu no mesmo período de formação para os dentes superiores e inferiores, o dano resultante foi diferente, podendo ter sido menor para os dentes inferiores, consequentemente guiando para a não radioproteção do selenito de sódio.

Outra possível justificativa para esses resultados é a dose de selenito de sódio utilizada, que foi 0,3 mg/kg de peso corpóreo do animal, tendo sido possivelmente baixa e insuficiente para promover proteção nos tecidos irradiados. Embora em algumas pesquisas a dose de selênio utilizada tenha sido de 0,5 mg/kg como nos trabalhos de Lawrence & Burck, (1976); Neves, em 2007; Pontual *et al.*, em 2007 e Tuji *et al.*, em 2010, a escolha se deu devido à aplicação da substância ocorrer em ratas grávidas e o selênio apresentar possíveis efeitos adversos no organismo com sua já conhecida toxicidade, sendo esta característica do selenito observada na pesquisa de Tuji *et al.* (2010).

Em relação às medidas intercuspídeas dos grupos controle e selênio, não houve diferença estatística entre esses grupos em nenhuma das medidas realizadas, demonstrando que o selenito de sódio não foi tóxico nesse tempo de estudo. O resultado da presente pesquisa foi semelhante à de Rocha, em 2005, na qual a dose de selenito utilizada foi de 1 mg/kg e foi observada uma toxicidade somente nos tempos iniciais do estudo.

Pesquisas com selênio também têm sido realizadas em seres humanos, em pacientes portadores de câncer que necessitam de radioterapia, como a pesquisa de Buntzel *et al.*, em 2010, com a dose de 500 µg de selenito de sódio. Os autores concluíram que a reposição de selênio pode ser capaz de reduzir os efeitos deletérios da radiação, embora com efeitos limitados, já que esses só foram observados na diminuição da perda de paladar e na disfagia. Porém, ainda não se encontra relatos de pesquisas como essas em pacientes grávidas.

A tentativa da minimização dos efeitos deletérios da radiação ionizante é um trabalho contínuo. Várias são as tentativas através de numerosas pesquisas para se chegar a um objetivo com sucesso. Porém, os resultados são variados, alguns positivos e outros em que as substâncias não exercem sua função radioprotetora.

É importante afirmar que toda tentativa é válida e que, com a quantidade de pesquisas que estão sendo realizadas e que se realizarão nessa área, espera-se a obtenção de resultados favoráveis e aplicáveis, objetivando encontrar uma dose de selenito de sódio que proteja contra os efeitos deletérios da radiação, diminuindo as alterações causadas em tecidos sadios no organismo vivo para pacientes tratados com radioterapia, aumentando assim, a qualidade e expectativa de vida desses pacientes.

## **7 CONCLUSÃO**

A partir dos resultados obtidos e dentro das condições experimentais utilizadas, concluiu-se que o selenito de sódio não exerceu ação radioprotetora no desenvolvimento dentário de filhotes de ratas irradiadas durante a odontogênese e apresentou toxicidade nos tempos iniciais de avaliação.

## REFERÊNCIAS\*

Amara IB, Troudi A, Garoui E, Hakim A, Boudawara T, Zeghal KM *et al.* Protective effects of selenium on methimazole nephrotoxicity in adult rats and their offspring. *Exp Toxicol Pathol.* 2010.

Bang D, Lee J, Oh H, Kim S, Kim T, Lee Y *et al.* Dose-incidence relationships on the prenatal effects of gamma-radiation in mice. *J Vet Sci.* 2002; 3(1): 3-11.

Bronckers AL, Bervoets TJM, Lyaruu DM, Woltgens JHM. Degradation of hamster amelogenins during secretory stage enamel formation in organ culture. *Matrix Biol.* 1995; 14(7): 533-41.

Buntzel J, Micke O, Kisters K, Bruns F, Glatzel M, Schonekaes K *et al.* Selenium substitution during radiotherapy of solid tumors – laboratory data from observation studies in gynaecological and head and neck cancer patients. *Anticancer Res.* 2010; 30(5): 1783-6.

Burstone MS. The effect of radioactive phosphorus upon the development of embryonic tooth bud and supporting structures. *Am J Path.* 1951; 27(1): 21-31.

Carl W, Wood RW. Effects of radiation on the developing dentition and supporting bone. *J Am Dent Assoc.* 1980; 101(4): 646-8.

Cekan E, Tribukait B, Vokal-Borek H. Protective effect of selenium against ionizing radiation-induced malformations in mice. *Acta Radiol Oncol.* 1985; 24(3): 267-71.

---

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

Chow H, Theodore LP. Oral cavity cancer. In: Steven AL, Theodore LP, editors. Textbook of radiation oncology. Philadelphia: Saunders; 1998; 457-96.

Chowdhury IG, Bromage TG. Effect of fetal exposure to nicotine on dental development of the laboratory rat. *Ana Record*. 2000; 258: 397-405.

Collier PM, Sauk JJ, Rosenbloom J, Yuan ZA, Gibson CW. An amelogenin gene defect associates with human X-linked amelogenesis imperfect. *Archs Oral Biol*. 1997; 42(3): 235-42.

Dahllöf G, Rozell B, Forsberg CM, Borgström B. Histologic changes in dental morphology induced by high dose chemotherapy and total body irradiation. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1994; 77(1): 56-60.

Dury DC, Roberts MW, Miser JS, Folio J. Dental root agenesis secondary to irradiation therapy in case of rhabdomyosarcoma of the middle ear. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1984; 57(6): 595-9.

English JA, Schlack CA, Ellinger F. Oral manifestations of ionizing radiation. *J Dent Res*. 1954; 33(3): 377-88.

Espírito-Santo AR, Line SRP. The enamel organic matrix: structure and function. *Braz J Oral Sci*. 2005; 4: 716-24.

Espírito-Santo AR, Novaes PD, Line SRP. Anisotropic properties of the enamel organic extracellular matrix. *Eur. J. Oral Sci*. 2006; 114 (Suppl 1), 333-7.

Espírito-Santo AR, Bartlett JD, Gibson CW, Li Y, Kulkarni AS, Line SRP. Amelogenin- and enamelysin (Mmp-20)-deficient mice display altered birefringence in the secretory-stage enamel organic extracellular matrix. *Connect Tissue Res*. 2007; 48(1): 39-45.

Espírito-Santo AR, Frozoni MR, Ramos-Perez FM, Novaes PD, Line SRP. Birefringence of the secretory-stage enamel organic extracellular matrix from rats submitted to successive injections of bisphosphonates. *Connect Tissue Res.* 2010; 51(3): 208-15.

Fincham AG, Moradian-Oldak J, Simmer JP. The structural biology of the developing dental enamel matrix. *J Struct Biol.* 1999; 126(3): 270-299.

Flohe L, Gunzler WA, Schock HH. Glutathione peroxidase: a selenoenzyme. *Febs Lett.* 1973; 32 (1): 132-4.

Freitas DQ. Avaliação do efeito radioprotetor do selenito de sódio na reparação de tíbias de ratas ovariectomizadas [tese]. Piracicaba: FOP/UNICAMP; 2007.

Gronbaek H, Frystyk J, Orskov H, Flyvbjerg A. Effect of sodium selenite on growth factor-binding proteins and insulin-like growth factor-I in rats. *J Endocrinol.* 1995; 145(1): 105-12.

Hafeman DG, Sunde RA, Hoekstra WG. Effect of dietary selenium on erythrocyte and liver glutathione peroxidase in the rat. *J Nutr.* 1974; 104(5): 580-7.

Horn Y, Markitziu A, Ulmanky M. Effect of single versus fractioned doses of X-radiation on incisor in rats. *J Dent Res.* 1975; 54(2): 378-83.

Jacobson GA, Narkowicz C, Tong YC, Peterson GM. Plasma glutathione peroxidase by ELISA and relationship to selenium level. *Clin Chim Acta.* 2006; 369(1): 100-3.

Kaste SC, Goodman P, Leisenring W, Stovall M, Hayashi RJ, Yeazel M *et al.* Impact of radiation and Chemotherapy on risk of dental abnormalities. *Cancer.* 2009; 115(24): 5817-27.

Khan MA, Gartner LP, Hiatt JL, Provenza DV. Sensitivity of mouse molar tooth germs to X-ray irradiation in vitro. *J Biol Buccale*. 1979; 7: 211-24.

Kida M, Ariga T, Shirakawa T, Oguchi H, Sakiyama Y. Autosomal-dominant hypoplastic form of amelogenesis imperfect caused by an enamel gene mutation at the exon-intron boundary. *J Dent Res*. 2002; 81(12): 738-42.

Lawrence RA, Burk RF. Glutathione peroxidase activity in selenium-deficient rat liver. *Biochem Biophys Res Commun*. 1976; 71(4): 952-8.

Lindvall AM, Omnell KA, Schildt BE. The effect of roentgen irradiation on the formation of enamel and dentin in maxillary rat incisors. *Scand J Dent Res*. 1972; 80(3): 253-263.

Lopes NNF, Petrilli AS, Caran EMM, França CM, Chilvarquer I, Lederman H. Dental abnormalities in children submitted to antineoplastic therapy. *J Dent Child*. 2006; 73(3): 140-5.

Manzi FR. Efeito da radiação ionizante no desenvolvimento dentário em ratos [tese]. Piracicaba: FOP/UNICAMP; 2005.

Markitziu A, Horn Y, Ulmansky M. Effect of single versus fractioned doses of X-radiation on developing molars in rats. *J Dent Res*. 1974. 53(3): 637-40.

McGinnis JP, Hopkins KP, Thompson EI, Hustu OH. Mandibular third molar development after mantle radiation in long-term survivors of childhood hodgkin's disease. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1987; 63(5): 630-3.

Merino C, Sanches O, Ballesta G, Jimenez R, Gonzales H. Dental anomalies caused by oncological treatment: case report. *J Clin Pediatr Dent*. 1998; 22(3): 261-4.

Moradian-Oldak J. Amelogenins: assembly, processing and control of crystal morphology. *Matrix Biol.* 2001(5-6): 293-305.

Moradian-Oldak J, Iijima M, Bouropoulos N, Wen HB. Assembly of amelogenin proteolytic products and control of octacalcium phosphate crystal morphology. *Connect Tissue Res.* 2003; 44(suppl 1): 58-64.

Moradian-Oldak J, Goldberg M. Amelogenin supra-molecular assembly in vitro compared with the architecture of the forming enamel matrix. *Cells Tissues Organs.* 2005; 181(3-4): 202-18.

Mutlu-Turkoglu U, Erbil Y, Öztezcan S, Olgac V, Toser G, Uysal M. The effect of selenium and/or vitamin e treatments on radiation-induced intestinal injury in rats. *Life Sci.* 2000; 66(20): 1905-13.

Neves EG. Avaliação do efeito radioprotetor do selenito de sódio na reparação óssea alveolar de ratos [dissertação]. Piracicaba: FOP/UNICAMP; 2007.

Neville BW, Damm DD, Allen CM, Bouquot JE. *Patologia Oral e Maxilofacial.* Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1998.

Niehoff P, Soringer IN, Açil Y, Lange A, Marget M, Roldan C *et al.* HDR brachytherapy irradiation of the jaw – as a new experimental model of radiogenic bone damage. *J Craniomaxillofac Surg.* 2008; 36(4): 203-9.

Paine ML, Wang H, Luo W, Krebsbach PH, Snead ML. A transgenic animal model resembling amelogenesis imperfect related to ameloblastin overexpression. *J Biol Chem.* 2002; 278(21): 19447-52.

Patterson BH, Levander OA, Helzlsouer K, McAdam PA, Lewis SA, Taylor PR *et al.* Human selenite metabolism: a kinetic model. *Am J Physiol.* 1989; 257(3 pt 2): R556-67.

Pearson AE, Phelps TA. Radiation effects on mouse incisor teeth following whole-body doses of up to 16 gray. *Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med.* 1981; 39(4): 409-17.

Pontual ML, Tuji FM, Barros SP, Bóscolo FN, Novaes PD, de Almeida SM. Ultrastructural evaluation of the radioprotective effect of sodium selenite on submandibular glands in rats. *J Appl Oral Sci.* 2007; 15(3): 162-8.

Rafferty TS, Beckett GJ, Walker C, Bisset YC, McKenzie RC. Selenium protects primary human keratinocytes from apoptosis induced by exposure to ultraviolet radiation. *Clin Exp Dermatol.* 2003; 28(3): 294-300.

Rafferty TS, McKenzie RC, Hunter JAA, Howie AF, Arthur JR, Nicol F *et al.* Differential expression of selenoproteins by human skin cells and protection by selenium from UVB-radiation-induced cell death. *Biochem J.* 1998; 332(pt.1): 231-6.

Ramos-Perez FMM. Efeito da radiação ionizante na formação da matriz orgânica do esmalte dentário [tese]. Piracicaba: FOP/UNICAMP; 2009.

Rocha ASP. Avaliação do efeito radioprotetor do selenito de sódio na reparação óssea. [tese]. Piracicaba: FOP/UNICAMP; 2005.

Rodrigues GA, Soares P, Leite AF, Figueiredo PTS, Guerra ENS, Mestrinho HD *et al.* Sequelas dentomaxilofaciais em criança submetida a tratamento multimodal para rabdomyosarcoma. 2009; 46(2): 179-84.

Saad AY, Abdelazim AA, el-Khashab MM, Mansour MA. Effects of gamma radiation on incisor development of the prenatal albino mouse. *J Oral Pathol Med.* 1991; 20(8): 385-8.

Sagowski C, Tesche S, Zywietz F, Wenzel S, Metternich FU. The radioprotectors amifostine and sodium selenite do not modify the radiosensitivity of rat rhabdomyosarcomas. *Onkologie*. 2004; 27(1): 54-7.

Sagowski C, Wenzel S, Jenicke L, Metternich FU, Jaehne M. Sodium selenite is a potent radioprotector of the salivary glands of the rat: acute effects on the morphology and parenchymal function during fractionated irradiation. *Eur Arch Otorhinolaryngol*. 2005; 262(6): 459-64.

Saito Y, Yoshida Y, Akazawa T, Takahashi K, Niki E. Cell death caused by selenium deficiency and protective effect. *J Biol Chem*. 2003; 278(41): 39428-34.

Schour I, Massler M. The teeth. In: Griffith J, Farris E. *The Rat in Laboratory Investigation*. New York: Editora hafner publishing company INC; 1971. p. 104-63.

Schueller P, Puettmann S, Micke O, Senner V, Schaefer U, Willich N. Selenium influences the radiation sensitivity of C6 rat glioma cells. *Anticancer res*. 2004; 24(5A): 2913-7.

Sonis AL, Tarbell N, Valachovic RW, Gelber R, Schwenn M, Sallan S. Dentofacial development in long-term survivors of acute lymphoblastic leukemia. A comparison of three treatment modalities. *Cancer*. 1990; 15; 66(12): 2645-52.

Smith CE, Nanci A. Overview of morphological changes in enamel organ cells associated with major events in amelogenesis. *Int J Dev Biol*. 1995; 39(1):153-61.

Stewart MS, Spallholz JE, Neldner KH, Pence BC. Selenium compounds have disparate abilities to impose oxidative stress and induce apoptosis. *Free Radic Biol Med*. 1999; 26(1-2): 42-8.

Sweeney WT, Elzay RP, Levitt SH. Histologic effect of fractioned doses of selectively applied  $^{60}\text{Co}$  irradiation on teeth of albino rats. *J Dent Res.* 1977; 56(11): 1403-7.

Takeda Y, Kuroda M, Amari E, Ynagisawa T. Failure of root development of human permanent teeth following irradiation. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 1987; 16(3): 376-82.

Takinami S, Kaga M, Yahata H, Kure A, Oguchi H, Yasuda M. Radiation-induced hypoplasia of the teeth and mandible – a case report. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1994; 78(3): 382-4.

Ten Cate AR. Desenvolvimento do dente e seus tecidos de suporte. In: Ten Cate R. *Histologia Oral: desenvolvimento, estrutura e função.* 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2008. p. 79-107.

Thesleff I, Aberg T. Tooth morphogenesis and the differentiation of ameloblasts. *Ciba Found Symp.* 1997; 205: 3-12.

Thomson CD, Stewart RD. Metabolism of [ $^{75}\text{Se}$ ] selenite in young women. *Br J Nutr.* 1974; 32(1): 47-57.

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.

Tuji FM, Almeida SM, Bóscolo FN, Manzi FR. Avaliação do efeito radioprotetor do selenito de sódio no processo de reparação tecidual em ratos. *Radiol Brás.* 2005; 38(5): 359-64.

Ubios AM, Piloni MJ, Cabrini RL. Mandibular growth and tooth eruption after localized X-radiation. *J Oral Maxillofac Surg.* 1992; 50 (2): 153-6.

White SC, Pharoah MJ. Radiologia Oral Fundamentos e Interpretação. Rio de Janeiro: Elsevier Editora; 2007.

Wilson DS, Zhang P, He R, Ota R, Omaye ST. Kinetics of selenium incorporation into tissues of female mallard ducks. Toxicology. 1997; 122(1-2): 51-60.

Yan L, Spallholz JE. Generation of reactive oxygen species from the reaction of selenium compounds with thiols and mammary tumor cells. Biochem Pharmacol. 1993; 45(2): 429-37.

**ANEXO 1: Certificado do Comitê de Ética na Experimentação Animal.**



Universidade Estadual de Campinas  
Instituto de Biologia



CEEA-IB-UNICAMP

**Comissão de Ética na Experimentação Animal  
CEEA-IB-UNICAMP**

**CERTIFICADO**

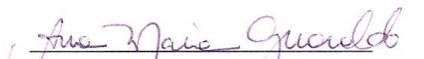
Certificamos que o Protocolo nº **1250-1**, sobre "**Ação do selenito de sódio em dentes irradiados durante odontogênese. Estudo experimental em ratos**", sob a responsabilidade de **Profa. Dra. Solange Maria de Almeida / Roselaine Moreira Coelho / Ellen Gaby Neves**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA)-IB-UNICAMP em reunião de 23 de abril de 2007.

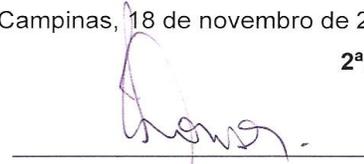
**CERTIFICATE**

We certify that the protocol nº **1250-1**, entitled "**The role of sodium selenite in irradiated teeth throughout odontogenesis. Experimental study in rats**", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - UNICAMP) on april 23, 2007.

Campinas, 18 de novembro de 2010.

**2ª. VIA**

  
Profa. Dra. Ana Maria A. Guaraldo  
Presidente

  
Fátima Alonso  
Secretária Executiva